



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ISSN 2519-2124

Учреждение образования  
«Белорусский государственный  
медицинский университет»



# БГМУ

## в авангарде медицинской науки и практики

### Выпуск 12

# ТОМ 2

Минск  
2022

Министерство здравоохранения Республики Беларусь  
Учреждение образования  
«Белорусский государственный медицинский университет»

# **БГМУ**

## **в авангарде медицинской науки и практики**

Рецензируемый ежегодный сборник  
научных трудов

**Выпуск 12**

Основан в 2011 году

*Под редакцией ректора члена-корреспондента  
Национальной академии наук Беларуси,  
доктора медицинских наук, профессора С. П. Рубниковича,  
проректора по научной работе доктора медицинских наук,  
доцента В. А. Филонюка*

В двух томах

Том 2

Минск  
2022

**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 : ИВЦ Минфина, 2022. — Вып. 12. — Т. 2 : Фундаментальная наука — медицине. Фармация. — 260 с. : табл., ил.

В сборнике представлены результаты многочисленных клинических и экспериментальных исследований и наблюдений, проводимых в БГМУ, других государственных медицинских, фармацевтических научных организациях Республики Беларусь, Российской Федерации в медицинской, биологической, фармацевтической отраслях науки: внутренние и инфекционные болезни, эпидемиология и гигиена, кардиология, акушерство и гинекология, психиатрия, неврология и нейрохирургия, общая патология, хирургия, онкология, педиатрия, стоматология, травматология и ортопедия, военная медицина, фармация и фармацевтика, медицинское и фармацевтическое образование.

Освещаемые результаты научных достижений будут интересны и полезны для профессорско-преподавательского состава, аспирантов и докторантов, клинических ординаторов, студентов медицинских и фармацевтических учреждений высшего образования, широкого круга научных работников и специалистов, работающих в областях теоретической и практической медицины, фармации.

Сборник включен в перечень научных изданий, утвержденных приказом Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь, для опубликования результатов диссертационных исследований (медицинские науки).

#### Редакционная коллегия:

главный редактор – чл.-корр. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. С. П. Рубникович;  
заместитель главного редактора – д-р мед. наук, доц. В. А. Филонюк;  
секретарь редколлегии – канд. техн. наук Г. А. Жалейко

#### Члены редакционной коллегии:

д-р мед. наук, проф. *Н. А. Бизунок*; д-р мед. наук, проф. *В. Г. Богдан*; чл.-корр. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. *Ф. И. Висмонт*; д-р мед. наук, проф. *А. И. Вологовский*; д-р мед. наук, проф. *Ю. М. Гаин*; д-р мед. наук, проф. *В. Н. Гапанович*; канд. мед. наук, доц. *Е. И. Гудкова*; д-р биол. наук, проф. *Н. С. Гурина*; д-р фарм. наук, проф. *А. И. Жебентяев*; д-р мед. наук, проф. *С. Л. Кабак*; чл.-корр. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. *И. А. Карпов*; д-р мед. наук, проф. *Т. М. Литвинова*; д-р мед. наук, проф. *Н. П. Митьковская*; д-р мед. наук, проф. *И. Н. Мороз*; д-р мед. наук, проф. *Т. В. Мохорт*; д-р мед. наук, проф. *Л. Ф. Можейко*; д-р мед. наук, проф. *М. И. Римжа*; д-р мед. наук, проф. *О. Н. Романова*; канд. мед. наук, проф. *И. В. Романовский*; д-р биол. наук, проф. *А. Н. Стожаров*; д-р мед. наук, доц. *В. В. Строгий*; д-р мед. наук, проф. *А. В. Строцкий*; д-р мед. наук, проф. *А. Д. Таганович*; акад. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. *С. И. Третьяк*; д-р биол. наук, доц. *В. В. Хрусталева*; д-р мед. наук, проф. *В. Я. Хрыщанович*; д-р фарм. наук, проф. *В. М. Царенков*; д-р мед. наук, проф. *Г. Н. Чистенко*

#### Рецензенты:

канд. мед. наук, доц. *Т. Г. Адамович*; д-р мед. наук, проф. *С. А. Алексеев*; канд. мед. наук, доц. *А. И. Алешкевич*; канд. мед. наук, доц. *М. И. Бандацкая*; канд. фарм. наук, доц. *С. Н. Борисевич*; канд. мед. наук, доц. *И. Н. Вальчук*; чл.-корр. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. *Ф. И. Висмонт*; канд. мед. наук, доц. *А. В. Волчек*; канд. мед. наук, доц. *Е. И. Гудкова*; канд. мед. наук, доц. *Т. С. Гузовская*; д-р мед. наук, доц. *Ю. Г. Дегтярев*; канд. биол. наук, доц. *Т. Е. Дороженкова*; канд. мед. наук, доц. *И. И. Довгалевич*; д-р мед. наук, проф. *М. Л. Доценко*; канд. техн. наук *Г. А. Жалейко*; канд. мед. наук, доц. *А. С. Жидков*; д-р мед. наук, доц. *П. А. Затолока*; канд. биол. наук *Ж. А. Ибрагимова*; д-р мед. наук, проф. *С. Л. Кабак*; канд. мед. наук, доц. *Т. И. Каленчиц*; канд. мед. наук, доц. *Т. А. Канишкова*; канд. биол. наук, доц. *С. В. Капитулец*; чл.-корр. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. *И. А. Карпов*; канд. мед. наук *И. П. Климчук*; канд. хим. наук, доц. *Н. Н. Ковганко*; канд. мед. наук, доц. *Е. Л. Колб*; д-р мед. наук, проф. *А. В. Копытов*; канд. мед. наук, доц. *И. К. Королькова*; канд. хим. наук, доц. *О. Ф. Краецкая*; канд. мед. наук, доц. *Ж. И. Кривошеева*; канд. хим. наук, доц. *Ф. Ф. Лахвич*; канд. мед. наук, доц. *Т. А. Летковская*; канд. мед. наук, доц. *О. В. Лисковский*; канд. мед. наук, доц. *Л. В. Лицкевич*; д-р мед. наук, проф. *Т. М. Литвинова*; канд. мед. наук, доц. *О. С. Лобачевская*; канд. мед. наук, доц. *Л. Н. Ломать*; канд. фарм. наук, доц. *Р. И. Лукашов*; канд. мед. наук, доц. *Л. А. Малькевич*; д-р мед. наук, проф. *Л. Н. Марченко*; д-р мед. наук *О. П. Матильевич*; канд. мед. наук, доц. *Е. Р. Михнович*; д-р мед. наук, проф. *Л. Ф. Можейко*; д-р мед. наук, проф. *И. Н. Мороз*; канд. мед. наук, доц. *Л. М. Небышенец*; д-р мед. наук, проф. *В. А. Переверзев*; канд. мед. наук, доц. *Е. Б. Петрова*; д-р мед. наук, проф. *Н. Н. Пилипцевич*; канд. мед. наук, доц. *В. А. Прилуцкая*; д-р мед. наук, проф. *А. В. Прохоров*; канд. мед. наук, доц. *Л. В. Рачок*; канд. мед. наук, доц. *О. Н. Ринейская*; д-р мед. наук, проф. *О. Н. Романова*; канд. мед. наук, доц. *Е. В. Рысевич*; канд. мед. наук, доц. *И. И. Саванович*; канд. мед. наук, доц. *В. М. Савицкая*; канд. мед. наук, доц. *А. А. Свицкий*; канд. мед. наук, доц. *И. П. Семенов*; д-р мед. наук, проф. *В. Н. Сидоренко*; д-р мед. наук, проф. *Э. К. Сидорович*; д-р мед. наук, проф. *О. А. Скугаревский*; д-р мед. наук, проф. *Н. Ф. Сорока*; канд. мед. наук, доц. *Т. В. Статкевич*; д-р мед. наук, доц. *В. В. Строгий*; канд. мед. наук, доц. *Т. М. Студеникина*; д-р мед. наук, проф. *А. Д. Таганович*; канд. мед. наук, доц. *О. Н. Теслова*; канд. мед. наук, доц. *И. В. Федорова*; д-р мед. наук, проф. *А. С. Федулов*; д-р мед. наук, доц. *В. А. Филонюк*; канд. хим. наук, доц. *Г. П. Фондо*; д-р биол. наук, доц. *В. В. Хрусталева*; канд. мед. наук, доц. *И. А. Хрущ*; д-р мед. наук, проф. *Н. Л. Цапаева*; канд. мед. наук, доц. *А. Ю. Чекина*; канд. мед. наук, доц. *Д. А. Черношей*; канд. мед. наук, доц. *С. Н. Чур*; канд. мед. наук, доц. *Т. Л. Шевела*; д-р мед. наук, проф. *А. П. Шепелькевич*; канд. мед. наук, доц. *М. Н. Шепетько*; канд. мед. наук, доц. *С. Н. Шубина*; д-р мед. наук, проф. *Е. И. Юшко*.

Ответственные за выпуск – *В. А. Филонюк, Е. И. Гудкова*

MINISTRY OF HEALTH OF THE REPUBLIC OF BELARUS  
BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

Advances in medicine  
and medical sciences: collection  
of Belarusian  
state medical university

Peer-reviewed annual collection  
of scientific papers

Issue 12

Published since 2011

*Edited by rector Corresponding member of the National Academy  
of Sciences of Belarus, MD, Ph.D DSc., prof. S. P. Rubnikovich  
and vice-rector for scientific work MD, Ph.D. DSc.,  
Associate prof. V. Filanyuk*

In two volumes

Volume 2

Minsk  
2022

Editors & Board:

Editor-in-chief S. P. Rubnikovich, Corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus,  
MD, Ph.D. DSc., prof.;  
Deputy Editor-in-chief V. Filanyuk, MD, Ph.D. DSc., Associate prof.  
Executive Secretary – H. A. Zhaleika, Ph.D. tech. sciences

Editorial Advisory Board:

*N. A. Bizunok*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *V. G. Bogdan*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *F. I. Vismont*, Corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, MD, Ph.D. DSc., prof.; *A. I. Volotovskii*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *Y. M. Gayin*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *V. N. Gapanovic*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *E. I. Gudkova*, Ph.D., Associate prof.; *N. S. Gurina*, Ph.D. DSc., prof.; *A. I. Zhebentyev*, Ph.D. DSc., prof.; *S. L. Kabak*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *I. A. Karpov*, Corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, MD, Ph.D. DSc., prof.; *T. M. Litvinova*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *N. P. Mitkovskaya*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *I. N. Moroz*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *T. V. Mohort*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *L. F. Mozeiko*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *M. I. Rimzha*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *O. N. Romanova*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *I. V. Romanovsky*, Ph.D. DSc., prof.; *V. V. Strogiiy*, MD, Ph.D. DSc., Associate prof.; *A. N. Stozharov*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *A. V. Strotsky*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *A. D. Tahanovich*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *S. I. Tretyak*, academician of the National Academy of Sciences of Belarus, MD, Ph.D. DSc., prof.; *V. V. Khrustalev*, MD, Ph.D., Associate prof.; *V. Ya. Khryshchanovich*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *V. M. Tsarenkov*, MD, Ph.D. DSc., prof.; *G. N. Chistenko*, MD, Ph.D. DSc., prof.

Issue editor – *V. Filanyuk, E. I. Gudkova*

Advances in Medicine and Medical Sciences is a peer-reviewed, international, scientific collection that publishes full-length articles in the field of medical sciences: internal and infectious diseases, epidemiology and hygiene, cardiology, obstetrics and gynecology, psychiatry, neurology and neurosurgery, general pathology, surgery, oncology, pediatrics, dentistry, traumatology and orthopedics, pharmacology, pharmacy and pharmaceutical sciences, military medicine, didactics of medical and life science disciplines.

Collection presents the results of fundamental and applied researches contributing significantly to a variety of medical sciences and applied medicine and will be interesting to academics and students.

Peer-reviewed journal welcomes original research articles on current advances in life sciences, preclinical and clinical medicine, and related disciplines.

Collection is included in the list of scientific journals approved by order of the Higher Attestation Commission of the Republic of Belarus for the publication of the results of scientific researches in the field of medical sciences.







**Фундаментальная наука — медицине**



**Фармация**



**Фундаментальная  
наука — медицине**

**Fundamental  
science — for medicine**





УДК 611.664-006.3.04:615.28(476)

## ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАСНОГО И СИНЕГО СПЕКТРАЛЬНЫХ ДИАПАЗОНОВ В ПРИСУТСТВИИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА «ФОТОЛОН» НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК HeLa

Церковский Д. А.<sup>1</sup>, Александрова Е. Н.<sup>1</sup>, Протопович Е. Л.<sup>1</sup>, Шелкович С. Е.<sup>2</sup>,  
Швец Е. В.<sup>2</sup>, Литвинова Т. М.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Государственное учреждение  
«РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова»,  
г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Государственное учреждение образования  
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»,  
г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>3</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** Актуальным направлением научных исследований в экспериментальной онкологии является изучение возможности активации фотосенсибилизирующих агентов (ФС) лазерным излучением различных спектров. Цель исследования состояла в изучении влияния низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) красного и синего спектральных диапазонов в присутствии ФС «Фотолон» на опухолевые клетки. В условиях *in vitro* на культуре опухолевых клеток HeLa исследована жизнеспособность клеток после воздействия низкоинтенсивного (10 мВт/см<sup>2</sup>) лазерного излучения красного ( $\lambda = 650$  нм) и синего ( $\lambda = 405$  нм) спектров и их комбинации, как в отсутствие, так и в присутствии ФС в дозе 1 мкг/мл. Критерием оценки эффективности проведенных воздействий было количество жизнеспособных опухолевых клеток в камере Горяева. Результаты исследований показали, что НИЛИ красного и синего спектров не оказывает в отсутствие ФС существенного влияния на рост культуры опухолевых клеток HeLa. Инкубация клеток в течение 2 ч в питательной среде, содержащей ФС, приводит к увеличению чувствительности клеток к последующему лазерному излучению красного и синего спектральных диапазонов. По критерию 50%-й эффективности (длительности лазерного воздействия, вызывающего уменьшение числа клеток на 50 % по сравнению с контролем), фотодинамическая активность НИЛИ синего диапазона в 6 раз выше фотодинамической активности лазерного излучения красного диапазона. Инкубация клеток с ФС и последующее воздействие НИЛИ синего и красного спектров приводит к значительной клеточной гибели. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении противоопухолевой эффективности НИЛИ красного и синего спектров при его комбинированном применении с ФС «Фотолон».

**Ключевые слова:** низкоинтенсивное лазерное излучение, фотосенсибилизатор, опухолевые клетки HeLa.

**Введение.** Лазерная терапия является актуальным и высокоэффективным методом лечения различных заболеваний, в том числе и злокачественных новообразований. Как правило, в клинической онкологии применяются лазерные аппараты, генерирующие излучение с высокой интенсивностью. В последние годы определенное внимание уделяется изучению эффективности низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), которое применяется в медицине в двух основных направлениях: при фотодинамической терапии опухолей, где используется его повреждающий эффект, а так-

же для лечения широкого круга различных воспалительных заболеваний, имея в виду стимулирующий эффект НИЛИ, а именно — противовоспалительный, анальгезирующий, регенераторный, десенсибилизирующий, гипохолестеринемический, бактерицидный и др.

**Цель работы** — изучение противоопухолевого эффекта НИЛИ двух различных спектров (красный и синий) в комбинации с применением отечественного ФС.

**Материалы и методы.** Культура опухолевых клеток. Исследования проводили на монослой-

ной культуре опухолевых клеток HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, клон М) [1], полученной из банка клеточных культур РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (РНПЦ ЭМ, Республика Беларусь). Культуру клеток выращивали в питательной среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина.

Культура клеток HeLa является перевиваемой разновидностью клеточных культур, когда используются стабильные штаммы клеток, пассирующиеся вне организма в течение многих лет. Перевиваемая линия карциномы шейки матки HeLa была выделена в 1952 г. [2] и до сих пор используется во многих лабораториях мира. При перевивке бестимусным мышам клетки культуры HeLa характеризуются туморогенностью с соответствующими гистологическими свойствами исходной карциномы шейки матки человека [3].

Культура клеток HeLa характеризуется эпителиоподобной морфологией и растет в виде монослоя на поверхности стеклянной или пластиковой посуды. Для снятия монослоя клеток с поверхности лабораторной посуды, подсчета числа клеток в камере Горяева и посева культуры используют раствор Версена (0,02 % ЭДТА).

**Фотосенсибилизатор.** В качестве ФС использовали лекарственное средство «Фотолон» (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь), содержащее активное вещество хлорин  $e_6$  в виде тринатриевой соли и вспомогательное вещество — низкомолекулярный медицинский поливинилпирролидон. ФС «Фотолон» обладает интенсивными полосами поглощения в видимой и ультрафиолетовой области. Максимумы поглощения наиболее интенсивных полос находятся в видимой области спектра при  $\lambda = 402 \pm 4$  нм и при  $\lambda = 660 \pm 5$  нм. Перед использованием порошок разводили физиологическим раствором до концентрации 1 мг/мл, затем в соотношении 1:50 (до концентрации 20 мкг/мл) и добавляли по 100 мкл во флаконы с культурой опухолевых клеток (объем питательной среды 2 мл) до конечной концентрации 1 мкг/мл.

**Фотооблучение.** Фотооблучение (ФО) флаконов с опухолевыми клетками проводили с применением НИЛИ красного ( $\lambda = 650$  нм) и/или синего ( $\lambda = 405$  нм) спектральных диапазонов на аппарате лазерном терапевтическом «Lotos» («Люзар», Республика Беларусь) с плотностью мощности излучения 10 мВт/см<sup>2</sup>. Размер светового пятна на расстоянии 10 см от излучающего модуля регулировали диафрагмой.

*Оценка противоопухолевой эффективности.*

Для экспериментов культуру опухолевых клеток рассеивали в пенициллиновые флаконы по 150–200 тыс. клеток в 2 мл питательной среды. На 3-е сутки после посева в экспоненциальной стадии роста культуры клеток во флаконы с монослоем клеток добавляли 100 мкл раствора (20 мкг/мл) ФС «Фотолон» в концентрации 1 мкг/мл. В контрольные флаконы добавляли 100 мкл физиологического раствора.

Флаконы, помещенные в светозащитную упаковку, инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 2 ч, затем отмывали от препарата холодным раствором Хенкса и добавляли свежую питательную среду. Через 24 ч после воздействия монослой клеток диспергировали 0,02%-м раствором Версена, добавляли в полученную взвесь клеток 0,1%-й раствор трипанового синего (1:10) и проводили подсчет живых (не окрашенных трипановым синим) клеток в камере Горяева. Выживаемость клеток в опытных группах определяли в процентах по отношению к контролю.

По кривой доза–эффект (число клеток в зависимости от концентрации препарата) определяли ЭД<sub>50</sub> — эффективную длительность светового воздействия, вызывающую уменьшение числа клеток на 50 % по сравнению с контролем.

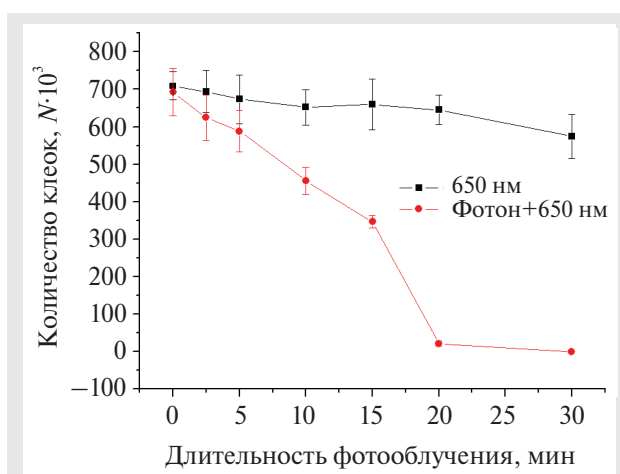
**Статистическая обработка.** Статистическую обработку результатов исследования проводили, используя программы Excel 2010, Origin Pro 7.0 и Statistica (версия 10). При уровне значимости  $p < 0,05$  различия считали статистически значимыми.

**Результаты и их обсуждение.** *Выживаемость опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ красного спектрального диапазона без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон».* Исследовано число клеток культуры HeLa после воздействия НИЛИ ( $\lambda = 650$  нм) в течение периода от 2,5 до 30 мин, без предварительной инкубации клеток с ФС «Фотолон» и после инкубации клеток в течение 2 ч в среде, содержащей 1 мкг/мл ФС «Фотолон». Время инкубации основано на изученной ранее динамике его накопления в опухолевых клетках [4].

Полученные данные, представленные в таблице 1 и на рисунке 1, свидетельствуют о том, что НИЛИ красного спектрального диапазона без ФС «Фотолон» практически не влияет на число опухолевых клеток HeLa. Достоверное снижение жизнеспособных опухолевых клеток по сравнению с контролем наблюдается после 10, 15, 20 и 30-минутной длительности ФО.

Таблица 1 — Выживаемость опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ ( $\lambda = 650$  нм) без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон»

Длительность фотооблучения	Количество опухолевых клеток				p
	без ФС «Фотолон»		с ФС «Фотолон»		
	$N \cdot 10^3$	%	$N \cdot 10^3$	%	
0 мин	$709 \pm 37$	100	$693 \pm 63$	98	0,83
2,5 мин	$694 \pm 56$	98	$624 \pm 61$	88	0,42
5 мин	$674 \pm 65$	95	$588 \pm 55$	83	0,34
10 мин	$652 \pm 47$	92	$456 \pm 37$	64	0,0099
15 мин	$660 \pm 67$	93	$346 \pm 17$	49	0,0014
20 мин	$645 \pm 39$	91	$21 \pm 7$	3	<0,00001
30 мин	$574 \pm 59$	81	0	0	<0,00001


 Рисунок 1 — Число опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ ( $\lambda = 650$  нм) без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон»

Предварительная инкубация с ФС «Фотолон» приводит к увеличению чувствительности клеток к последующему лазерному излучению. При этом увеличение длительности ФО приводит повышению эффективности воздействия.

Так, после ФО в течение 10 мин выживаемость клеток составляет 64 %, 15 мин — 49 %, 20 мин — 3 % по сравнению с необлученным контролем. 50%-я эффективность фотодинамического воздействия наблюдается при облучении клеток НИЛИ в течение примерно 15 мин.

Необходимо отметить, что ФС «Фотолон» в концентрации 1 мкг/мл питательной среды сам по себе, без воздействия света, не влияет на число клеток. Темновая цитотоксичность проявляется только при концентрации ФС «Фотолон» выше 5 мкг/мл [4].

*Выживаемость опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ синего спектрального диапазона без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон».*

Исследовано число клеток культуры HeLa после воздействия НИЛИ ( $\lambda = 405$  нм) в течение периода от 2,5 до 30 мин, без предварительной инкубации клеток с ФС «Фотолон» и после инкубации клеток в течение 2 ч в среде, содержащей 1 мкг/мл ФС «Фотолон». Время инкубации основано на изученной ранее динамике накопления в опухолевых клетках [4]. Полученные в данной части экспериментального исследования результаты представлены в таблице 2 и на рисунке 2.

 Таблица 2 — Выживаемость опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ ( $\lambda = 405$  нм) без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон»

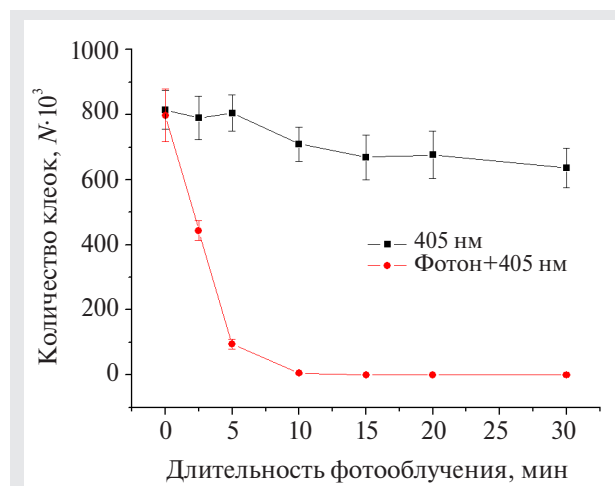
Длительность фотооблучения	Количество опухолевых клеток				p
	без ФС «Фотолон»		с ФС «Фотолон»		
	$N \cdot 10^3$	%	$N \cdot 10^3$	%	
0 мин	$815 \pm 60$	100	$798 \pm 81$	98	0,87
2,5 мин	$790 \pm 67$	97	$443 \pm 30$	54	0,0011
5 мин	$805 \pm 55$	99	$94 \pm 15$	12	<0,00001
10 мин	$709 \pm 53$	87	$5 \pm 3$	0,6	<0,00001
15 мин	$669 \pm 69$	82	0	0	<0,00001
20 мин	$676 \pm 73$	83	0	0	<0,00001
30 мин	$636 \pm 60$	78	0	0	<0,00001

Полученные данные, представленные в таблице 2 и на рисунке 2, свидетельствуют о том, что НИЛИ синего спектрального диапазона без ФС «Фотолон» обладает некоторым тормозящим действием на клеточную пролиферацию. Достоверное снижение выживаемости (на 22 %) по сравнению с контролем наблюдается после 30-минутной длительности ФО.

Предварительная инкубация с ФС «Фотолон» приводит к увеличению чувствительности клеток к последующему лазерному излучению. При этом эффективность совместного воздействия ФС «Фотолон» и синего света возрастает с увеличением длительности облучения и значительно более выражена, чем красного света. Так, после ФО в течение 2,5 мин выживаемость клеток составляет 54 %, 5 мин — 12 %, 10 мин — 0,6 % по сравнению с необлученным контролем, а облучение в течение 15 и более минут приводит к гибели всех клеток. 50%-я эффективность фотодинамического воздействия наблюдается при облучении клеток НИЛИ в течение примерно 2,5 мин.

ФС «Фотолон» в концентрации 1 мкг/мл питательной среды сам по себе, без воздействия света, не влияет на число клеток.

*Выживаемость опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ двух спектральных диапазонов ( $\lambda = 405$  нм,  $\lambda = 650$  нм) без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон».* Исследовано число клеток культуры HeLa после воздействия НИЛИ двух спектральных диапазонов (синий с  $\lambda = 405$  нм; красный с  $\lambda = 650$  нм), без предварительной



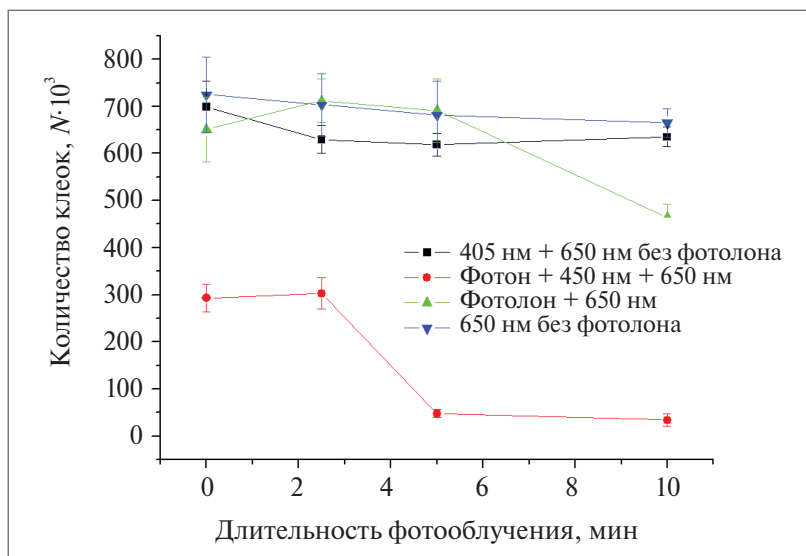
**Рисунок 2 – Число опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ ( $\lambda = 405$  нм) без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон»**

инкубации клеток с ФС «Фотолон» и после инкубации клеток в течение 2 ч в среде, содержащей 1 мкг/мл ФС «Фотолон». Исходя из эффективности совместного воздействия ФС «Фотолон» синего или красного света, изученной в предыдущих разделах, использовали только длительности 2,5 или 5 мин для синего света и 2,5, 5 или 10 мин — для красного света. Полученные в данной части экспериментального исследования результаты представлены в таблице 3 и на рисунке 3.

**Таблица 3 — Выживаемость опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ ( $\lambda = 405$  нм и  $\lambda = 650$  нм) и/или ФС «Фотолон»**

Длительность фотооблучения		Количество опухолевых клеток				p
		без ФС «Фотолон»		с ФС «Фотолон»		
405 нм	650 нм	N·10³	%	N·10³	%	
0 мин	0 мин	725 ± 80	100	651 ± 69	90	0,51
2,5 мин	0 мин	699 ± 55	96	293 ± 29	40	0,0001
5 мин	0 мин	680 ± 61	94	13 ± 6	2	<0,00001
0 мин	2,5 мин	703 ± 67	97	712 ± 47	98	0,91
0 мин	5 мин	682 ± 71	94	691 ± 67	95	0,93
0 мин	10 мин	665 ± 30	92	464 ± 29	64	0,001
2,5 мин	2,5 мин	630 ± 30	87	303 ± 33	42	0,00005
2,5 мин	5 мин	619 ± 24	85	48 ± 8	7	<0,00001
2,5 мин	10 мин	635 ± 21	88	34 ± 13	5	<0,00001
5 мин	5 мин	625 ± 22	86	10 ± 3	1	<0,00001
5 мин	10 мин	665 ± 24	92	9 ± 3	1	<0,00001





**Рисунок 3 — Выживаемость опухолевых клеток HeLa после воздействия НИЛИ двух спектральных диапазонов, синего ( $\lambda = 405$  нм) и красного ( $\lambda = 650$  нм), без ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон»**

Полученные данные, представленные в таблице 3 и на рисунке 3, свидетельствуют о том, что воздействие НИЛИ двух спектральных диапазонов, синего ( $\lambda = 405$  нм) и красного ( $\lambda = 650$  нм), без предварительной инкубации клеток с ФС «Фотолон», не вызывает существенного торможения роста культуры HeLa.

Инкубация клеток с ФС «Фотолон» и последующее воздействие НИЛИ двух спектральных диапазонов, синего ( $\lambda = 405$  нм) и красного ( $\lambda = 650$  нм), приводит к значительной клеточной гибели. При этом, если эффективность комбинаций «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (2,5 мин)», «405 нм (5 мин) + 650 нм (5 мин)» и «405 нм (5 мин) + 650 нм (10 мин)» не превышает эффективность действия одного синего света, то в случае комбинаций «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (5 мин)» и «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (10 мин)» наблюдается взаимное усиление действия синего и красного света.

Так, выживаемость клеток после действия ФС «Фотолон» и комбинации «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (5 мин)» составляет 7 %, тогда как после действия ФС «Фотолон» и света 405 нм (2,5 мин) — 40 %, а после действия ФС «Фотолон» и света 650 нм (5 мин) — 95 %.

Выживаемость клеток после действия ФС «Фотолон» и комбинации «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (10 мин)» составляет 5 %, тогда как после действия ФС «Фотолон» и света 405 нм (2,5 мин) — 40 %, а после действия ФС «Фотолон» и света 650 нм (10 мин) — 64 %.

**Закключение.** На культуре опухолевых клеток HeLa исследована выживаемость клеток

после ФО с применением НИЛИ ( $\lambda = 650$  нм; 2,5–30 мин) без инкубации клеток с ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон» (1 мкг/мл, 2 ч). Результаты исследования показали, что НИЛИ красного спектрального диапазона в отсутствие ФС «Фотолон» не оказывает существенного влияния на рост культуры клеток. Воздействие НИЛИ красного спектрального диапазона совместно с ФС «Фотолон» приводит к снижению выживаемости клеток; эффективность воздействия возрастает с увеличением длительности ФО; 50%-я эффективность наблюдается при облучении клеток НИЛИ в течение примерно 15 мин.

На культуре опухолевых клеток HeLa исследована выживаемость клеток после облучения НИЛИ ( $\lambda = 405$  нм; 2,5–30 мин) без инкубации клеток с ФС «Фотолон» и после инкубации клеток с ФС «Фотолон» (1 мкг/мл, 2 ч). Результаты исследования показали, что НИЛИ синего спектрального диапазона в отсутствие ФС «Фотолон» не оказывает значительного влияния на рост культуры клеток. Воздействие НИЛИ синего спектрального диапазона совместно с ФС «Фотолон» приводит к снижению выживаемости клеток; эффективность воздействия возрастает с увеличением длительности ФО; 50%-я эффективность наблюдается при облучении клеток НИЛИ в течение примерно 2,5 мин.

Воздействие НИЛИ двух спектральных диапазонов, синего ( $\lambda = 405$  нм) и красного ( $\lambda = 650$  нм), без предварительной инкубации



клеток с ФС «Фотолон» не вызывает существенного торможения роста культуры HeLa. Инкубация клеток с ФС «Фотолон» и последующее воздействие НИЛИ двух спектральных диапазонов, синего ( $\lambda = 405$  нм) и красного ( $\lambda = 650$  нм), приводит к значительной клеточной гибели. При этом, если эффективность комбинаций «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (2,5 мин)», «405 нм (5 мин) + 650 нм (5 мин)» и «405 нм (5 мин) + 650 нм (10 мин)» не пре-

вышает эффективность действия одного синего света, то в случае комбинаций «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (5 мин)» и «405 нм (2,5 мин) + 650 нм (10 мин)» наблюдается взаимное усиление действия синего и красного света.

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении противоопухолевой эффективности НИЛИ красного и синего спектров при его комбинированном применении с ФС «Фотолон».

#### Список цитированных источников

1. Гусев, Л. И. Лазерная гемотерапия в клинической онкологии / Л. И. Гусев, Д. А. Притыко, Т. А. Шароев // Российский онкологический журнал. — 2013. — № 6. — С. 48–53.
2. Российская коллекция клеточных культур позвоночных [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/katalog1.pdf>. — Дата доступа: 16.06.2022.
3. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance / J. Lypez, A. Poitevin, V. Mendoza-Martinez, C. Pirez-Plasencia, A. Garcna-Carrancb // BMC Cancer. — 2012. — Vol. 12. — P. 48.
4. Комбинация цисплатина с ФДТ in vitro / Е. Н. Александрова, Е. Л. Протопович, Д. А. Церковский, Ю. П. Истомина // Российский биотерапевтический журнал. — 2015. — Т. 14, № 1. — С. 58.

## The effect of low-intensity laser radiation in the red and blue spectral ranges in the presence of the photosensitizer photolon on the viability of HeLa tumor cells

*Tzerkovsky D. A.<sup>1</sup>, Alexandrova E. N.<sup>1</sup>, Protopovich Ya. L.<sup>1</sup>, Shelkovich S. E.<sup>2</sup>, Shvets E. V.<sup>2</sup>, Litvinova T. M.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>State Institution “N. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus;

<sup>2</sup>State Educational Institution “Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education”, Minsk, Republic of Belarus;

<sup>3</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The study of the possibility of activation of photosensitizing agents (PS) by laser radiation of various spectra is a topical problem of contemporary oncology. The aim of this work was to study the effect of low-intensity laser radiation (LILR) of the red and blue spectral ranges in the presence of the PS Photolon on tumor cells. Under in vitro conditions on a culture of HeLa tumor cells, cell viability was studied after exposure to low-intensity (10 mW/cm<sup>2</sup>) laser radiation of red ( $\lambda = 650$  nm) and blue ( $\lambda = 405$  nm) spectra and their combination, both in the absence and in the presence of PS at a dose of 1  $\mu$ g/ml. The criterion for evaluating the effectiveness of the interventions was the number of viable tumor cells in the Goryaev's chamber. The results of the studies have shown that LILR of the red and blue spectra does not have a significant effect on the growth of the culture of HeLa tumor cells in the absence of PS. Incubation of cells for 2 h in a nutrient medium containing PS leads to an increase in the sensitivity of cells to subsequent laser radiation in the red and blue spectral range. According to the criterion of 50 % efficiency (the duration of laser exposure, causing a decrease in the number of cells by 50 % compared to the control), the photodynamic activity of LILR in the blue range is 6 times higher than the photodynamic activity of laser radiation in the red range. Incubation of cells with PS and subsequent exposure to blue and red LILR leads to significant cell death. The results obtained indicate an increase in the antitumor efficacy of LILR of the red and blue spectra when it is combined with the PS Photolon.

**Keywords:** low-intensity laser radiation, photosensitizer, tumor cells HeLa.

*Поступила 21.07.2022*

УДК 617.735-007.23-053.9

## ВЛИЯНИЕ ГЕННОГО ПОЛИМОРФИЗМА НА РАЗВИТИЕ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ

*Медведева Л. М., Королькова Н. К., Яроцкая Н. Н.*

*Учреждение образования «Витебский государственный  
ордена Дружбы народов медицинский университет»,  
г. Витебск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — хроническое, прогрессирующее заболевание, характеризующееся снижением, а впоследствии потерей центрального зрения. Патогенез данного заболевания до конца не изучен. В исследовании мы определяли наличие полиморфных вариантов генов TLR-3, CRP, SOD 2, CFH, CAV 1, HTRA 1, APOE у пациентов с ВМД. В результате получилось, что мутации CFH ( $p = 0,0039$ ) и CAV 1 ( $p = 0,0013$ ) с определенной вероятностью ассоциированы с диагнозом, мутация HTRA 1 ( $p = 0,00003$ ) с высокой вероятностью ассоциирована с диагнозом, а сочетание мутаций CFH, CAV1 и HTRA 1 (0,0000003) почти наверняка ассоциировано с наличием изучаемого заболевания. Без учета гетерозиготных вариантов наиболее значимой для развития ВМД оказалась модель пациентов гомозиготных по мутантному аллелю гена HTRA 1 ( $p = 0,0027$ ). Таким образом, наибольшую связь с развитием ВМД в нашем исследовании имеет полиморфизм гена HTRA 1, а самая лучшая модель — комбинация мутаций CFH, CAV 1, HTRA 1, при сочетании которых прогнозируемый диагноз очень вероятен.

**Ключевые слова:** возрастная макулярная дегенерация, полиморфизм, гены, HTRA 1.

**Введение.** Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — хроническое, прогрессирующее заболевание, характеризующееся поражением макулярной области сетчатки и снижением, а впоследствии потерей центрального зрения. Эта патология связана с возрастом и является ведущей причиной слабовидения и слепоты у людей старше 60 лет [1]. Значимые изменения при ней происходят в ретинальном пигментном эпителии (РПЭ), мембране Бруха, слое хориокапилляров и уже вторично вовлекается нейроэпителий сетчатки. Существует большое количество классификаций, но общепринятой и используемой остается разделение на «сухую» форму ВМД, которая составляет 85–90 % [2], и «влажную», или неоваскулярную. Патогенез данного заболевания до конца не изучен, но в последние годы большое количество авторов считают ВМД генетически детерминированным заболеванием [1, 3]. В публикациях упоминаются следующие гены: PLEKHA1, HTRA1, CFH, CFB/C2, CRP, комплемент C3, ARMS2, HMCN1/FBLN6, TLR3, ApoE, VEGF A и другие [4, 5], с которыми тем или иным образом связывают развитие ВМД. Во всех генах человека определяются два аллеля (это различные формы одного и того же гена, расположенные в одинаковых участках гомологичных хромосом). Организм может быть гомозиготным по данному гену, когда

форма аллелей в паре одинаковая и гетерозиготным, когда форма аллелей в паре разная. Существует понятие полиморфизма генов, это структурное различие альтернативных вариантов гена (обычно нормального и мутантного). Однонуклеотидный полиморфизм — отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (A, T, G или C) в геноме представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом, он является генетическим маркером. Ряд заболеваний у человека развивается из-за мутаций в определенных генах.

**Цель работы** — определение наличия полиморфных вариантов генов: толл-подобного рецептора 3 (TLR-3), С-реактивного белка (CRP), митохондриальной супероксиддисмутазы 2 (SOD 2), фактора комплемента Н (CFH), кавеолина 1 (CAV 1), сериновой пептидазы 1 (HTRA 1), аполипопротеина Е (APOE) у пациентов с ВМД.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 85 человек, 65 из которых были пациенты с ВМД, а 20 без нее. Всем была проведена визометрия, биомикроскопия с высокодиоптрийными линзами и оптическая когерентная томография (ОКТ), на основании которых пациенты были распределены в группы, обследовались оба глаза. В исследуемой группе было 46 женщин и 19 мужчин, в группе

сравнения 14 женщин и 6 мужчин, что составило 70 и 30 % соответственно в двух группах. Средний возраст пациентов на момент обследования составил в исследуемой группе 71,7 года (от 53 до 89 лет), в группе сравнения 71,3 года (от 56 до 83 лет). Таким образом, группы были сопоставимы по полу и возрасту. У всех исследуемых была взята кровь, определен полиморфизм генов: толл-подобного рецептора 3 (TLR-3), С-реактивного белка (CRP), митохондриальной супероксиддисмутазы 2 (SOD 2), фактора комплемента H (CFH), кавеолина 1 (CAV 1), сериновой пептидазы 1 (HTRA 1), аполипопротеина E (APOE) электрофоретическим методом детекции, анализу подвергалась геномная ДНК человека, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (ООО НПФ «Литех», Россия), а затем с образцом выделенной ДНК параллельно проводились две

реакции амплификации — с двумя парами аллель-специфичных праймеров (наборы реагентов для анализа однонуклеотидных полиморфизмов, ООО НПФ «Литех», Россия). Детекция амплифицированных фрагментов ДНК проводилась электрофоретическим методом в агарозном геле с помощью «Комплекта реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации» (ООО НПФ «Литех», Россия). Исследовали однонуклеотидные полиморфизмы (SNP — single nucleotide polymorphism) промоторного региона вышеуказанных генов: TLR3-Leu412Phe, CRP-C1444T, SOD 2-T58C, SOD 2-C60T, CFH-Tyr402His, CAV 1-G2891A, HTRA 1 IVSI-625 G>A, APOE-Leu28Pro. В результате определения возможны были три варианта заключений: гомозигота по аллелю 1 (+-), гетерозигота (++) , гомозигота по аллелю 2 (-+) (таблица 1).

Таблица 1 — Интерпретация результатов определения гомо- и гетерозиготности по нормальному и мутантному генам

Аллель 1 (до позиции замены, делеции, инсерции)	Аллель 2 (после позиции замены, делеции, инсерции)	Результат
+	-	Гомозигота по аллелю 1
+	+	Гетерозигота
-	+	Гомозигота по аллелю 2

**Результаты и их обсуждение.** Ниже представлены результаты исследования полиморфизма генов в исследуемой группе и группе сравнения, где в скобках указан международ-

ный код полиморфизма, что обозначает позицию замены, делеции или инсерции и какая замена произошла (таблица 2).

Таблица 2 — Результаты определения полиморфизма генов

Ген	Исследуемая группа			Группа сравнения		
	Гомозигота по аллелю 1	Гомозигота по аллелю 2	Гетерозигота	Гомозигота по аллелю 1	Гомозигота по аллелю 2	Гетерозигота
TLR 3 (Phe412Leu)	47	5	13	14	2	4
CRP (C3872T)	60	2	3	20	0	0
1 SOD2 (T58C)	65	0	0	20	0	0
2SOD2 (C60T)	58	7	0	20	0	0
CFH (Tyr402His)	51	3	11	20	0	0
CAV 1 (G2891A)	48	2	15	20	0	0
HTRA 1 (ivsi-625G>A)	32	15	18	19	0	1
APOE (Leu28Pro)	65	0	0	20	0	0

Статистическая обработка данных была произведена с помощью программы *Statistica 10*, были построены логистические регрессионные модели для всех исследуемых генов, оп-

ции: вычисление асимптотических стандартных ошибок оценок параметров, метод оценивания использовался Квазиньютоновский (таблица 3).

Таблица 3 — Статистическая значимость логистических регрессионных моделей для мутаций генов

Независимая переменная ( $n = 85$ )	$p$	Статистическая значимость
Мутация TLR-3 (Phe412Leu)	0,78	Нет
Мутация CRP (C3872T)	0,096	Нет
Мутация 1 MSOD 2 (T58C)	1,0	Нет
Мутация 2 MSOD 2 (C60T)	0,047	Да, пограничная
Мутация CFH (Tyr402His)	0,0039	Да, высокая
Мутация CAV 1 (G2891A)	0,0013	Да, высокая
Мутация HTRA 1 (ivsi-625G>A)	0,000030	Да, очень высокая
Мутация APOE (Leu28Pro)	1,0	Нет
Комбинация мутаций CFH, CAV 1, HTRA 1	0,0000003	Да, очень высокая
Комбинация мутаций 2 MSOD2, CFH, CAV 1, HTRA 1	0,0000003	Да, очень высокая

Таким образом, мутации генов CFH и CAV 1 с определенной вероятностью ассоциированы с диагнозом ВМД, мутация HTRA 1 с высокой вероятностью ассоциирована с диагнозом. Также оценивалась комбинация наиболее статистически значимых мутантных генов: сочетание мутаций CFH, CAV 1 и HTRA 1 почти наверняка ассоциировано с наличием изучаемого заболевания. В нашем исследовании пол не имел значения в сравниваемых группах. Мутации генов APOE, CRP, 1 SOD 2, 2 SOD 2, TLR 3 не оказали выраженного влияния на развитие заболевания или отсутствовали в них.

Еще проводилась дополнительная оценка качества построенных в результате исследова-

ния значимых моделей с помощью определения отношения несогласия (отношение произведения чисел правильно расклассифицированных наблюдений к произведению чисел неправильно расклассифицированных), чувствительности (способность давать положительный результат при проверке гипотезы), специфичности (способность давать отрицательный результат, когда гипотеза не подтверждается) и коэффициента детерминации (доля дисперсии зависимой переменной, объясняемая рассматриваемой моделью зависимости, то есть объясняющими переменными) (таблица 4).

Таблица 4 — Дополнительная оценка качества построенных значимых моделей

Параметр	Отношение несогласия	Чувствительность, %	Специфичность, %
Мутация CFH	3,25	100	0
Мутация CAV1	3,25	100	0
Мутация HTRA 1	3,25	100	0
Комбинация мутаций CFH, CAV 1, HTRA 1	3,25	70,8	95,0
Комбинация мутаций 2 MSOD 2, CFH, CAV 1, HTRA 1	3,39	73,85	95,0

Отношение несогласия больше 1 показывает, что построенная в результате исследования классификация (разделение на здоровых и пациентов с ВМД) лучше, чем если бы мы просто провели классификацию наугад. Комбинация мутаций 2 MSOD 2, CFH, CAV 1, HTRA 1 имеет наилучшее сочетание чувствительности и специфичности. Общая доля объясненной дисперсии, или коэффициент детерминации ( $R^2$ ) для логистической регрессионной модели с комбинацией мутаций 2 MSOD 2, CFH, CAV 1, HTRA 1 в качестве независимых переменных

составляет 71,6 %, что является приемлемым показателем для биомедицинских исследований (значения в интервале 50–80 % считаются приемлемыми, >80 % — хорошими) (таблица 5).

В целом качество полученных моделей хуже, чем при анализе мутаций без разделения на гетеро- и гомозиготные их варианты, но это было сделано для того, чтобы выделить гомозиготы по мутантным генам, так как при варианте гетерозиготы мы не можем с уверенностью сказать, какой из аллелей проявляет свои свойства.



Таблица 5 — Статистическая значимость логистических регрессионных моделей для гомо- и гетерозиготных вариантов некоторых мутантных аллелей

Независимая переменная ( $n = 85$ )	$p$	Статистическая значимость
2 MSOD 2 гетерозигота	1,0	Нет
2 MSOD 2 гомозигота по аллелю 2	0,047	Пограничная
CFH гетерозигота	0,011	Допустимая
CFH гомозигота по аллелю 2	0,20	Нет
CAV 1 гетерозигота	0,0027	Высокая
CAV 1 гомозигота по аллелю 2	0,30	Нет
HTRA 1 гетерозигота	0,017	Допустимая
HTRA 1 гомозигота по аллелю 2	0,0027	Высокая

Перечень генов для исследования был выбран исходя из существующих теорий развития ВМД: окислительный стресс — 1 SOD 2 (T58C), 2SOD 2 (C60T); теория хронического воспаления — CAV 1 (G2891A), TLR 3 (Phe412Leu), CRP (C3872T), CFH (Tyr402His), TLR 3 (Phe412Leu); нарушения липидного обмена и заболевания сердечно-сосудистой системы — APOE (Leu28Pro), а также патогенетических процессов (неоваскуляризация), происходящих при ней — HTRA 1(ivsi-625G>A).

Таким образом, самыми значимыми генами в нашем исследовании, полиморфизм которых влияет на развитие ВМД, оказались: CFH, CAV 1, HTRA 1 и в особенности их комбинация. Ген HTRA 1 находится в 10 хромосоме, кодирует фермент сериновую протеазу, которая расщепляет белки во внеклеточном матриксе; связывается с белками семейства трансформирующих факторов роста  $\beta$  и ингибирует их, а эти белки в свою очередь играют важную роль в ангиогенезе. В одном из исследований было показано, что изменение экспрессии именно HTRA 1 в ретинальном пигментном эпителии больше связано с риском возникновения ВМД, чем генов PLEKHA 1 (домен гомолога плекстрина, содержащий A 1) и ARMS 2 (ген предрасположенности к ВМД 2), находящихся в той же хромосоме и роль которых в развитии ВМД также доказана [6]. Это может иметь значение в формировании неоваскулярной ВМД. Ген CFH расположен на длинном плече 1 хромосомы, кодирует фактор комплемента H, участвует в опосредовании иммунного ответа и является ингибитором альтернативного пути активации комплемента. В 2018 г. A. Sodi и соавт. подтвердили связь генотипа CFH Y402H с «сухой» формой ВМД и пигментным ретинитом, что говорит о дисрегуляции системы комплемента и подтверждает теорию хронического воспаления при ВМД. R. L. Klein и соавт. (2005 г.), а также

J. L. Haines и соавт. (2005 г.) независимо друг от друга определили, что вариант CFH Y402H объясняет 43 % ВМД. Ген CAV 1 находится в 7 хромосоме, кодирует каркасный белок, компонент плазматической мембраны кавеол, является ингибитором каскада киназ, супрессором опухолей, участвует в организации внеклеточного матрикса, распределении холестерина, передаче сигналов, эндоцитозе и липидном гомеостазе. Также он является сложным воспалительным регулятором и модулирует хронический воспалительный процесс в сетчатке. Это может тоже говорить в пользу теории хронического воспаления в развитии ВМД.

**Заключение.** Таким образом, наибольшую связь с развитием ВМД в нашем исследовании имеет полиморфизм гена HTRA 1 ( $p = 0,00003$ ), даже без учета гетерозиготных его вариантов ( $p = 0,0027$ ). Менее значимое влияние оказали мутации в генах CFH ( $p = 0,0039$ ), CAV 1 ( $p = 0,0013$ ). Предположительно оказали незначительное влияние или отсутствовали в генах CRP, SOD 2, APOE, TLR-3. Самой лучшей моделью логистической регрессии, связанной с заболеванием, стала комбинация мутаций 2 MSOD 2, CFH, CAV 1, HTRA 1 ( $0,0000003$ ), при сочетании которых прогнозируемый диагноз очень вероятен. Необходимо продолжать более детально изучать генетические аспекты развития ВМД, комплексные полиморфные генотипы, многократно увеличивающие риск развития заболевания, чтобы выстроить логическую патогенетическую цепочку, межгенные и межбелковые взаимодействия при заболевании. Это необходимо для разработки нового патогенетически обоснованного и эффективного лечения, которое будет направлено на более длительное сохранение зрительных функций у пациентов с этим заболеванием. При проведении секвенирования генома человека возможно вычисление всех генных мутаций, играющих роль в развитии ВМД.



### Список цитированных источников

1. Бикбов, М. М. Возрастная макулярная дегенерация / М. М. Бикбов, Р. Р. Файзрахманов, А. Л. Ярмухаметова. — М. : Апрель, 2013. — 196 с.
2. Эфендиева, М. Х. Сопоставление характеристик патологических изменений при сухой форме возрастной макулярной дегенерации по данным оптической когерентной томографии и аутофлюоресценции глазного дна / М. Х. Эфендиева, М. В. Будзинская // Практическая медицина. — 2017. — Т. 104, № 3. — С. 108–110.
3. Измайлов, А. С. Лечение «сухой» формы возрастной макулярной дегенерации / А. С. Измайлов // Клиническая офтальмология. — 2017. — № 1. — С. 56–60.
4. Современный подход к лечению возрастной макулярной дегенерации сухой формы / Т. С. Федотова [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. — 2014. — Т. 9, № 2. — С. 141–144.
5. Age-related macular degeneration associated polymorphism rs 10490924 in ARMS2 results in deficiency of a complement activator / S. Micklich [et al.] // J. of Neuroinflammation. — 2017. — Vol. 14, № 4. — P. 1–15.
6. Specific correlation between the major chromosome 10q26 haplotype conferring risk for age-related macular degeneration and the expression of HTRA1 / S. M. Liao [et al.] // Molecular vision. — 2017. — Vol. 23. — P. 318–333.

## Gene polymorphism influence on the development of age-of-aged macular degeneration

*Medvedeva L. M., Korolkova N. K., Yarotskaya N. N.*

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

Age-related macular degeneration (ARMD) is a chronic, progressive disease characterized by damage of the retinamacular area and decreasing, and further loss of central vision. This study included 85 people, 65 with ARMD, and 20 without it. Polymorphism of genes was determined: TLR-3, CRP, SOD 2, CFH, CAV 1, HTRA 1, APOE. As a result of statistical analysis, was found out that CFH ( $p = 0.0039$ ) and CAV 1 ( $p = 0.0013$ ) mutations are associated with the diagnosis with a certain probability, the HTRA 1 ( $p = 0.00003$ ) mutations are associated with the diagnosis with a high probability, and the combination of CFH, CAV1 and HTRA 1 ( $0.0000003$ ) mutations is highly likely associated with the presence of the studied disease. The most statistically significant for the development of ARMD was the model of patients homozygous for the mutant allele of the HTRA 1 gene ( $p = 0.0027$ ). Thus, the HTRA 1 gene polymorphism has the greatest association with the development of ARMD in our study. The combination of mutations 2 MSOD 2, CFH, CAV 1, HTRA 1 was the best model of logistic regression associated with the disease, the combination of which makes the predicted diagnosis very likely.

**Keywords:** age-related macular degeneration, polymorphism, genes, HTRA 1.

*Поступила 07.06.2022*

УДК 575.174.015.3:616.36-003.826

## ВЫЯВЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ПРИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ У ЖИТЕЛЕЙ ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ

*Суханова Л. Л., Калинин А. Л., Яцук М. Н.*

*Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»,  
г. Гомель, Республика Беларусь*

**Реферат.** Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) в настоящее время является наиболее распространенным заболеванием печени во всем мире. В развитии НАЖБП ключевую роль играют генетические факторы. Исследование полиморфизма rs738409 гена PNPLA3 и rs58542926 гена TM6SF2 было проведено в научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет». Для генотипирования вариантов PNPLA3 и TM6SF2 использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Всего было исследовано 85 образцов ДНК, из них 48 индивидов, имеющих НАЖБП, и 37 здоровых добровольцев. Анализ частоты аллелей полиморфизмов rs738409 гена PNPLA3 и rs58542926 гена TM6SF2 установил, что группа пациентов, так же как и группа здоровых лиц, характеризовалась преобладанием носителей аллеля С.

**Ключевые слова:** полиморфизм, TM6SF2, PNPLA3, НАЖБП.

**Введение.** НАЖБП представляет собой заболевание, обусловленное прогрессирующим накоплением жира в гепатоцитах, превышающее 5 % их массы, в отсутствие таких причин, как употребление алкоголя (более 20 г в день для женщин и более 30 г в день для мужчин), вирусная инфекция или другие заболевания печени. Данное заболевание включает целый спектр патологических состояний в диапазоне от относительно благоприятного стеатоза печени до более тяжелого неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) с различной степенью фиброза и далее до цирроза печени (ЦП), который служит главным фактором риска развития гепатоцеллюлярного рака (ГЦР).

В настоящее время НАЖБП представляет собой наиболее распространенное заболевание печени в мире: им страдают до 25 % населения Земли с максимальной распространенностью среди жителей Европы и Америки (24 % и 30 % соответственно). При этом распространенность среди населения Азии варьирует в пределах 15–40 % [1–3].

По данным многоцентрового исследования DIREG2, проведенного в России, у пациентов амбулаторного профиля распространенность НАЖБП составила 37,3 %. В 2019 г. получены и опубликованы данные о частоте НАЖБП в амбулаторно-поликлиническом звене одного медицинского центра, что составило 24,9 %. При этом по данным другого популяционного исследования для жителей

г. Москвы в целом этот показатель составил 7,4 % [4].

Частота встречаемости НАЖБП возрастает среди лиц с ожирением и метаболическим синдромом (МС). Так, распространенность достигает 80 % на фоне ожирения против 16 % у лиц с нормальным весом без метаболических факторов риска. Развитие НАЖБП коррелирует с индексом массы тела (ИМТ), но в большей степени зависит от накопления висцерального жира. Исследования свидетельствуют также о тесной связи НАЖБП с инсулинорезистентностью (ИР) / сахарным диабетом 2-го типа (СД2). От 25 % до 75 % пациентов с диабетом имеют стеатоз печени, в то же время 75 % пожилых людей с диабетом и ожирением страдают уже НАСГ и прогрессирующим фиброзом [1–3].

НАЖБП повышает смертность населения как за счет печеночных причин (ЦП, ГЦР), так и внепеченочных проявлений и осложнений (таких как МС, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), СД 2 и др.). Исходя из этого следует, что правильное ведение пациентов с НАЖБП может положительно повлиять на течение коморбидных состояний и наоборот. Это особенно важно, поскольку первичная причина смертности у пациентов с НАЖБП, в частности в отсутствие выраженного фиброза или цирроза, связана с ССЗ, а не с болезнью печени. Следовательно, НАЖБП — мультисистемное заболевание, которое требует соответствующего

ющего клинического подхода: скрининг, ранняя диагностика, лечение и профилактика повреждений печени и основных ассоциированных состояний [4].

В последние годы стали активно проводиться исследования, свидетельствующие о роли наследственных механизмов развития НАЖБП. Так, в частности, в ходе полномасштабных генетических исследований (GWAS, genome-wide association studies), проведенных на многонациональных когортах пациентов, установлена тесная связь между развитием НАЖБП и однонуклеотидными полиморфизмами (SNP, single nucleotide polymorphism) в некоторых генах. Одни из наиболее значимых ассоциаций были выявлены между наличием НАЖБП и/или НАСГ и наличием SNP в следующих генах: PNPLA3 (пататиноподобный домен, содержащий фосфолипазу-3; ген адипонутрина); TM6SF2 (трансмембранный белок 6 суперсемейства-2). Наиболее убедительные данные в различных популяциях получены об ассоциации полиморфизма rs738409 в гене PNPLA3 и rs58542926 гена TM6SF2 с прогрессирующим течением НАСГ (развитием стеатоза, фиброза и ГЦР) [5].

По данным молекулярно-генетических исследований ген PNPLA3, расположенный на длинном плече хромосомы 22q13.31, экспрессируется в мембранах гепатоцитов и отвечает за внутрипеченочный обмен липидов путем кодирования синтеза адипонутрина — белка-регулятора активности триглицеридлипазы в адипоцитах [2]. Исследование GWAS выявило также, что SNP в гене PNPLA3 ассоциированы с активностью печеночных ферментов — аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) в плазме. Вариант I148M (rs738409) в гене PNPLA3 приводит в замене цитозина на гуанин в ДНК, что в свою очередь вызывает замену аминокислоты изолейцин на метионин в позиции 148 адипонутрина и определяет дальнейшие изменения механизмов липидного обмена в печени [2]. Вариант I148M PNPLA3 (rs738409 C/G) устойчив к деградации, накапливается на липидных каплях и достаточен для индуцирования стеатоза. Аллель G rs738409 ассоциирована с усиленной аккумуляцией жира в печени и воспалением. Гомозиготный ген в варианте rs738409 GG свойствен пациентам с НАСГ. Генотип GG отмечается чаще и коррелирует с ИМТ и степенью фиброза у лиц с ГЦР, возникшим на фоне НАЖБП [4].

По данным Национального центра биотехнологической информации США (NCBI,

National Center for Biotechnological Information) частота аллеля G полиморфного варианта I148M гена PNPLA3 (rs738409) в различных популяциях колеблется от 19,6 % (африканская популяция AFD\_AFR\_PANEL ss24098326) до 43,2 % (азиатская популяция HarMap-JPT ss76896972).

TM6SF2 — ген с неизвестной биологической функцией локализуется на 19 хромосоме и кодирует белок, состоящий из 351 аминокислоты, имеющий 7–10 трансмембранных доменов. Ген TM6SF2 экспрессируется в клетках печени, тонкой кишки и почек. Продукт гена преимущественно локализуется в эндоплазматическом ретикулуме и промежуточном компартменте ретикулума и комплекса Гольджи. Мутация E167K гена TM6SF2, приводящая к замене глутамина на лизин в положении 167, вызывает снижение экспрессии на 46 %. Функциональные исследования продемонстрировали, что активность TM6SF2 играет ключевую роль в секреции липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и активности щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови [6].

Кроме того, было показано, что ингибирование TM6SF2 сопровождается значимым снижением экспрессии ряда других генов, играющих важную роль в синтезе триглицеридов (ТГ), и повышенным накоплением жировых включений в гепатоцитах. В целом мутация E167K гена TM6SF2 связана со снижением функции кодируемого им белка, что в свою очередь сопровождается повышением содержания ТГ в печени (за счет снижения секреции ЛПОНП), ростом активности ЩФ, снижением экспрессии генов, регулирующих метаболизм липидов, и каталитической активности стероловых изомераз [6].

Так, пациенты с аллелем T гена TM6SF2 rs58542926, предрасполагающим к развитию НАЖБП/НАСГ, имели более высокий уровень липополисахарид-связывающего белка (LBP, lipopolysaccharide binding protein — маркер эндотоксемии). У пациентов с НАЖБП уровни LBP и эндотоксина коррелировали со степенью долькового воспаления и фиброза, также с фрагментами цитокератина-18 и уровнем жесткости печени. По литературным данным выявленные мутации играют значимую этиологическую роль в развитии и прогрессировании НАЖБП в отдельных регионах России [5]. При этом распространенность полиморфизма rs738409 в гене PNPLA3 и rs58542926 в гене TM6SF2, ассоциированных с прогрессирующим течением НАСГ, до настоящего времени

среди населения Республики Беларусь не изучалась.

**Цель работы** — изучение распределения частот аллелей и поиск ассоциаций полиморфных вариантов гена PNPLA3 (rs738409) и гена TM6SF2 (rs58542926) среди населения Гомельской области.

**Материалы и методы.** Экспериментальная часть работ по генотипированию полиморфизмов rs738409 гена PNPLA3 и rs58542926 гена TM6SF2 была проведена в научно-исследовательской лаборатории УО «Гомельский государственный медицинский университет» (ГомГМУ). Для исследования использованы образцы ДНК пациентов с различными формами НАЖБП, обратившихся в профессорско-преподавательский консультативный центр, а также здоровых добровольцев. Выборка исследования включает 48 пациентов. В состав выборки вошли мужчины ( $n = 25$ ) и женщины ( $n = 23$ ) в возрасте от 22 до 70 лет, средний возраст  $47,2 \pm 1,23$  года. Группой сравнения служила выборка из 37 здоровых добровольцев — мужчин ( $n = 30$ ) и женщин ( $n = 7$ ) в возрасте от 21 до 63 лет, средний возраст  $38,1 \pm 0,78$  года. Все участники исследования постоянно проживают на территории Гомельской области. Информированное согласие на проведение генетического исследования было получено от каждого участника исследования. Научное исследование получило одобрение этического комитета УО «ГомГМУ».

Критериями включения в исследование были: отсутствие поражения печени хроническими вирусными гепатитами, аутоиммунного гепатита, первичного билиарного холангита, первичного склерозирующего холангита, наследственного гемохроматоза, болезни Вильсона — Коновалова, а также отсутствие злоупотребления алкоголем ( $>30$  г/л).

Всем участникам исследования проведено комплексное клинико-функциональное обследование для подтверждения диагноза и были исключены конкурирующие этиологические факторы и другие заболевания печени. Паци-

енты отрицали употребление алкоголя, алкогольные стигмы и лабораторные маркеры злоупотребления алкоголем (соотношение АСТ/АЛТ более 2, повышение активности гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП), макроцитоз эритроцитов) отсутствовали, опросники CAGE и AUDIT дали отрицательные результаты. Гепатотоксичных препаратов, в том числе средств народной и нетрадиционной медицины, биодобавок, в последние 6 месяцев все пациенты не использовали. Анализы на маркеры вирусных гепатитов В и С — отрицательные. Результаты иммунологического исследования позволили исключить аутоиммунные заболевания печени у данных пациентов. Полученные результаты при исследовании показателей обмена железа (ферритин, трансферрин, сывороточное железо) и меди (церулоплазмин) позволили исключить поражение печени как результата нарушений их метаболизма в организме пациентов. Также был исключен гипотиреоз: уровень тиреотропного гормона в сыворотке крови был в пределах референсных значений.

Взятие крови производили в вакуумную систему типа Vacuette с ЭДТА в соответствии со стандартной методикой. Лейкоциты для экстракции ДНК получали традиционным способом. Экстрагировали ДНК набором «АртРНК» (производитель «АртБиоТех», Беларусь) согласно инструкции. Синтез праймеров производился ОДО «Праймтех» (Беларусь по заказу).

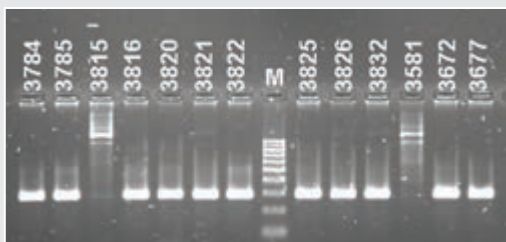
ПЦР проводили с 1 мкл ДНК в режиме амплификации с последующей электрофоретической детекцией ампликонов в 1,7 % агарозном геле.

На этапе рестрикции ампликоны, полученные с помощью праймеров PNPLA3, обрабатывались рестриктазой BstF5I (BseGI). Ампликоны, полученные с помощью праймеров TM6SF2, обрабатывались рестриктазой Hpy 188I. Объем ампликона в одном образце 6 мкл, рестриктазы 0,5 мкл. Условия инкубации, активность рестриктаз, производитель указаны в таблице 1.

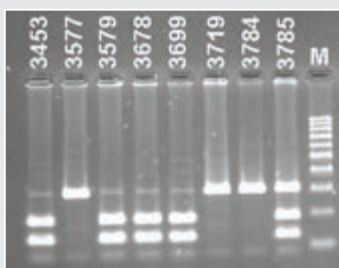
Таблица 1 — Описание рестриктаз BstF5I (BseGI), Hpy 188I

Рестриктаза	Активность, ед/мл	Температура инкубации, °С	Время инкубации, ч	Производитель
BstF5I (BseGI)	10	55	16	Thermo Fisher Scientific, Lithuania
Hpy 188I	10000	37	24	New England Biolabs, England

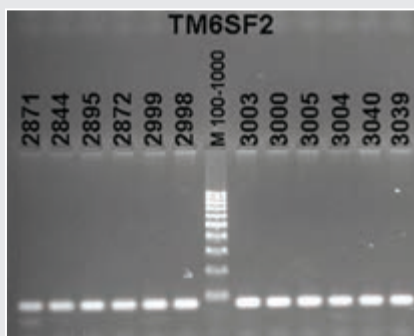




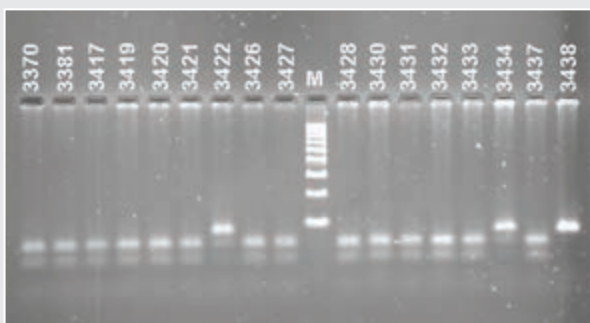
**Рисунок 1** — Электрофоретическая детекция фрагментов гена PNPLA3



**Рисунок 2** — Электрофоретическая детекция фрагментов гена PNPLA3 после обработки рестриктазой BstF5I (BseGI)



**Рисунок 3** — Электрофоретическая детекция фрагментов гена TM6SF2



**Рисунок 4** — Электрофоретическая детекция фрагментов гена TM6SF2 после обработки рестриктазой Hru 188I

Детекцию рестриктоов проводили при помощи электрофоретической разгонки в 2,5 % агарозном геле.

Ожидаемая зона после амплификации гена PNPLA3 — 333 п.н., как представлено на рисунке 1.

После обработки рестриктазой BstF5I (BseGI) могут визуализироваться три зоны размером 333, 200, 133 п.н. Образцы размером 333 п.н. соответствуют GG-генотипу, размером 200, 133 п.н. — CC-генотипу, размером 333, 200, 133 п.н. — GC-генотипу. Пример электрофореграммы рестриктоов представлен на рисунке 2.

Ожидаемая зона после амплификации гена TM6SF2 — 80 п.н., как представлено на рисунке 3.

После обработки рестриктазой Hru 188I визуализируются три зоны размером 80, 52, 28 п.н. Образцы размером 80 п.н. соответствуют TT-генотипу, размером 52, 28 п.н. — CC-генотипу, размером 80, 52, 28 п.н. — TC-генотипу. Пример электрофоретической детекции рестриктоов представлен на рисунке 4.

При статистическом описании результатов, встречаемость генотипов исследуемых полиморфизмов выражали в относительных частотах (%). Частотный анализ проводили с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона. Для слабонасыщенных показателей (со значениями  $\leq 5$ ), оценку значимости проводили с помощью рандомизированной процедуры Монте-Карло. Различия считали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного варианта гена PNPLA3 (rs738409) в исследуемой группе не выявил статистически значимых различий, при этом в группе здоровых добровольцев преобладал гомозиготный генотип CC (56,8 % участников), а частота встречаемости аллеля C составила 0,676. Однако статистически значимой разницы между двумя группами не установлено. При этом критерий хи-квадрат Пирсона для частоты встречаемости аллеля G гена PNPLA3 составил 3,28;  $p = 0,07$ , что может свидетельствовать о тенденции к статистически значимым различиям в частоте встречаемости данного аллеля. Частоты генотипов и аллелей полиморфизма rs738409 гена PNPLA3, а также расчет статистической значимости различий приведены в таблицах 2 и 3 соответственно.



Таблица 2 — Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма rs738409 гена PNPLA3

Показатель	Генотип, %				Аллель	
	GG	CC	GC	Всего	G	C
Группа исследования						
Количество пациентов, <i>n</i>	19	17	12	48	—	—
Ожидаемое количество, <i>n</i>	15,2	21,5	11,3	48,0	—	—
Стандартизованный остаток	1,0	-1,0	0,2	—	—	—
Процент в исследуемой группе	39,6	35,4	25,0	100	0,521	0,479
Контрольная группа						
Количество, <i>n</i>	8	21	8	37	—	—
Ожидаемое количество, <i>n</i>	11,8	16,5	8,7	37,0	—	—
Стандартизованный остаток	-1,1	1,1	-0,2	—	—	—
Процент в контрольной группе	21,6	56,8	21,6	100	0,324	0,676

Таблица 3 — Статистический анализ различий между группами для генотипов полиморфизма rs738409 гена PNPLA3

Показатель	Значение	Степень свободы	Асимптотическая значимость (двусторонняя)	Значимость Монте – Карло (двусторонняя)		
				Значимости	95%-й ДИ	
					Нижняя граница	Верхняя граница
Хи-квадрат Пирсона	4,352	2	0,114	0,117	0,109	0,126
Отношения правдоподобия	4,414	2	0,110	0,117	0,109	0,126
Точный критерий Фишера	4,289	—	—	0,117	0,109	0,126
Количество допустимых наблюдений	85	—	—	—	—	—

Анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного варианта гена TM6SF2 (rs58542926) в исследуемой группе продемонстрировал подавляющее преобладание генотипа CC (81,3 % участников) и аллеля C (0,907). В группе здоровых добровольцев также преобладал гомозиготный генотип CC (75,7 % участников),

а частота встречаемости аллеля C составила 0,856. При этом статистически значимой разницы между двумя группами также не установлено. Частоты генотипов и аллелей полиморфизма rs58542926 гена TM6SF2, а также расчет статистической значимости различий, приведены в таблице 4 и таблице 5 соответственно.

Таблица 4 — Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма rs58542926 гена TM6SF2

Показатель	Генотип, %				Аллель	
	CC	TC	TT	Всего	C	T
Группа исследования						
Количество, <i>n</i>	39	9	0	48	—	—
Ожидаемое количество, <i>n</i>	37,8	9,0	1,1	48,0	—	—
Стандартизованный остаток	0,2	0,0	-1,1	—	—	—
Процент в исследуемой группе	81,3	18,8	0,0	100,0	0,907	0,093
Контрольная группа						
Количество, <i>n</i>	28	7	2	37	—	—
Ожидаемое количество, <i>n</i>	29,2	7,0	0,9	37,0	—	—
Стандартизованный остаток	-0,2	0,0	1,2	—	—	—
Процент в контрольной группе	75,7	18,9	5,4	100,0	0,856	0,144

Таблица 5 — Статистический анализ различий между группами для генотипов полиморфизма rs58542926 гена TM6SF2

Показатель	Значение	Степень свободы	Асимптотическая значимость (двусторонняя)	Значимость Монте – Карло (двусторонняя)		
				Значимости	95%-й ДИ	
					Нижняя граница	Верхняя граница
Хи-квадрат Пирсона	2,677	2	0,262	0,393	0,381	0,406
Отношения правдоподобия	3,410	2	0,182	0,336	0,324	0,348
Точный критерий Фишера	2,306	—	—	0,393	0,381	0,406
Количество допустимых наблюдений	85	—	—	—	—	—

**Заключение.** Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что среди жителей Гомельской области при сравнительном анализе распределения аллелей полиморфизма rs738409 гена PNPLA3 и полиморфизма rs58542926 гена TM6SF2 преобладает носительство аллеля С, как в группе здоровых лиц, так и среди пациентов с НАЖБП. Вероятно, это обусловлено небольшой выборкой пациентов, что требует дальнейшего изучения. При этом в исследуемой группе отмечается тенденция к повышению, по сравнению с контрольной группой, частоты выявления аллеля GG (39,6 и 21,6 % соответственно)

гена PNPLA3, носительство которого характерно для пациентов с НАСГ. Предполагаем, что полиморфизм гена PNPLA3 I148M (rs738409) имеет значение для формирования неблагоприятного течения НАЖБП в популяции пациентов Гомельской области. Дальнейшее изучение на более крупных выборках пациентов с различными формами НАЖБП позволит уточнить эти данные и, возможно, разработать методы скрининга, позволяющие своевременно выявлять лиц с высоким риском неблагоприятного течения данного заболевания. Все это поможет в будущем внести вклад в развитие персонализированной медицины.

#### Список цитированных источников

1. From NAFLD to MAFLD: a «redefining» moment for fatty liver disease / K. I. Zheng [et al.] // Chin. Med. J. (Engl.). — 2020. — № 133. — P. 2271–2273.
2. Fasting, Nutrition and Weight Loss: An Approach to Refine Non-Alcoholic Fatty Liver Disease / G. A. Al-Samhari [et al.] // J. Nutr. Sci. Vitaminol. — 2021. — № 67. — P. 366–374.
3. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis / Z. Younossi [et al.] // Hepatology. — 2019. — № 69. — P. 2672–2682.
4. Национальный Консенсус для врачей по ведению взрослых пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени и ее основными коморбидными состояниями / М. В. Маевская [и др.] // Терапевтический архив. — 2022. — № 94(2). — С. 216–253.
5. Неалкогольная жировая болезнь печени у взрослых: клиника, диагностика, лечение. Рекомендации для терапевтов (3-я версия) / Л. Б. Лазебник [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2021. — № 185(1). — С. 4–52.
6. Effects of TM6SF2 E167K on hepatic lipid and very low-density lipoprotein metabolism in humans / J. Borjān [et al.] // J. Cl. Insight. — 2020. — № 5(24). — P. 144079.

## Identification of gene polymorphisms in non-alcoholic fatty liver disease in residents of the Gomel region

*Sukhanova L. L., Kalinin A. L., Yatsuk M. N.*

*Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus*

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common liver disorder worldwide. Genetic factors play a key role in the development of NAFLD. The study of polymorphism rs738409 of the PNPLA3 and rs58542926 of the TM6SF2 gene was carried out in the research laboratory of the Gomel

State Medical University. PCR-based assays were used to genotype the PNPLA3 and TM6SF2 variants. A total of 85 DNA samples were studied, of which 48 individuals with a history of NAFLD and 37 healthy volunteers. An analysis of the frequency of alleles rs738409 polymorphism of the PNPLA3 gene and rs58542926 polymorphism of the TM6SF2 gene found that the group of patients also prevails in relation to carriers of the C allele.

**Keywords:** polymorphism, TM6SF2, PNPLA3, NAFLD.

Поступила 22.06.2022

УДК 599.323.4:616.89

## ДИПЕПТИД Pro-Gly ОБЛЕГЧАЕТ АДАПТИВНУЮ РЕАКЦИЮ У КРЫС WISTAR, ПОДВЕРГШИХСЯ ДЕПРИВАЦИИ ПАРАДОКСАЛЬНОЙ ФАЗЫ СНА

Кравченко Е. В.<sup>1</sup>, Саванец О. Н.<sup>1</sup>, Бизунок Н. А.<sup>2</sup>, Дубовик Б. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup> Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** Проведено исследование влияния Pro-Gly на адаптивное поведение крыс Wistar в условиях депривации парадоксальной фазы сна (ДПФС). Крыс помещали поодиночке внутрь цилиндра, погруженного вертикально в воду. Задача животного состояла в том, чтобы найти выход из стрессовой ситуации, поднырнув под нижний край цилиндра, и выбраться на бортик бассейна. ДПФС препятствовала реализации адаптивной реакции избавления у лабораторных грызунов ( $p < 0,05$ ). Дипептид Pro-Gly оказывал статистически значимое нормализующее действие на адаптивное поведение грызунов (различия с контролем без ДПФС были статистически недостоверными,  $p > 0,05$ ). Применение Pro-Gly было более эффективным, когда дипептид применялся в режиме «профилактика» (непосредственно перед ДПФС, за сутки до оценки адаптивного поведения), нежели когда дипептид применялся после лишения парадоксальной фазы сна в той же парадигме.

**Ключевые слова:** парадоксальная фаза сна, крысы, дипептид Pro-Gly, адаптивное поведение.

**Введение.** Проблема управления поведением профессиональных спортсменов, сотрудников МЧС, военнослужащих в не поддающихся прогнозированию, неожиданно возникших ситуациях, на фоне недосыпания и экстремальных стрессовых воздействий относится к числу актуальных задач современной фармакологической науки. Поддержание «нормальных» биоритмов активности обеспечивает максимальную экономизацию ресурсов организма в постоянно меняющихся условиях внешней среды. Известно, что нейрогормон окситоцин регулирует циркадианные ритмы организма [1]. Ранее нами были выявлены выраженные хронотропные свойства у дипептидного фрагмента окситоцина Pro-Leu [2]. Дипептид Pro-Gly является структурным аналогом

Pro-Leu, при этом в Pro-Gly остаток лейцина заменен на конформационно важную аминокислоту глицин.

**Цель работы** — поиск высокоактивного соединения — дипептида, структурно родственного окситоцину, характеризующегося способностью облегчать адаптивную реакцию избавления из стрессовой ситуации у крыс Wistar, подвергшихся депривации парадоксальной фазы сна.

**Материалы и методы.** Хронофармакологическую активность Pro-Gly изучали в опытах на крысах самцах Wistar, содержащихся в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде в соответствии с требованиями Санитарных правил и норм 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и

содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Половозрелые аутбредные крысы Wistar были получены из питомника вивария Института биоорганической химии НАН Беларуси (сектор биоиспытаний). После доставки из сектора биоиспытаний крыс метили водостойким маркером, помещали группами по 4–7 особей в клетки размером 40×33,5×16,5 см.

Адаптивное поведение крыс исследовали в тесте экстраполяционного избавления (ТЭИ) следующим образом: крыс поодиночке помещали внутрь цилиндра, погруженного вертикально в воду на глубину 1–2,5 см. Задача животного состояла в том, чтобы за 120 с найти выход из стрессирующей ситуации, поднырнув под нижний край цилиндра, и выбраться на бортик бассейна по металлической сетке. Регистрировали число безуспешных попыток избавления ( $N$ ); время подныривания под край цилиндра ( $ЛП_{\text{подн}}$ ); время выхода по сетке ( $ЛП_{\text{вых}}$ ) [3]. Применение указанной методики позволяет осуществлять поиск фармакологических средств, повышающих способность к решению новых задач при первом их предъявлении (в отсутствие предварительного обучения и соответствующей наследственной программы, на основе активного овладения закономерностями окружающей среды).

Немедленно по окончании тестирования в ТЭИ осуществляли актометрию с целью выявления возможного стимулирующего либо седативного действия исследуемого соединения. Показатели горизонтальной (ГДА) и вертикальной (ВДА) двигательной активности регистрировались в отсутствие экспериментаторов автоматически в актометре с горизонтальными и вертикальными инфракрасными сенсорами «Универсал 22-32» (Республика Беларусь) на протяжении 3 мин при тестировании поодиночке [2]. Полученные данные выражали в условных единицах (усл. ед. — units), соответствующих числу пересечений лучей в горизонтальной (вертикальной) плоскости. Актометр «Универсал 22-32» — система экспериментальных установок, объединенных беспроводной сетью передачи данных, работающая под управлением ПЭВМ с использованием пакета программ Mouse Statistic; разрешение сетки сканирования — 12×8; шаг сетки — 2,54 см, периодичность съема информации — 0,1 с [2]. Боксы актометра размещались в отдельном помещении со свето- и звукоизоляцией, специально предназначенном для за-

писи биоритмов двигательной активности. Освещенность в помещении, где располагался актометр, поддерживалась с помощью шести потолочных ламп дневного света мощностью 36 Вт (SL 36/26-735, Россия). Учитывая стремление грызунов избегать открытых, неизвестных и потенциально опасных мест, актометрию проводили в небольшой камере, близкой по размеру к «домашней» клетке, обогащенной привычными элементами, — поилкой, кормушкой, подстилкой [2].

Исследования осуществляли в 2 этапа.

На этапе 1 (*серия 1*) животные контрольной группы К 1 до ТЭИ подвергались слабому стрессу «новизны», связанному с круглосуточным нахождением грызунов в незнакомом помещении. Крысам группы К 1 вводили растворитель — дистиллированную воду.

На этапе 1 (*серии 2 и 3*) до ТЭИ в качестве повреждающего фактора использовали 24-часовую ДПФС по D. Jouvet с соавт. [3], сопровождающуюся «острым» стрессом, индуцированным иммобилизацией и переохлаждением на протяжении 24 ч [3]. Грызунам контрольных групп К 2а и К 3а вводили внутрибрюшинно (в/б) растворитель, особям групп «Pro-Gly 2б» и «Pro-Gly 3б» применяли дипептид Pro-Gly (Sigma, США) в дозе 0,5 мг/кг, в/б. В *серии 2* растворитель или дипептид Pro-Gly назначали сразу после ДПФС, в *серии 3* — перед ДПФС.

Этап 2 включал актометрию с участием особей групп К 1, К 3а и «Pro-Gly 3б».

Анализ данных проводили с использованием общепринятых статистических методов и программного обеспечения Origin 6.1 (Origin Lab Corporation, США, 2000), Biostat 4.03 (Glantz S.A., 1998). При определении уровня статистической значимости различий в вариационных рядах использовали методы непараметрической статистики: для сравнения двух независимых выборок применяли критерий Манна — Уитни, зависимых — критерий Уилкоксона. При наличии трех и более групп использовали критерий Крускала — Уоллиса для независимых выборок или ранговый дисперсионный анализ Фридмана для зависимых выборок с последующей обработкой данных методом апостериорных сравнений по Данну. Для анализа качественных признаков был применен точный критерий Фишера.

**Результаты и их обсуждение.** Влияние Pro-Gly на реакцию избавления крыс Wistar, подвергшихся ДПФС, из стрессовой ситуации представлено на рисунках 1–3.

У животных контрольной группы 2а (введение растворителя непосредственно накануне тестирования в ТЭИ) не было выявлено статистически достоверных различий с грызунами контрольной группы 1 (не подвергшихся ДПФС) по всем исследованным показателям. Отсутствие существенных сдвигов объясняется «пробуждающим» эффектом, связанным с усилением эмоционально-поведенческой реактивности на фоне «инъекционного стресса» накануне помещения в экспериментальную установку. Назначение дипептида животным группы «Pro-Gly 2б» в тех же условиях не вызвало статистически значимого улучшения в осуществлении адаптивной реакции, что может объясняться отсутствием позитивных сдвигов под действием ноотропов в условиях нормы [4].

Вместе с тем в случае введения растворителя особям К 3а за сутки до тестирования в ТЭИ (до ДПФС) были отмечены статистически значимые нарушения адаптивного поведения (см. рисунки 1–3). В частности, у контрольных особей группы 3а имело место статистически достоверное повышение значений показателя ЛП<sub>подн</sub> в сравнении с таковым в К 1 — в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ) (рисунок 1, б). Отмечалась тенденция к увеличению показателей  $N$ , ЛП<sub>вых</sub> (рисунок 1, а; рисунок 2, а).

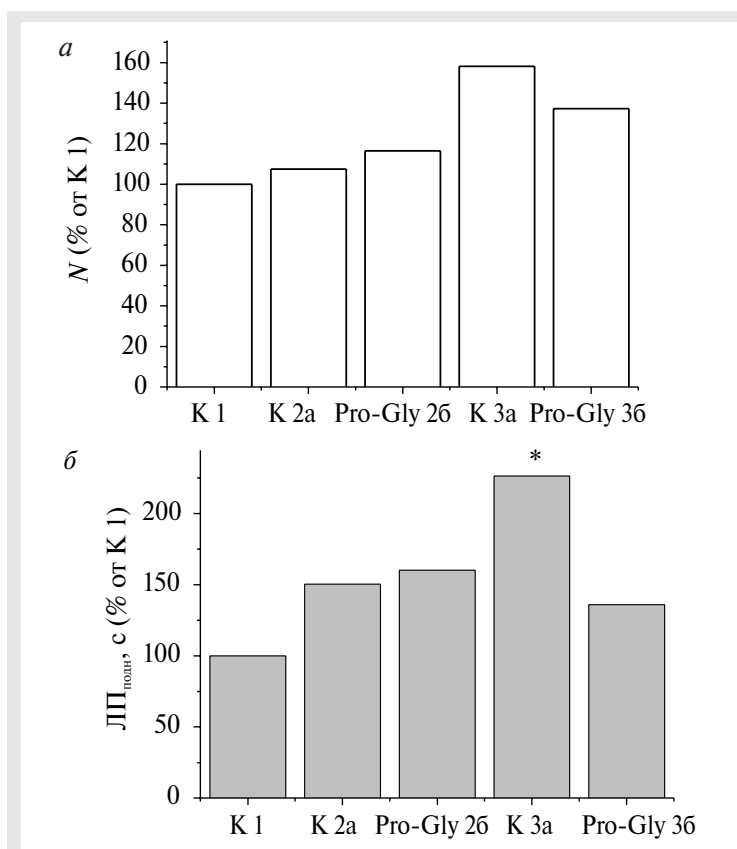


Рисунок 1 — Влияние Pro-Gly в дозе 0,5 мг/кг (в/б, однократно) на число безуспешных попыток избавления ( $N$ ) (а) и латентный период подныривания (ЛП<sub>подн</sub>) (б) в тесте экстраполяционного избавления у крыс Wistar, подвергшихся депривации парадоксальной фазы сна (\* Различия статистически значимы по сравнению с К 1, критерий Крускала — Уоллиса с последующей обработкой данных групп К 1, Pro-Gly 3а, Pro-Gly 3б методом апостериорных сравнений по критерию Данна,  $p < 0,05$ .)

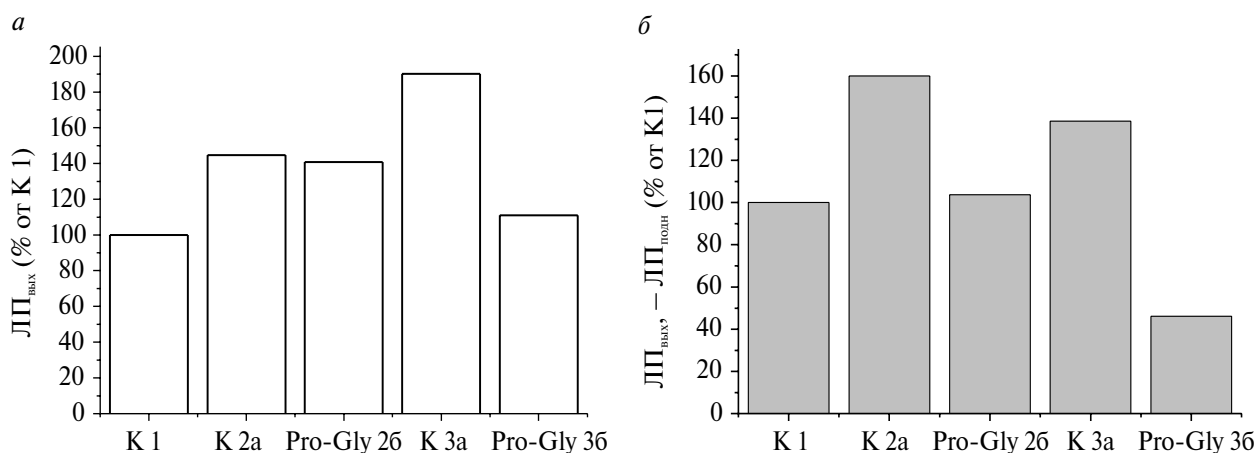


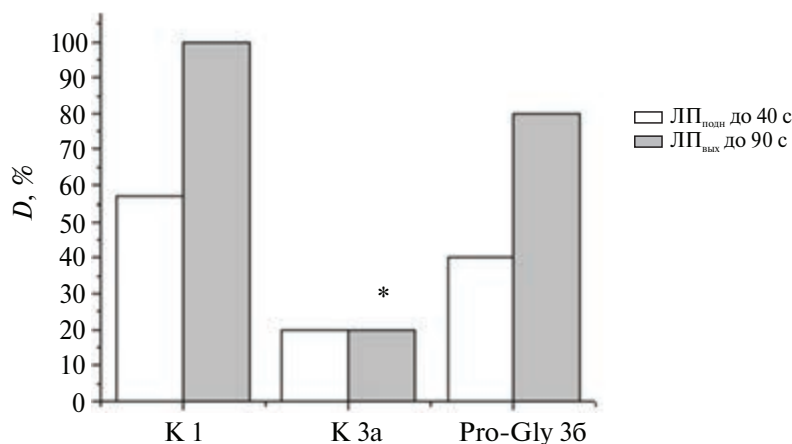
Рисунок 2 — Влияние Pro-Gly в дозе 0,5 мг/кг (в/б, однократно) на латентный период выхода на сетку (ЛП<sub>вых</sub>) (а) и интервал между подныриванием и выходом на сетку (б) в тесте экстраполяционного избавления у крыс Wistar, подвергшихся ДПФС



Кроме того, в К 3а в сравнении с К 1 выявлено резкое (на 80 %) снижение числа животных, способных быстро (до 90 с) осуществить реакцию подныривания и выбраться по сетке на бортик установки ( $p < 0,05$ ) (см. рисунок 3).

У животных группы Pro-Gly 3б, котрым дипептид назначали до ДПФС, статисти-

чески значимые различия с К 1 были нивелированы — значения ЛП<sub>подн</sub> и доля в популяции животных, быстро избавлявшихся из стрессовой ситуации, статистически значимо не отличались от уровня контроля в группе К 1 (без ДПФС) — (см. рисунок 1, б; рисунок 3).



**Рисунок 3 — Влияние Pro-Gly в дозе 0,5 мг/кг (в/б, однократно, перед ДПФС) на число животных, быстро решивших задачу избавления ( $D$  — доля животных с ЛП<sub>подн</sub> до 40 с или с ЛП<sub>вых</sub> до 90 с (%)); \* Различия статистически значимы по сравнению с группой 1, точный критерий Фишера,  $p = 0,01$ )**

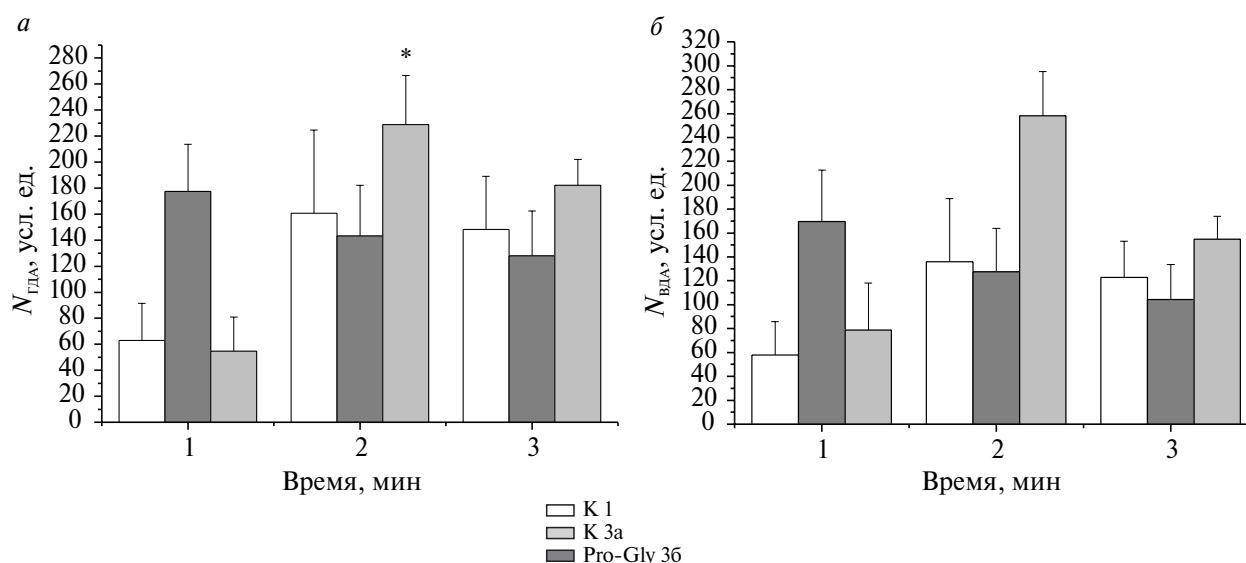
Таким образом, дезадаптация, вызванная «острым» десинхронозом, моделируемая посредством 24-часовой селективной депривации парадоксальной фазы сна, успешно подавлялась коррекцией Pro-Gly, применяемым накануне нарушений цикла «сон-бодрствование».

По данным научной литературы, введение соединений с дофамин-позитивным (L-ДОФА) действием [5], а также бензодиазепиновых транквилизаторов в сравнительно высоких дозах [6] вызывало нарушение адаптивной реакции в ТЭИ, что может объясняться в первом случае индукцией стереотипии (однообразная *climbing*-реакция — повторяющиеся попытки вскарабкивания вверх по гладкой стенке цилиндра, без поиска других вариантов избавления из стрессовой ситуации), а во втором случае — седативным эффектом.

Полученные нами в результате актометрии данные указывают на отсутствие угнетающего или статистически значимого стимулирующего действия соединения Pro-Gly на горизонтальную и вертикальную двигательную активность крыс Wistar группы «Pro-Gly 3б» в сравнении с таковой у особей с ненарушенным поведением (группа К 1) (рисунок 4, а, б).

В условиях «нормы» после помещения животного в актометр отмечают следующие изменения двигательной активности: в первую

минуту подвижность невысока в связи с «острым» стрессом «новизны», в последующем поведение животных характеризуется активным обследованием камеры актометра на протяжении 5–10 мин. У животных группы К 3а, подвергшихся ДПФС, выявлено нарушение «рисунка» подвижности — отсутствие стрессиндуцированного снижения ГДА и ВДА (по-видимому, вследствие неадекватного восприятия обстановки на фоне ДПФС). Известно, что многие авторы рассматривают депривацию парадоксальной фазы сна у крыс как животную модель мании в связи с наблюдающимися у экспериментальных животных поведенческими отклонениями, включая гиперактивность [7]. В условиях нашего исследования уровень подвижности (ГДА и ВДА) в первую минуту регистрации у особей группы К 3а превышал таковую в К 1 в 2,8–2,9 раза (см. рисунок 4, а, б). Кроме того, у особей К 3а отсутствовал подъем активности во вторую минуту актометрии (см. рисунки 4а, 4б). У животных группы Pro-Gly 3б на фоне введения дипептида «рисунок» актограммы соответствовал «норме» и повторял таковой в К 1 (см. рисунок 4, а, б). Активация ГДА в первую минуту наблюдения отсутствовала, а во вторую минуту уровень ГДА повышался ( $p < 0,05$ ) в сравнении с таковой в первую минуту наблюдения (см. рисунок 4, а).



**Рисунок 4 — Влияние Pro-Gly в дозе 0,5 мг/кг (в/б, однократно, перед ДПФС) на уровень горизонтальной (а) и вертикальной (б) активности крыс Wistar в условиях 3-минутной актометрии**

**Заключение.** Проведенные исследования продемонстрировали корректорное влияние Pro-Gly на адаптивное поведение крыс Wistar в условиях депривации парадоксальной фазы сна. ДПФС препятствовала реализации адаптивной реакции избавления у крыс Wistar (различия между контрольными группами К 1 и К 3а были статистически значимыми,  $p < 0,05$ ). Дипептид Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/б) оказывал статистически значимое нормализующее дей-

ствие на адаптивное поведение грызунов (различия между основной группой К 3б и контрольной группой К 1 были статистически недостоверными,  $p > 0,05$ ). Применение Pro-Gly было более эффективным, когда дипептид применялся в режиме «профилактики» (непосредственно перед ДПФС, за сутки до оценки адаптивного поведения), чем когда дипептид применялся после лишения парадоксальной фазы сна в той же парадигме.

#### Список цитированных источников

1. Zhang, G. Circadian intervention of obesity development via resting-stage feeding manipulation or oxytocin treatment / G. Zhang, D. Cai // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2011. — Vol. 301, № 5. — P. 1004–1012.
2. Кравченко, Е. В. Влияние изменений состояния нейромедиаторных и пептидергической систем мозга на циркадианные ритмы и поведение крыс / Е. В. Кравченко, Л. М. Ольгомец // *Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова.* — 2012. — Т. 62, № 4. — С. 453–464.
3. Воронина, Т. А. Методические указания по изучению снотворной активности фармакологических веществ / Т. А. Воронина, Л. Н. Неробкова ; под ред. В. П. Фисенко [и др.] // *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.* — М. : Минздрав РФ, ЗАО «ИИА «Ремедиум», 2000. — С. 131–137.
4. Действие фармакологических препаратов на синаптическую активность гиппокампа / В. Г. Скребицкий [и др.] // *Анналы неврологии.* — 2008. — Т. 2, № 2. — С. 23–26.
5. Бондаренко, Н.А. Избирательное влияние нейролептиков на дофаминзависимое нарушение поведения крыс в тесте экстраполяционного избавления / Н. А. Бондаренко // *Бюл. эксперим. биол. и медицины.* — 1990. — № 11. — С. 506–508.
6. Савченко, Н. М. Нормализация адаптивной реакции избавления у крыс веществами с ноотропной активностью / Н. М. Савченко, Р. У. Островская, Ю. В. Буров // *Бюл. эксперим. биол. и медицины.* — 1988. — № 8. — С. 170–172.
7. Young, J. W. Predictive animal models of mania: hits, misses and future directions / J. W. Young, B. L. Henry, M. A. Geyer // *Br. J. Pharmacol.* — 2011. — Vol. 164, № 4. — P. 1263–1284.

## Dipeptide Pro-Gly facilitates the adaptive response of wistar rats subjected to deprivation of the paradoxical sleep phase

*Kravchenko E. V.<sup>1</sup>, Savanets O. N.<sup>1</sup>, Bizunok N. A.<sup>2</sup>, Dubovik B. V.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> State Scientific Institution «Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus», Minsk, Republic of Belarus;

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

To study of the effect of Pro-Gly on the adaptive behavior of rats in conditions of deprivation of the paradoxical sleep (DPS), was studied as follows: rats were placed singly inside a cylinder immersed vertically in water. The task of the animal was to find a way out of a stressful situation, diving under the bottom edge of the cylinder, and get out on the side. DPS in Wistar rats prevented the implementation of an adaptive response of disposal (differences between control groups 1 and 3a were statistically significant,  $p < 0.05$ ), and Pro-Gly contributed to the normalization of adaptive behavior (differences between the main group 3b and control group 1 were insignificant,  $p > 0.05$ ). The use of Pro-Gly was more effective when dipeptide was used in the “prevention” mode (immediately before DPS, a day before the assessment of adaptive behavior) than when dipeptide was applied after deprivation of the paradoxical sleep phase in the same paradigm.

**Keywords:** paradoxical sleep, rat, dipeptide Pro-Gly, adaptive behavior.

Поступила 13.06.2022

УДК 612.591.06:577.152.344

## ЗНАЧИМОСТЬ АКТИВНОСТИ $\alpha_1$ -АНТИТРИПСИНА КРОВИ В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ, МЕХАНИЗМАХ ПОДДЕРЖАНИЯ ТЕМПЕРАТУРНОГО ГОМЕОСТАЗА И ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА ПРИ ПЕРЕГРЕВАНИИ

*Висмонт Ф. И., Жадан С. А., Висмонт А. Ф., Шуст Л. Г., Ткаченко Н. В., Яковлев Ф. Д., Абакумова Т. В.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Известно, что печень играет важную роль в образовании и деградации физиологически активных веществ белковой и пептидной природы, участвующих в жизнедеятельности организма в норме и при патологии. Однако участие ингибиторов протеиназ, синтезируемых печенью, в процессах детоксикации, формирования тиреоидного статуса и терморегуляции при перегревании до сих пор остается не изученным.

Цель исследования заключалась в выяснении значения активности  $\alpha_1$ -антитрипсина крови в процессах детоксикации, поддержания температуры тела и формирования тиреоидного статуса у крыс при перегревании.

Опыты выполнены на ненаркотизированных белых крысах-самцах массой 160–200 г. Перегревание животных осуществляли в суховоздушной термокамере (40–42 °С). Определение активности  $\alpha_1$ -антитрипсина ( $\alpha_1$ -АТ) в плазме крови проводили по методу И. Ю. Карягиной и соавт. (1990). О процессах детоксикации судили по продолжительности наркотического сна, содержания в плазме крови «средних молекул» и степени токсичности крови. Уровень в плазме крови тиреотропного гормона (ТТГ), общего трийодтиронина ( $T_3$ ) и тетрайодтиронина ( $T_4$ ) определяли радиоиммунным методом с помощью тест-наборов УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси». Ректальную температуру из-

меряли с помощью электротермометра ТПЭМ-1. Полученные данные обработаны методами вариационной биологической статистики с помощью критерия Стьюдента.

В опытах на крысах установлено, что перегревание животных, приводящее к повышению температуры тела, сопровождается угнетением процессов детоксикации, снижением активности  $\alpha_1$ -АТ и содержание трийодтиронина, а также тиреотропного гормона в плазме крови. Введение в кровотоки  $\alpha_1$ -АТ в дозе 20 мг/кг вызывает у животных повышение температуры тела, активности детоксикационной функции печени и системы гипофиз-щитовидная железа. Введенный перед перегреванием в кровотоки животным  $\alpha_1$ -антитрипсин в этой дозе ослабляет характерные для действия на организм высокой внешней температуры изменения в процессах детоксикации и содержания трийодтиронина в крови и способствует развитию гипертермии.

Активность  $\alpha_1$ -антитрипсина крови имеет значение в процессах детоксикации, формирования тиреоидного статуса и поддержания температурного гомеостаза у крыс при перегревании.

**Ключевые слова:**  $\alpha_1$ -антитрипсин, трийодтиронин, детоксикация, температура тела, перегревание.

**Введение.** Известно, что печень играет важную роль в образовании и деградации физиологически активных веществ белковой и пептидной природы, участвующих в развитии защитно-приспособительных реакций организма, определяющих резистентность к факторам среды обитания. Показано, что от функционального состояния печени зависит активность процессов дейодирования йодсодержащих гормонов щитовидной железы [1], имеющих особое значение в терморегуляции [2]. Выявлена тесная взаимосвязь между функциональной активностью терморегуляторных структур мозга и уровнем в крови «белков острой фазы» [3, 4], во многом синтезируемых гепатоцитами. Получены доказательства роли детоксикационной функции печени и ингибиторов протеиназ в механизмах формирования терморегуляторных реакций организма на действие бактериальных эндотоксинов [3]. Однако участие ингибиторов протеиназ, синтезируемых печенью, в механизмах терморегуляции при перегревании до сих пор остается неизученным. Исследования по выяснению их роли в формировании тиреоидного статуса организма вообще не проводились.

**Цель работы** — выяснение значения активности  $\alpha_1$ -антитрипсина крови в процессах детоксикации, поддержания температуры тела и формирования тиреоидного статуса у крыс при перегревании.

**Материалы и методы.** Опыты выполнены на ненаркотизированных белых крысах обоего пола массой 160–200 г. Перегревание животных осуществляли в суховоздушной термокамере (40–12 °С). Экспериментальный гипотиреоз у животных воспроизводили с помощью тиреостатика мерказолила (НПО «Укрмедпрепараты», Украина), который в дозе 25 мг/кг на 1%-м крахмальном растворе вводили ежедневно интрагастрально в течение 20 дней. Для создания модели гипертиреоза использовали син-

тетический препарат трийодтиронина гидрохлорид (Liothyronin, Berlin Chemi, Германия), который на 1%-м крахмальном растворе вводили животным интрагастрально в течение 20 дней в дозе 30 мкг/кг. Острое токсическое поражение печени вызывали однократным интрагастральным введением животным масляного раствора (1:1)  $CCl_4$  (из расчета 4,0 мл/кг веса). Определение активности  $\alpha_1$ -антитрипсина ( $\alpha_1$ -АТ) и  $\alpha_2$ -макроглобулина ( $\alpha_2$ -МГ), а также трипсинподобной протеолитической активности в плазме крови проводили по методу И. Ю. Карягиной и соавт. [5]. О детоксикационной функции печени, степени эндогенной интоксикации судили по продолжительности наркотического сна (ПНС), содержанию в плазме крови фракции «средних молекул» (СМ) и степени ее токсичности (СТК). Содержание СМ определяли методом, разработанным В. М. Мойным и соавт. (1989). СТК оценивали способом, предложенным О. А. Радьковой и соавт. (1985). О ПНС у крыс (гексенал 100 мг/кг, внутривенно) судили по времени нахождения животных в боковом положении. Определение концентрации альбумина в крови проводили колориметрическим методом [6]. Уровень тиреотропного (ТТГ) и йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови оценивали радиоиммунным методом с помощью тест-наборов (производство УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси») соответственно. Ректальную температуру у животных измеряли с помощью электротермометра ТПЭМ-1. Все полученные данные обработаны методами вариационной биологической статистики с помощью критерия Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** В опытах на крысах установлено, что перегревание сопровождается у животных изменениями температуры тела, активности системы гипофиз-щитовидная железа, ингибиторов протеиназ в плазме крови и детоксикационной функции



печени. Перегревание крыс ( $n = 12$ ) приводило к повышению ректальной температуры на 1,5, 2,1 и 2,4 °C ( $p < 0,05$ ) через 15, 30 и 60 мин от начала теплового воздействия. Опыты показали, что перегревание крыс в термокамере в течение 30 и 60 мин одновременно с повышением ректальной температуры проявляется у животных уменьшением в плазме крови концентрации альбумина, снижением трипсин-подобной протеолитической активности (ТПА), активности  $\alpha_1$ -антитрипсина, но не  $\alpha_2$ -макроглобулина. Изменения указанных показателей у крыс ( $n = 10$ ) протекали в условиях повышения значений гематокрита (на 15 и 36 % через 30 и 60 мин теплового воздействия). Установлено, что перегревание через 60 мин от момента воздействия высокой внешней температуры вызывает снижение содержания альбумина, активности ТПА и  $\alpha_1$ -АТ в плазме крови у крыс на 15,0 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ), 63,6 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) и 22,1 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) соответственно. Уровень альбумина, ТПА и активность  $\alpha_1$ -АТ в плазме крови у крыс ( $n = 8$ ) в контроле составляли соответственно  $24,0 \pm 0,35$  г/л,  $416,7 \pm 66,2$  нМоль/с л и  $21,7 \pm 1,5$  мкМоль/с л. Перегревание животных в течение 30 мин не сопровождалось достоверными изменениями активности  $\alpha_1$ -АТ и ТПА, а также уровня альбумина в плазме крови. В условиях перегревания (60 мин) в плазме крови у крыс ( $n = 7$ ) возрастало на 69,1 % ( $p < 0,05$ ) концентрация СМ. Развитие гипертермии сопровождалось повышением СТК, которое через 30 и 60 мин от начала перегревания составляло 16,1 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) и 27,4 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ) соответственно. ПНС у крыс, перенесших перегревание (60 мин), повышалось на 12 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) и составляла  $30 \pm 2,5$  мин.

Установлено, что в условиях гипертермии у животных снижается содержание трийодтиронина ( $T_3$ ) и ТТГ в плазме крови. Воздействие высокой внешней температуры (30 и 60 мин) приводило у крыс ( $n = 7$ ) к понижению уровня ТТГ на 21,1 % ( $p < 0,05$ ) и 17,4 % ( $p < 0,05$ ) и концентрации  $T_3$  на 35,0 % ( $p < 0,05$ ) и 38,5 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Концентрация  $T_4$  понижалась на 20,0 % ( $p < 0,05$ ) через 30 мин перегревания, а затем к 60 мин возвращалась к исходному значению. Содержание ТТГ,  $T_3$  и  $T_4$  в плазме крови у животных контрольной группы ( $n = 7$ ) составляло  $1,6 \pm 0,18$  мМЕ/л,  $1,4 \pm 0,15$  нМоль/л и  $53,2 \pm 3,41$  нМоль/л соответственно.

Выявлено, что в условиях поражения печени  $CCl_4$  у крыс снижается активность

$\alpha_1$ -антитрипсина в плазме крови, угнетается тиреотропная функция гипофиза, процессы детоксикации и понижается ректальная температура. Так, через 12, 24 и 48 ч после введения раствора  $CCl_4$  ректальная температура у крыс ( $n = 9$ ) понижалась на  $0,9 \pm 0,12$ ,  $1,2 \pm 0,13$  и  $1,8 \pm 0,14$  °C ( $p < 0,05$ ). Развитие гипотермии у животных, через 24 ч после затравки животных  $CCl_4$ , сопровождалось снижением в плазме крови активности  $\alpha_1$ -АТ на 30,8 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ). Активность  $\alpha_2$ -макроглобулина в крови в этих условиях достоверно не изменялась. Интрагастральное введение животным раствора  $CCl_4$  приводило к повышению в плазме крови уровня СМ и СТК. Концентрация СМ, через 12 и 24 ч от момента затравки животных  $CCl_4$ , повышалась на 24,5 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) и 30,1 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ). В этих условиях СТК была выше у опытных крыс по сравнению с таковыми в контроле на 32,8 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) и 52,2 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) соответственно. ПНС через 12 и 24 ч после введения  $CCl_4$  возрастала по сравнению с животными, которым вводили интрагастрально подсолнечное масло на 23,7 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) и 20,7 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ) соответственно. Поражение печени  $CCl_4$  у крыс ( $n = 7$ ) сопровождалось через 24 ч после введения животным гепатотропного яда снижением в плазме крови уровня  $T_3$  на 43,4 % ( $p < 0,05$ ),  $T_4$  на 42,1 % ( $p < 0,05$ ) и ТТГ — на 29,3 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (интрагастральное введение подсолнечного масла).

Обнаружено, что введение в кровотоки  $\alpha_1$ -АТ вызывает у животных повышение температуры тела, активности системы гипофиз-щитовидная железа и процессов детоксикации. Так, внутривенное введение (в боковую вену хвоста) крысам  $\alpha_1$ -АТ в дозе 20 и 10 мг/кг вызывало повышение ректальной температуры соответственно на 1,0 °C ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) и 0,9 °C ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ), 0,6 °C ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) и 0,5 °C ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) через 60 и 120 мин после инъекции препарата (рисунок). Длительность гипертермии составляла 3–4 ч. Введение в кровотоки  $\alpha_1$ -АТ в дозе 1 и 5 мг/кг не оказывало влияния на температуру тела.

Опыты показали, что действие в организме животных  $\alpha_1$ -АТ сопровождается значительными изменениями не только температуры тела, но и детоксикационной функции печени. Так, развитие гипертермии у крыс через 120 мин после введения в кровотоки животным  $\alpha_1$ -АТ (20 мг/кг) сопровождалось снижением СТК и содержания СМ в плазме крови, а также приводило к сокращению ПНС. ПНС у

крыс в условиях системного действия  $\alpha_1$ -АТ (через 120 мин после инъекции ингибитора протеиназ в кровотоки) уменьшалась на 20,2 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) и составляла  $21 \pm 3,5$  мин.

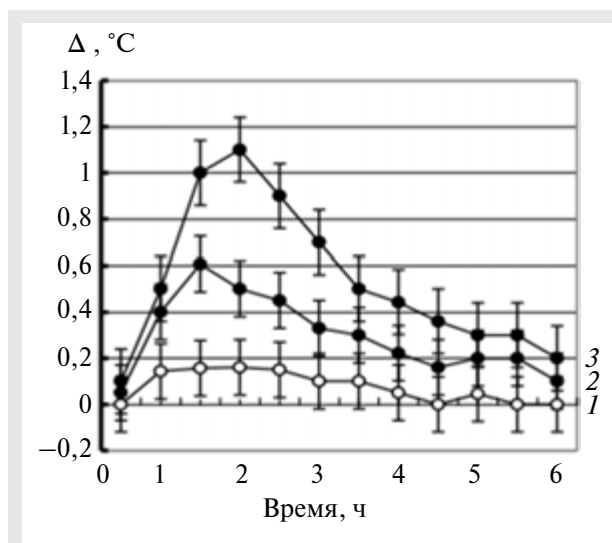
Действие  $\alpha_1$ -АТ в организме у крыс через 60 и 120 мин после введения в кровотоки приводило к повышению уровня ТТГ на 33,3 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) и 40,6 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) по сравнению с контролем. В этих условиях у крыс концентрация  $T_3$  в плазме крови возрастала на 81,8 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) и 56,3 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ), а содержание  $T_4$  снижалось на 28,3 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) только на 60 мин действия ингибитора.

Установлено, что введенный перед перегреванием в кровотоки животным ( $n = 6$ )  $\alpha_1$ -антитрипсин в дозе 20 мг/кг ослабляет характерные для действия на организм высокой внешней температуры изменения в процессах детоксикации и содержания тиреоидных гормонов в крови и способствует развитию гипертермии.

В опытах на крысах установлено, что предварительное введение (за 30 мин до начала перегревания) в кровотоки  $\alpha_1$ -АТ (20 мг/кг) предупреждало уменьшение концентрации  $T_4$  и ослабляло понижение уровней  $T_3$  и ТТГ в крови животных при действии высокой внешней температуры. Так, концентрация  $T_3$  в плазме крови крыс, подвергшихся перегреванию (60 мин) в условиях системного действия  $\alpha_1$ -АТ, составляла  $1,7 \pm 0,14$  нМоль/л ( $n = 8$ ), а в контроле (внутривенное введение физраствора и пребывание в термокамере при температуре воздуха 40–42 °С в течение 60 мин) —  $0,8 \pm 0,02$  нМоль/л ( $n = 7$ ). Уровни  $T_3$ ,  $T_4$  и ТТГ в плазме крови при гипертермии у крыс, предварительно до перегревания получивших  $\alpha_1$ -АТ (20 мг/кг), по сравнению с уровнем в контрольной группе животных ( $K_3$ ) были выше на 112,5 % ( $p < 0,05$ ), 32,9 % ( $p < 0,05$ ) и 56,5 % ( $p < 0,05$ ) соответственно.

У крыс, предварительно получивших  $\alpha_1$ -АТ (20 мг/кг), отмечалось понижение, по сравнению с животными контрольной группы (перегревание в течение 60 мин животных, получивших физраствор внутривенно), содержания в плазме крови СМ на 24,5 % ( $n = 7$ ). СТК у опытных крыс по сравнению с животными контрольной группы была ниже на 37,1 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ).

Результаты выполненных исследований дали основание полагать, что тиреоидный статус организма, состояние печени, ее детоксикационной функции имеет важное значение для поддержания температурного гомеостаза



**Рисунок — Изменение температуры тела у крыс после введения в кровотоки  $\alpha_1$ -антитрипсина: 1 — контроль (физраствор,  $n = 10$ ); 2 —  $\alpha_1$ -антитрипсин в дозе 10 мг/кг ( $n = 8$ ); 3 —  $\alpha_1$ -антитрипсин в дозе 20 мг/кг ( $n = 8$ ),  $n$  — количество животных**

при перегревании. Подтверждение было получено в экспериментах на животных с гипотиреозом.

Как показали опыты, перегревание животных с гиподисфункцией щитовидной железы приводит, по сравнению с интактными животными, к менее значительному повышению температуры тела и меньшей скорости развития гипертермии. Кратковременное перегревание гипотиреоидных крыс ( $n = 8$ ) в термокамере (40–42 °С), приводящее к повышению ректальной температуры на 1,2, 2,0 и 2,6 °С через 15, 30 и 60 мин от начала температурного воздействия, сопровождалось и более значительным снижением уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови. У крыс с экспериментальным гипотиреозом действие температурного фактора в течение 60 мин сопровождалось снижением в плазме крови по сравнению с уровнем гормонов в крови животных контрольной группы (действие одного тиреостатика) уровней  $T_3$  и  $T_4$  на 50,0 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) и 27,0 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ) и составляли  $0,4 \pm 0,08$  нМоль/л ( $n = 8$ ) и  $12,5 \pm 1,07$  нМоль/л соответственно.

Перегревание гипотиреоидных животных ( $n = 8$ ) сопровождалось менее значительным снижением содержания альбумина в плазме крови. Так, если перегревание эутиреоидных

крыс ( $n = 7$ ) в течение 60 мин приводило к снижению концентрации альбумина в плазме крови на 12,1 % ( $p < 0,05$ ), то у гипотиреоидных животных содержание альбумина в крови было уже на уровне значений в контрольной группе —  $K_2$  (интрагастральное ежедневное введение в течение 20 дней 1%-го крахмального рас-

створа и пребывание в термокамере при температуре воздуха 20–22 °С в течение 60 мин).

Активность  $\alpha_1$ -АТ плазмы крови при этом была ниже значений у животных в контроле —  $K_3$  (перегревание эутиреоидных животных) на 16,0 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ). ТПА в этих условиях достоверно не изменялась (таблица 1).

Таблица 1 — Изменение трипсинподобной активности, активности  $\alpha_1$ -антитрипсина плазмы крови и температуры тела под влиянием 60 мин перегревания у гипотиреоидных крыс ( $\bar{X}_s \pm x_s$ )

Группа животных	$\alpha_1$ -АТ, мкМоль/л·с	ТПА, нМоль/л·с	Температура тела, °С
Контрольная $K_1$ 1. Интактные ( $n = 7$ )	21,7 ± 1,5	416,7 ± 66,2	37,0 ± 0,1
Контрольная $K_2$ 2. 1%-й крахмальный раствор и/г ежедневно 20 дней + термокамера (20–22 °С) 60 мин ( $n = 7$ )	23,3 ± 1,7	451,6 ± 60,4	37,3 ± 0,1
Контрольная $K_3$ 3. 1%-й крахмальный раствор и/г ежедневно 20 дней + термокамера (40–42 °С) 60 мин ( $n = 7$ )	18,1 ± 0,7	238,4 ± 41,2	40,2 ± 0,1
Контрольная $K_4$ 4. Мерказолил (25 мг/кг) и/г ежедневно 20 дней + термокамера (20–22 °С) 60 мин ( $n = 8$ )	19,8 ± 1,4	245,7 ± 58,4	36,4 ± 0,1
Опытная 5. Мерказолил (25 мг/кг) и/г ежедневно 20 дней + термокамера (40–42 °С) 60 мин ( $n = 8$ )	14,5 ± 0,6 $p_{5-3} < 0,05$ $p_{5-4} < 0,05$	205,1 ± 37,4 $p_{5-3} > 0,05$ $p_{5-4} > 0,05$	39,4 ± 0,1 $p_{5-3} < 0,001$ $p_{5-4} < 0,001$

Примечание —  $n$  — количество животных.

Выявлено, что действие высокой внешней температуры у гипотиреоидных крыс ( $n = 8$ ) достоверно не сказывается по сравнению с животными в контроле (перегревание эутиреоидных животных) на содержании СМ и СТК, а также на уровне АсАТ и АлАТ в плазме крови. Активность АлАТ и АсАТ плазмы крови у крыс с экспериментальным гипотиреозом после 60 мин перегревания составляла  $17,0 \pm 1,46$  и  $29,2 \pm 3,63$  ед. Кармена соответственно.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что перегревание гипотиреоидных животных сопровождается более значительным снижением активности  $\alpha_1$ -АТ, уровня  $T_3$  и  $T_4$  в плазме крови и меньшей скоростью повышения температуры тела.

Как показали опыты, ежедневное в течение 20 дней интрагастральное введение крысам синтетического гормона трийодтиронина гидрохлорида (30 мкг/кг) приводит к снижению у животных содержания альбумина, а также к повышению ТПА, активности  $\alpha_1$ -АТ в плазме крови, детоксикационной функции печени и температуры тела. Перегревание гипертиреоидных животных ( $n = 8$ ) приводило, по сравне-

нию с животными контрольной группы —  $K_3$  (ежедневное интрагастральное введение в течение 20 дней 1%-го крахмального раствора), к более высоким значениям температуры тела (ректальная температура через 60 мин теплового воздействия достигала значения  $41,2 \pm 0,10$  °С). ТПА и активность  $\alpha_1$ -АТ плазмы крови при этом была выше значений у животных в контроле (перегревание эутиреоидных крыс) на 122,9 % ( $p < 0,05$ ) и 69,6 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Изменение трипсинподобной активности, активности  $\alpha_1$ -АТ плазмы крови и температуры тела под влиянием 60 мин перегревания у гипертиреоидных крыс представлены в таблице 2.

Выявлено, что перегревание (60 мин) у гипертиреоидных крыс сопровождается менее значимым повышением содержания в плазме крови СМ, а также токсичности плазмы крови. Так, если развитие гипертермии у эутиреоидных крыс через 60 мин воздействия высокой внешней температуры сопровождается повышением на 53,1 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) содержания СМ и на 26,7 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) СТК по сравнению с животными контрольной группы —  $K_2$

(ежедневное интрагастральное введение в течение 20 дней 1%-го крахмального раствора и нахождение в течение 60 мин в условиях термокамеры при 20–22 °С), то у гипертиреоидных животных это повышение составляло 29,2 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) и 15,5 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) соответственно. Обнаружено, что перегревание гипертиреоидных крыс ( $n = 7$ ) в течение 60 мин вызывало повышение в плазме крови животных уровня АлАТ и АсАТ на 61,4 % и 42,7 %, а у эутиреоидных животных ( $n = 8$ ) в контроле на 36,1 % и 25,0 % соответственно. Активность АлАТ и АсАТ плазмы крови у животных контрольной группы —  $K_2$  составляла  $14,7 \pm 1,23$

и  $31,2 \pm 2,91$  ед. Кармена соответственно. Более значительное повышение уровня АлАТ и АсАТ в плазме крови — важнейших показателей тяжести поражения печени у гипертиреоидных крыс под влиянием высокой внешней температуры по сравнению с эутиреоидными животными дает основание полагать, что при перегревании животных с гипертиреозом имеет место повреждение печени, что может иметь важное значение для понимания механизмов терморезистентности, характера формирования терморегуляторных реакций, их пластического обеспечения в условиях гипертермии.

Таблица 2 — Изменение активности  $\alpha_1$ -антитрипсина, трипсинподобной активности плазмы крови температуры тела под влиянием 60 мин перегревания у гипертиреоидных крыс ( $\bar{X}_s \pm x_s$ )

Группа животных	$\alpha_1$ -АТ, мкМоль/л·с	ТПА, нМоль/л·с	Температура тела, °С
Контрольная $K_1$ 1. Интактные ( $n = 7$ )	$21,7 \pm 1,5$	$416,7 \pm 66,2$	$37,0 \pm 0,1$
Контрольная $K_2$ 2. 1%-й крахмальный раствор и/г ежедневно 20 дней + термокамера (20–22 °С) 60 мин ( $n = 7$ )	$23,3 \pm 1,6$	$451,6 \pm 70,4$	$37,2 \pm 0,1$
Контрольная $K_3$ 3. 1%-й крахмальный раствор и/г ежедневно 20 дней + термокамера (40–42 °С) 60 мин ( $n = 7$ )	$18,1 \pm 1,4$	$238,4 \pm 41,2$	$40,1 \pm 0,1$
Контрольная $K_4$ 4. $T_3$ (30 мкг/кг) и/г ежедневно 20 дней + термокамера (20–22 °С) 60 мин ( $n = 8$ )	$31,2 \pm 1,9$	$637,3 \pm 81,5$	$37,8 \pm 0,1$
Опытная 5. $T_3$ (30 мкг/кг) и/г ежедневно 20 дней + термокамера (40–42 °С) 60 мин ( $n = 8$ )	$30,7 \pm 2,1$ $p_{5-3} < 0,05$ $p_{5-4} > 0,05$	$531,4 \pm 88,6$ $p_{5-3} < 0,05$ $p_{5-4} > 0,05$	$41,3 \pm 0,1$ $p_{5-3} < 0,05$ $p_{5-4} < 0,001$

Примечание —  $n$  — количество животных.

В последующих исследованиях было выявлено, что поражение печени  $CCl_4$  приводит к снижению тепловой устойчивости животных к перегреванию. опыты показали, что время достижения ректальной температуры у крыс 42 °С под влиянием высокой внешней температуры (40–42 °С) и время наступления гибели животных, затравленных  $CCl_4$ , значительно меньше, чем в контрольной группе (интрагастральное введение подсолнечного масла). Время жизни животных в опыте ( $n = 9$ ) и контроле ( $n = 7$ ) составляло соответственно  $65 \pm 8,1$  и  $97 \pm 8,4$  мин. Установлено, что перегревание (30 мин) в условиях предварительной (за 24 ч) затравки животных  $CCl_4$  не только усугубляет эндотоксинемию и приводит к более выраженной гипертермии, но и сопровождается менее

значительным снижением концентрации  $T_3$  в плазме крови.

Следовательно, выявленные не известные ранее особенности изменения уровня  $T_3$  в крови при перегревании в условиях предварительного введения в организм  $\alpha_1$ -АТ позволяет рассматривать активность  $\alpha_1$ -АТ и уровень  $T_3$  в крови, как важные факторы поддержания температурного гомеостаза организма.

**Заключение.** На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. В развитии сдвигов в эффекторных процессах и гормональных механизмах регуляции температуры тела при перегревании, характеризующихся понижением детоксикационной



функции печени и активности системы гипофиз-щитовидная железа важная роль принадлежит снижению активности  $\alpha_1$ -антитрипсина в плазме крови.

2. Активность  $\alpha_1$ -антитрипсина крови имеет значение в процессах детоксикации, формирования тиреоидного статуса и поддержания температуры тела у крыс при перегревании.

#### Список цитированных источников

1. Kelly, G. S. Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review / G. S. Kelly // *Altern. Med. Rev.* — 2000. — № 4. — P. 306–333.
2. Clark, W. G. Brain and pituitary peptides in thermoregulation / W. G. Clark, J. M. Lipton // *Pharmacol. Ther.* — 1983. — Vol. 22, № 1. — P. 249–297.
3. Висмонт, Ф. И. Эндотоксинемия, дисрегуляция и формирование предболезни / Ф.И. Висмонт // *Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук.* — 2018. — Т. 15, № 1. — С. 7–16.
4. Гурин, В. Н. Терморегуляция и биологически активные вещества крови / В. Н. Гурин, А. В. Гурин. — Минск : Бизнесофсет, 2004. — 216 с.
5. Корягина, И. Ю. Использование метода комплексного определения активности трипсиноподобных протеиназ,  $\alpha_1$ -антитрипсина и  $\alpha_2$ -макроглобулина в гастроэнтерологической клинике / И. Ю. Корягина, Р. А. Зарембский, М. Д. Балябина / *Лаб. дело.* — 1990. — № 2. — С. 72–73.
6. Колб, В. Г. Справочник по клинической химии. / В. Г. Колб, В. С. Камышников. — 2-е изд., перераб. и доп. — Минск : Беларусь, 1982. — 366 с.

## On the significance of blood $\alpha_1$ -antitrypsin activity in the processes of detoxification, mechanisms of maintenance of temperature homeostasis and thyroid status of the body when overheating

*Vismont F. I., Zhadan S. A., Vismont A. F., Shust L. G., Tkachenko N. V., Yakovlev F. D., Abakumova T. V.*

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

In experiments on rats it has been established that overheating, leading to an increase in body temperature, is accompanied by a decrease in the activity of detoxication processes, level of  $\alpha_1$ -antitrypsin and the content of triiodothyronine in blood plasma. The introduction of  $\alpha_1$ -antitrypsin into the bloodstream at a dose of 20 mg/kg causes an increase in body temperature and activity of the pituitary-thyroid gland system in animals.  $\alpha_1$ -Antitrypsin, introduced into the bloodstream of animals before overheating, at this dose weakens the changes in detoxication processes and the content of triiodothyronine in the blood, which are characteristic of the effect on the body of high external temperature, and contributes to the development of hyperthermia.

**Keywords:**  $\alpha_1$ -antitrypsin, triiodothyronine, detoxication, body temperature, overheating.

*Поступила 02.06.2022*

УДК 616.24-006.08:612.398.12

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ РЕЦЕПТОРА CD44v6, HIF-1 $\alpha$ И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

*Мурашко Д. И., Таганович А. Д., Ковганко Н. Н., Можеева А. А.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** В структуре заболеваемости раком легкого большая часть принадлежит немелкоклеточному раку (НМРЛ). Заболевание характеризуется бессимптомным течением на протяжении длительного времени, вследствие чего его своевременная диагностика чрезвычайно затруднена. Поздняя диагностика существенно ухудшает эффективность лечения. В настоящее время активно ведется поиск информативных биомаркеров, которые могли бы послужить дополнительными критериями постановки диагноза НМРЛ.

Целью настоящего исследования была оценка количественных взаимоотношений компонентов сигнального пути HIF-1 $\alpha$ /CD44v6/гиалуроновая кислота (ГК) в крови пациентов с НМРЛ и определение целесообразности их измерения в качестве дополнительного диагностического средства оценки распространенности НМРЛ.

Рассчитанное пороговое значение уровня ГК в крови 12,4 нг/мл позволяет выявить ранние стадии НМРЛ с диагностической чувствительностью 93,5 % и специфичностью 71,1 %. Пороговое значение концентрации ГК в крови 28,0 нг/мл может использоваться для диагностики поздних стадий НМРЛ (чувствительность — 81,8 %, специфичность — 75,0 %). Нами отмечен существенный рост концентрации ГК в крови пациентов со II стадией НМРЛ в сравнении с I стадией. В связи с этим она может использоваться с целью дифференцирования I и II стадий НМРЛ (чувствительность — 80,8 %, специфичность — 68,6 %).

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легкого, гиалуроновая кислота, CD44v6.

**Введение.** В 2021 г. рак легкого явился вторым по распространенности злокачественным новообразованием в мире, уступая лишь раку молочной железы (у женщин) и предстательной железы (у мужчин). Он занимает лидирующую позицию в структуре смертности вследствие злокачественных новообразований. Наиболее частой формой этого заболевания является немелкоклеточный рак (НМРЛ). НМРЛ, в свою очередь является гистологически неоднородным заболеванием и подразделяется на несколько гистологических подтипов, основными из которых являются аденокарцинома (АК) и плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ) [1].

Клинические симптомы НМРЛ нередко проявляются при III и IV стадиях опухолевого процесса (классификация TNM/pTNM). Радикальное лечение злокачественных новообразований в этот период зачастую неэффективно, что подтверждается данными о пятилетней выживаемости пациентов с НМРЛ. Так, при I стадии заболевания она достигает 73 %, но уже при II стадии снижается практически вдвое. У пациентов с IV стадией опухо-

левого процесса она не превышает 13 %. Столь существенные различия в выживаемости свидетельствуют о важности своевременной диагностики НМРЛ [2].

В настоящее время активно ведется поиск информативных показателей крови, которые позволили бы с высокой точностью судить о распространенности НМРЛ на дооперационном этапе. В качестве дополнительных диагностических тестов при выявлении АК и ПКРЛ в крови пациентов определяется концентрация маркерных белков (CYFRA 21-1, SCC). Данные литературы свидетельствуют о существенном повышении уровня фрагмента цитокератина CYFRA 21-1 в крови пациентов с НМРЛ. Однако сведения о диагностической чувствительности определения его концентрации чрезвычайно противоречивы. По данным различных источников, она варьирует от 43 до 68 % [3, 4]. Столь же неоднозначны и результаты измерения концентрации антигена плоскоклеточной карциномы SCC в крови пациентов с НМРЛ. Сообщается, что она существенно увеличена лишь в крови пациентов с ПКРЛ, но не АК. Но даже при ПКРЛ диагностическая чувстви-

тельность определения уровня SCC в крови не превышает 55 % [5].

В последние годы активно изучаются перспективы использования компонентов сигнальных путей, играющих существенную роль в патогенезе опухолевого роста, в диагностике ряда злокачественных новообразований, в том числе НМРЛ. Интенсивная пролиферация опухолевых клеток нередко опережает развитие сосудистой сети. В условиях недостатка кислорода и энергетических субстратов в опухолевых клетках активируется синтез фактора, индуцируемого гипоксией  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). HIF-1 $\alpha$  в свою очередь активирует экспрессию генов, участвующих в регуляции жизнеобеспечения опухоли. Одним из продуктов этих генов является рецептор CD44v6. Связываясь со своим основным лигандом — гиалуроновой кислотой (ГК), он способствует активации матриксных металлопротеиназ и факторов роста, способствующих ангиогенезу и инвазии опухоли [6].

В литературе уже имеются данные, свидетельствующие об увеличении уровня ГК и CD44v6 в опухолевой ткани пациентов со злокачественными новообразованиями, в том числе и НМРЛ. Повышенная концентрация ГК и CD44v6 в опухолевой ткани ассоциирована с наличием метастазов в лимфоузлы и

внутренние органы [6]. Несмотря на то что экспрессия этих соединений характерна не только для опухоли, но и для клеток крови, результаты их определения в крови немногочисленны. Ранее нами были получены результаты определения HIF-1, CD44v6 и ГК в крови пациентов с НМРЛ, свидетельствующие о существенном повышении их концентрации по мере увеличения распространенности опухолевого процесса. Однако детальной оценки их уровня в крови в зависимости от характеристик опухолевого процесса не проводилось [7].

**Цель работы** — оценка диагностических параметров измерения концентрации HIF-1 $\alpha$ , CD44v6 и ГК в крови пациентов с НМРЛ с тем, чтобы определить целесообразность их использования в качестве критериев расширения показаний к углубленному обследованию (КТ/МРТ) пациентов с НМРЛ.

**Материалы и методы.** Обследовано 218 пациентов с НМРЛ (55 женщин и 153 мужчины) при поступлении их в ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова» в период 2019–2021 гг. Характеристика пациентов представлена в таблице 1. В качестве группы контроля обследовано 42 человека без проявлений заболевания в возрасте  $43 \pm 10$  лет.

Таблица 1 — Характеристика пациентов с НМРЛ

Показатель	Количество пациентов	Показатель	Количество пациентов
Стадия НМРЛ:		Метастазы в регионарные лимфоузлы (N):	
I	52	N0	134
II	73	N1	30
III	69	N2	40
IV	24	N3	14
Размер опухоли (T):		Отдаленные метастазы:	
T1	54	M0	194
T2	106	M1	24
T3	36	Степень дифференцировки опухоли (Grade):	
T4	22	G1	53
		G2	90
		G3	39

Кровь из локтевой вены пациентов и здоровых людей собирали натощак в вакутайнер с ЭДТА-K2 (Improvacuter, КНР). Для получения сыворотки кровь собирали в пробирку с тромбином и разделительным гелем (Improvacuter, КНР).

Определение концентрации CYFRA 21-1 в сыворотке крови осуществляли методом иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА) с

помощью наборов реагентов на ИХЛА-анализаторе Cobas e411 (Roche Diagnostics, США).

Измерение уровня ГК, HIF-1 $\alpha$  и SCC в сыворотке крови пациентов и здоровых людей осуществляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием ИФА-наборов Fine Test (КНР) на автоматическом ИФА-анализаторе Brio (Seac, Италия) и планшетном фотометре Sirio (Seac, Италия). Определение

оптической плотности исследуемых образцов и стандартных растворов проводилось при длине волны 450 нм и референсной длине волны 620 нм.

Долю лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, снабженных рецептором CD44v6, и плотность расположения рецептора в них (MFI) измеряли методом проточной цитометрии с использованием цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США). В пробирку помещали 100 мкл крови, стабилизированной ЭДТА-К2, и 10 мкл соответствующих антител, содержащих флуоресцентные метки: CD44v6 — FITC (Invitrogen, США), CD45- Pacific Orange (Exbio, Чехия). Через 15 мин инкубации в темноте к смеси добавляли 1 мл лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, США). Фиксацию антител на поверхности клеток проводили с помощью фиксирующего раствора IQTest 3 (Beckman Coulter, США).

Для всех выборок проверяли гипотезу нормальности распределения по критерию Колмогорова – Смирнова. Поскольку значения показателей не подчинялись нормальному распределению, анализ проводили методами непараметрической статистики с использованием программного пакета IBM SPSS Statistics 23 (IBM, США). Рассчитывались медиана и интерквартильный размах (25–75 %). Для оценки различий уровня определяемых показателей в нескольких независимых группах применяли *H*-критерий Краскелла – Уоллиса. Критический уровень его значимости принимали равным 5 % ( $p < 0,05$ ). Дальнейшие сравнения концентрации показателей в анализируемых группах осуществлялись с применением *U*-критерия Манна – Уитни. В соответствии

с поправкой Холма – Бонферрони на множественные сравнения, критический уровень его значимости рассчитывали по общепринятой формуле. О характере и силе взаимосвязи между уровнем показателей и степенью распространенности опухолевого процесса судили на основании расчета коэффициента корреляции Спирмена (*R*).

Оценку диагностической информативности биохимических тестов проводили с помощью характеристических кривых (ROC-анализ). В последующем вычисляли площадь под ROC-кривой (AUC, англ. Area Under Curve), на основании которой оценивали надежность определяемого показателя как потенциального биомаркера. О диагностической ценности анализируемых показателей судили на основании расчета диагностической чувствительности (ДЧ), специфичности (ДС) и диагностической эффективности теста (ДЭ). Пороговое значение диагностического теста определяли как величину оптимального сочетания чувствительности и специфичности теста при построении ROC-кривых.

**Результаты и их обсуждение.** Доля гранулоцитов, снабженных CD44v6, а также MFI CD44v6 в гранулоцитах и лимфоцитах увеличена в крови пациентов со II–IV стадией НМРЛ в сравнении со здоровыми людьми ( $p < 0,008$ ; таблица 2). Доля лимфоцитов, снабженных CD44v6, напротив, не отличалась в крови пациентов с НМРЛ и контрольной группы. Доля моноцитов, снабженных CD44v6, увеличивается при НМРЛ уже при I стадии заболевания в сравнении со здоровыми людьми ( $p < 0,008$ ), однако не изменяется по мере распространения опухоли.

Таблица 2 — Концентрация HIF-1 $\alpha$ , CD44v6 и ГК в крови пациентов с НМРЛ

Показатель	Контроль	НМРЛ		
		I стадия	II стадия	III–IV стадия
CD44v6, гранулоциты, %	3,2 [1,9; 4,1]	3,7 [2,4; 4,5]	4,1 <sup>1</sup> [2,5; 5,0]	5,1 <sup>1</sup> [2,8; 7,0]
MFI CD44v6, гранулоциты	1,5 [1,1; 2,5]	2,4 [1,4; 2,8]	2,5 <sup>1</sup> [2,2; 2,8]	2,5 <sup>1</sup> [2,0; 2,8]
CD44v6, лимфоциты, %	1,1 [0,4; 1,9]	1,4 [0,6; 3,7]	1,3 [1,1; 1,5]	1,6 <sup>1</sup> [1,1; 2,0]
MFI CD44v6, лимфоциты	2,6 [2,3; 2,8]	2,9 [1,6; 4,9]	3,3 <sup>1</sup> [2,7; 4,4]	3,9 <sup>1</sup> [1,9; 4,6]
CD44v6, моноциты, %	1,9 [1,6; 2,3]	2,4 <sup>1</sup> [1,7; 9,2]	3,2 <sup>1</sup> [2,0; 3,7]	3,9 <sup>1</sup> [2,2; 9,4]
MFI CD44v6, моноциты	5,1 [4,5; 5,8]	5,6 [3,1; 7,8]	6,0 <sup>1</sup> [4,2; 7,5]	4,9 [2,2; 6,8]



Окончание табл. 2

Показатель	Контроль	НМРЛ		
		I стадия	II стадия	III–IV стадия
HIF-1 $\alpha$ , нг/мл	2,9 [2,5; 3,9]	2,9 [2,2; 3,6]	3,2 [2,7; 4,1]	3,7 <sup>2</sup> [2,7; 4,4]
ГК/НА, нг/мл	9,0 [7,7; 18,0]	17,1 <sup>1</sup> [14,5; 24,4]	28,1 <sup>1,2</sup> [23,8; 31,8]	32,0 <sup>1,2,3</sup> [30,0; 42,8]
SCC, нг/мл	1,4 [1,3; 2,0]	1,7 [1,2; 2,7]	2,1 <sup>1,2</sup> [1,5; 3,2]	1,8 <sup>1</sup> [1,4; 3,0]
CYFRA 21-1, нг/мл	1,5 [1,2; 1,9]	2,7 <sup>1</sup> [2,0; 3,7]	3,1 <sup>1</sup> [2,2; 5,7]	4,7 <sup>1,2,3</sup> [3,3; 7,5]

*Примечание* — <sup>1</sup> — статистически значимые отличия в сравнении со здоровыми людьми; <sup>2</sup> — статистически значимые отличия в сравнении с I стадией; <sup>3</sup> — статистически значимые отличия уровня показателей в крови пациентов с III–IV стадиями НМРЛ по сравнению со II стадией.

Плотность расположения CD44v6 в моноцитах (MFI) демонстрирует значительный рост в крови пациентов со II стадией НМРЛ в сравнении со здоровыми людьми. У пациентов с III–IV стадиями заболевания отмечается тенденция к ее снижению до контрольного уровня.

Концентрация HIF-1 $\alpha$  в крови пациентов с I и II стадиями НМРЛ и группе контроля практически одинакова. Максимальная его концентрация в крови отмечается у пациентов при III–IV стадиях НМРЛ. Она выше, чем при I стадии заболевания ( $p < 0,008$ ), но не отличается от контрольной.

Единственным компонентом сигнального пути HIF-1 $\alpha$ /CD44v6/ГК, который существенно изменяется в зависимости от распространенности НМРЛ, является ГК. У пациентов с I стадией НМРЛ ее концентрация практически вдвое выше, чем у здоровых людей и пациентов с гамартомой ( $p < 0,008$ ). Еще более существенно концентрация этого показателя возрастает в крови пациентов со II стадией НМРЛ. Она в 1,6 раза выше, чем при I стадии заболевания ( $p < 0,008$ ). Максимальная концентрация ГК в сыворотке крови отмечалась при III–IV стадиях НМРЛ. Его медиана составила 32,0, что примерно в 3,5 раза выше, чем в контрольной группе ( $p < 0,008$ ). Корреляционный анализ подтвердил наличие взаимосвязи средней силы между уровнем ГК в крови и стадиями НМРЛ ( $R = 0,662$ ).

Концентрация SCC в крови пациентов с I стадией НМРЛ не отличается от таковой пациентов с гамартомой и здоровых людей. При II стадии заболевания она в 1,4 раза выше, чем у пациентов с I стадией НМРЛ ( $p < 0,008$ ). При III и IV стадиях заболевания отмечается тенденция к снижению содержания SCC в крови.

Тем не менее его концентрация остается существенно более высокой в сравнении с группой контроля.

Концентрация CYFRA 21-1 в крови пациентов с I стадией НМРЛ вдвое выше, чем в контрольной группе ( $p < 0,008$ ). Уровень этого при II стадии НМРЛ не отличается от такового при I стадии заболевания. В поздний период НМРЛ концентрация CYFRA 21-1 максимальна. Ее медиана составляет 4,9 нг/мл, что в 3,5 раза выше, чем в группе сравнения ( $p < 0,008$ ). Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о наличии взаимосвязи средней силы между концентрацией CYFRA 21-1 в крови пациентов и стадиями НМРЛ ( $R = 0,453$ ).

Концентрация ГК в сыворотке крови пациентов с НМРЛ и размером опухоли менее 3 см (T1) возрастала в 2,1 раза в сравнении со здоровыми людьми ( $p < 0,008$ ; таблица 3). Еще более существенно концентрация этого показателя увеличивалась при T = 3–5 см (T2). У пациентов с T3 (5–7 см) уровень ГК в крови в 1,2 раза выше, чем при T2, и в 1,7 раз выше, чем при T1. Максимальный уровень показателя отмечался у пациентов с T4. Его медиана составила 36,3, что более, чем в 4 раза превышает таковую у здоровых людей. Проведенный корреляционный анализ подтвердил наличие связи средней силы уровня ГК в крови пациентов и размером первичной опухоли при НМРЛ.

Концентрация ГК также существенно увеличивалась в крови пациентов с отдаленными метастазами опухоли. У пациентов с M1 он в 1,2 раза выше, чем при M0 ( $p < 0,017$ ). Еще более существенные изменения продемонстрировала концентрация CYFRA 21-1 в крови. Его медиана у пациентов с M1 практически вдвое выше таковой при M0 ( $p < 0,017$ ; таблица 4).

Таблица 3 — Концентрация ГК и CYFRA 21-1 в крови пациентов в зависимости от размера опухоли

Показатель	Размер опухоли				Коэффициент корреляции Спирмена R
	T1	T2	T3	T4	
CYFRA 21-1, нг/мл	2,8 <sup>1</sup> [2,0; 3,6]	3,8 <sup>1,2</sup> [2,5; 6,4]	4,2 <sup>1,2</sup> [3,2; 5,9]	3,9 <sup>1</sup> [2,7; 7,9]	0,279
ГК, нг/мл	19,3 <sup>1</sup> [14,5; 24,4]	28,7 <sup>1,2</sup> [24,5; 32,0]	33,6 <sup>1,2,3</sup> [28,7; 46,6]	36,3 <sup>1,2,3</sup> [30,3;43,8]	0,650

Примечание — <sup>1</sup> — статистически значимые отличия в сравнении со здоровыми людьми; <sup>2</sup> — статистически значимые отличия в сравнении с T1; <sup>3</sup> — статистически значимые отличия в сравнении с T2.

Таблица 4 — Концентрация ГК и CYFRA 21-1 в крови пациентов в зависимости от наличия отдаленных метастазов опухоли

Показатель	M0	M1
CYFRA 21-1, нг/мл	3,3 <sup>1</sup> [2,3; 5,3]	6,2 <sup>1,2</sup> [4,0; 10,8]
ГК, нг/мл	27,1 <sup>1</sup> [22,4;32,2]	31,9 <sup>1,2</sup> [30,2;47,0]

Примечание — <sup>1</sup> — статистически значимые отличия уровня показателей в крови пациентов с НМРЛ в сравнении со здоровыми людьми; <sup>2</sup> — статистически значимые отличия в сравнении с M0.

Концентрация CYFRA 21-1 в крови пациентов с размером опухоли до 3 см вдвое выше, чем у здоровых людей, и еще более существенно возрастает при T2 ( $p < 0,008$ ). У пациентов с опухолью от 5 до 7 см уровень CYFRA 21-1 было незначительно выше в сравнении с T3. Вместе с тем концентрация этого параметра при T4 демонстрировала тенденцию к снижению. Несмотря на это обстоятельство, результаты корреляционного анализа свидетельствуют о наличии взаимосвязи уровня этого антигена с размером опухоли (таблица 3).

ГК является единственным показателем, который демонстрирует существенные различия в зависимости от метастазирования опухоли в регионарные лимфоузлы. Его концентрация у пациентов с N1 в 1,2 раза выше, чем при отсутствии метастазов ( $p < 0,008$ ). В крови пациентов с N2 концентрация ГК возрастает еще сильнее. Ее медиана на 11% превышает такую при N1 ( $p < 0,008$ ). У пациентов с N3 уровень ГК в крови достигает максимальных значений и демонстрирует существенные отличия от пациентов с N0 и N1, но не N2. Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о взаимосвязи средней силы между концентрацией ГК в крови и метастазированием опухоли в регионарные лимфоузлы ( $R = 0,472$ ).

Те показатели, которые существенно изменялись в зависимости от стадии, размера и

метастазирования опухоли при НМРЛ (уровень ГК и CYFRA 21-1 в крови) были отобраны для оценки их диагностических параметров. Результаты ROC-анализа свидетельствуют, что определение уровня ГК в крови пациентов с НМРЛ позволяют выявить ранние стадии заболевания с диагностической чувствительностью 93,5 % (пороговое значение — 12,3 нг/мл). Доля верно выявленных отрицательных результатов при этом составляет 71,1 %. Определение с той же целью уровня в крови CYFRA 21-1 демонстрирует меньшую диагностическую чувствительность (78,0 %), но большую специфичность (76,2 %) при пороговом значении 1,9 нг/мл.

Оба анализируемых показателя существенно возрастали в поздний период заболевания в сравнении с ранними стадиями. Пороговое значение уровня ГК в крови 28,4 нг/мл может использоваться для выявления III–IV стадий НМРЛ. У 81,8 % пациентов с уровнем ГК выше 28,4 нг/мл диагностируется III–IV стадия заболевания, а у 75,0 % обследованных с концентрацией ГК меньше этого порогового значения поздние стадии НМРЛ отсутствуют. Диагностическая чувствительность и специфичность определения концентрации CYFRA 21-1 в крови с целью выявления III–IV стадии НМРЛ существенно ниже чем у ГК (69,9 и 71,6 %, соответственно) при пороговом значении 3,8 нг/мл.

Концентрация ГК в крови пациентов со II стадией НМРЛ существенно выше, чем при I стадии. По этой причине его определение может использоваться для отличия I стадии НМРЛ от II. 80,8 % обследуемых с ранними стадиями НМРЛ и концентрацией ГК выше 22,5 нг/мл имеют II стадию опухолевого процесса, а у 70,6 % пациентов с уровнем ГК в крови меньше соответствующего порогового значения диагностируется I стадия заболевания.

В крови пациентов с НМРЛ наблюдается существенный рост уровня ГК, доли клеток лейкоцитарного ряда, снабженных CD44v6, а также плотности расположения этих рецепторов в клетках крови. Так как эти соединения являются важнейшими регуляторами опухолевого ангиогенеза, инвазии и метастазирования, логично предположить увеличение их концентрации в крови пациентов по мере распространения опухолевого процесса. Несмотря на то что число исследований, посвященных определению концентрации названных выше показателей в крови пациентов, невелико, в исследованиях, которые получены с использованием образцов опухолевой ткани, также можно встретить указания на существенный рост их уровня в опухолевых клетках [6]. Концентрация HIF-1 $\alpha$  оказалась единственным показателем, не продемонстрировавшим существенного роста в крови при этом заболевании. Несмотря на несомненную патогенетическую значимость этого транскрипционного фактора, ранее уже были получены данные, свидетельствующие об отсутствии значительных изменений концентрации его в крови при НМРЛ [8].

Среди всех показателей, отражающих количество рецептора CD44v6 в клетках лейкоцитарного ряда, только доля моноцитов и гранулоцитов, снабженных CD44v6, существенно возросли в сравнении со здоровыми людьми уже при I стадии заболевания. При II, III и IV стадиях НМРЛ и в поздний период заболевания наблюдается существенное увеличение доли гранулоцитов, снабженных CD44v6, а также MFI CD44v6 в гранулоцитах и лимфоцитах в сравнении со здоровыми людьми, что свидетельствует о нарастающей интенсивности воспаления и инвазии опухоли. В то же время уровень этих показателей при НМРЛ существенно не изменялся по мере прогрессирования опухолевого процесса, что свидетельствует об их низкой специфичности по отношению к злокачественному росту. Полученные результаты косвенно подтверждаются данными опу-

бликованных ранее исследований, указывающих на отсутствие значительных изменений уровня CD44v6 в крови пациентов со злокачественными новообразованиями в зависимости от распространенности опухоли [9].

Наиболее существенные изменения в зависимости от распространенности опухоли демонстрирует концентрация ГК в крови пациентов. Ее уровень в крови пациентов выше, чем в контрольной группе, уже при I стадии НМРЛ. Обнаружен существенный подъем ее концентрации при II стадии опухолевого процесса в сравнении с I стадией и еще более существенный рост при III и IV стадиях НМРЛ.

В литературе практически отсутствуют данные, посвященные определению уровня ГК в крови при раке легкого. Наряду с этим можно встретить указания на существенный рост концентрации этого показателя в мокроте пациентов с этим заболеванием, однако анализа в зависимости от распространенности опухоли и ее гистологического типа не проводилось [10].

Диагностическая чувствительность изменения ГК в крови пациентов при выявлении ранних и поздних стадий НМРЛ превышает таковую для CYFRA 21-1. Другим преимуществом этого показателя перед CYFRA 21-1 является возможность его использования с целью отличия I стадии НМРЛ от II его стадии (диагностическая чувствительность — 80,8 %, специфичность — 68,6 %).

**Заключение.** Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что, несмотря на сравнительно высокие диагностические параметры определения ГК в крови пациентов с НМРЛ, его измерение в сыворотке крови пациентов с этим заболеванием характеризуется низкой специфичностью (не более 72 %) и не является достаточным при выявлении столь тяжелого заболевания. Одним из наиболее эффективных подходов, позволяющих повысить диагностические параметры отдельных показателей, является создание на их основании многофакторных диагностических моделей. В настоящее время в литературе уже имеются данные, свидетельствующие о существенном повышении диагностической специфичности определения лабораторных показателей в составе такой модели [11]. В соответствии с этим перспективой для дальнейших исследований является проведение подобного анализа, включающего концентрацию ГК в крови в качестве одного из предикторов распространенности опухоли.

### Список цитированных источников

1. Lung squamous cell lung carcinoma and lung adenocarcinoma differential gene expression regulation through pathways of Notch, Hedgehog, Wnt and ErbB signaling / D. Anusewitz [et al.] // Scientific reports. — 2020. — Vol. 10. — P. 21128.
2. Lung cancer staging and prognosis / Gavitt A Woodard [et al.] // Cancer Treat. Res. — 2016. — Vol. 170. — P. 47–75.
3. Diagnostic value of CEA and CYFRA 21-1 tumor markers in primary lung cancer / K. Okamura [et al.] // Lung. Cancer. J. — 2016. — Vol. 80, № 1 — P. 45 — 49.
4. CYFRA 21-1 as a biologic marker of non-small cell lung cancer. Evaluation of sensitivity, specificity and prognostic role / B. Wieskopf [et al.] // Chest. — 1995. — Vol. 108, № 1 — P. 163–169.
5. Diagnostic and prognostic significance of SCC-Ag in non-small cell lung cancer / T. Vassilakopoulos [et al.] // Lung. Cancer. — 2001. — Vol. 32, № 2 — P. 137–144.
6. The biology and role of CD44 in cancer prodression therapeutic implications / C. Chen [et al.] // J. Hematol. Oncol. — 2018. — Vol. 11, № 64 — P. 29747682.
7. Взаимосвязь количественных характеристик CD44 в клетках крови с дескрипторами немелкоклеточного рака легкого. / А. Д. Таганович [и др.] // Онкологический журнал. — 2020. — Т. 14, № 4. — С. 16–27.
8. Serum tumor markers, hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in patients with non-small cell lung cancer before and after intervention / J. Liang [et al.] // Asian. Pac. J. Cancer. Prev. — 2013. — Vol. 14, № 6 — P. 3851–3854.
9. Prognostic value of CD44 expression in non-small cell lung cancer: a systematic review / L. Zhuang [et al.] // Int. J. Clin. Exp. Pathol. — 2014. — Vol. 7, № 7. — P. 3632–3646.
10. Monitoring non-small cell lung cancer progression and treatment response through hyaluronic acid in sputum / J. Chinoca [et al.] // Braz. J. Med. Biol. Res. — 2022. — Vol. 55. — Pe11513.
11. Prognostic value of combination of CYFRA 21-1, CEA and NSE in patients with advanced non-small cell lung cancer. / F. Barlesi [et al.] // Respir. Med. — 2004. — Vol. 98, № 4. — P. 357–362.

## Quantitative relationships between CD44v6, HIF-1 $\alpha$ and hyaluronic acid blood level in nsclc patients

*Murashka D. I., Tahanovich A. D., Kauhanka M. M., Mazhayeva A. A.*

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

Non-small cell lung cancer (NSCLC) takes about 85 % in lung cancer morbidity. It can be characterized by absence of clinical symptoms for a long time. That is why early diagnosis of the disease is difficult. The search of informative biomarkers which can be used as auxiliary facilities in NSCLC diagnosis is currently underway.

The aim of present study was to evaluate quantitate relationships of HIF-1 $\alpha$ , hyaluronic acid and CD44v6 receptor blood level in NSCLC patients to estimate its diagnostic value in this disease.

The calculated cutoff value of HA serum level (12,3 ng/ml) can be used to reveal early staged of NSCLC with diagnostic sensitivity 93,5 % and specificity 71,1 %. The cutoff value 28, 4 ng/ml can be used in the diagnosis of III-IV stage NSCLC (sensitivity — 81,8 %, specificity — 75,0 %). This indicator can be used to distinguish I stage NSCLC from its II stage (sensitivity — 81,4 %, specificity — 70,6 %).

**Keywords:** non-small cell lung cancer, blood, CD44v6, hyaluronic acid.

*Поступила 06.09.2022*



## МЕТОДИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ВЫЯВЛЕНИЮ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ СУИЦИДАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ

Глинкина Т. В.<sup>1</sup>, Костюк С. А.<sup>1</sup>, Давидовский С. В.<sup>1</sup>, Ибрагимова Ж. А.<sup>2</sup>,  
Руденкова Т. В.<sup>1</sup>, Полуян О. С.<sup>1</sup>, Костюк Д. Д.<sup>3</sup>, Марчук С. И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Государственное учреждение образования  
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»,  
г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup> Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>3</sup> Институт психологии Вроцлавского государственного университета,  
г. Вроцлав, Польша

**Реферат.** В настоящее время значительное внимание уделяется изучению роли генетических факторов в формировании суицидального поведения. В данной статье представлены результаты исследования экспрессии генов *SAT 1*, *SKA 2* и *BDNF* в слюне лиц, предпринявших попытку суицида. В качестве биологического материала использовали слюну 20 лиц, предпринявших попытку суицида (ЛППС); 5 лиц, совершивших парасуицид (ЛСП) и 20 лиц вошли в группы сравнения (ГС) — лица перенесшие психосоциальный стресс и ранее суицидальных попыток не совершавшие. Чтобы оценить возможность анализа экспрессии генов *SAT 1*, *SKA 2* и *BDNF* в слюне, определяли значения порогового цикла флуоресценции (Ct) при проведении ПЦР в режиме реального времени, используя образцы кДНК, полученные после обратной транскрипции РНК, вносимой в реакцию обратной транскрипции в наибольшем количестве. Достоверное различие ( $p < 0,05$ , критерий Манна – Уитни) наблюдалось в значении относительной экспрессии гена *SAT 1* между ГС и группой ЛППС. Для генов *SKA 2* и *BDNF* значения Ct составили более 34,3, что свидетельствовало о низком уровне выявляемой экспрессии генов *SKA 2* и *BDNF* в слюне.

**Ключевые слова:** суицид, парасуицид, экспрессия генов, слюна, *SAT 1*.

**Введение.** В настоящее время значительное внимание уделяется роли генетических факторов в исследовании суицидального поведения. Данные генетической эпидемиологии, полногеномный поиск ассоциаций указывают на наличие генетических предикторов суицидального поведения [1]. Среди них выделяют такой фактор, как экспрессия генов, ассоциированных с суицидальным поведением. Именно экспрессия генов характеризует ответ генома на воздействие окружающей среды и влияет на формирование фенотипических признаков, которые могут обуславливать формирование суицидального поведения [2]. В свою очередь трудности в идентификации экспрессии генов как надежного предиктора связаны с индивидуальными особенностями генетических и регуляторных сетей, вследствие чего биологическая значимость предиктора может стать неочевидной. Для проведения исследования в данном направлении выбраны 3 гена, ответственных за синтез белков, ассоциированных с суицидаль-

ным поведением: *SAT 1* (spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1), *SKA 2* (spindle and kinetochore associated complex subunit 2) и *BDNF* (brain-derived neurotrophic factor). Ранее нами показано, что экспрессия данных генов обнаруживается в крови и слюне, при этом особый интерес представляет возможность исследования экспрессии генов в слюне, поскольку ее получение является неинвазивным [3].

**Цель работы** — изучение экспрессии генов *SAT 1*, *SKA 2* и *BDNF* в слюне лиц, предпринявших попытку суицида.

**Материалы и методы.** В качестве биологического материала для оценки экспрессии генов использовали слюну 20 лиц, предпринявших попытку суицида (ЛППС) в возрасте от 25 до 71 года, 15 мужчин и 5 женщин; 5 лиц, совершивших парасуицид (ЛСП) в возрасте от 23 до 59 лет, 3 мужчин и 2 женщины и 20 лиц с расстройствами адаптации в возрасте от 23 до 66 лет, 11 мужчин и 9 женщин, которые составили группу сравнения (ГС).



Для выделения РНК использовали свежие образцы слюны в объеме 500 мкл, а также образцы, замороженные до проведения исследования при  $-80^{\circ}\text{C}$ , исключали те образцы слюны, которые претерпели заморозку и оттаивание, так как это приводило к значительной потере РНК. Выделяли РНК сорбцией на колонках (PureLink RNA Micro Kit, Invitrogen, США). Связанная с фильтрующими элементами колонок РНК очищалась и подвергалась действию ДНКазы (Invitrogen, США) для элиминирования контаминирующей ДНК. Этапу прохождения раствора, содержащего нуклеиновые кислоты, через колонку предшествовал лизис клеток слюны. Для лизиса клеток применяли реагент TRIzol (Invitrogen, США) и экстрагировали РНК в присутствии хлороформа (АО «База № 1 Химреактивов», РФ), что является известным методическим подходом для получения препарата РНК перед его очисткой. Количество и качество выделенной РНК оценивали путем измерения оптической плотности растворов РНК на длинах волн 260 нм и 280 нм с по-

мощью спектрофотометра NanoDrop™ Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, США), рассчитывали отношение абсорбций 260 нм/280 нм.

При выявлении уровней экспрессии генов в образцах слюны пациентов проводили молекулярно-генетический анализ методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ ПЦР-РВ) для определения относительного числа копий специфических участков кДНК каждого из исследуемых генов — *SAT 1*, *SKA 2* и *BDNF*. Для этого после выделения РНК проводили реакцию обратной транскрипции (ОТ) с использованием набора SuperScript III обратная транскриптаза, дНТФ и Random Hexamers праймеров (Invitrogen, США). Полученную в результате обратной транскрипции кДНК использовали для постановки ПЦР-РВ с применением набора «Готовая смесь для ПЦР-РВ» (Праймтех, Беларусь), праймеров и TaqMan проб к исследуемым генам *SAT 1*, *SKA 2*, *BDNF*, а также к референсным генам (house-keeping генам) *GAPDH* и *HGUS*:

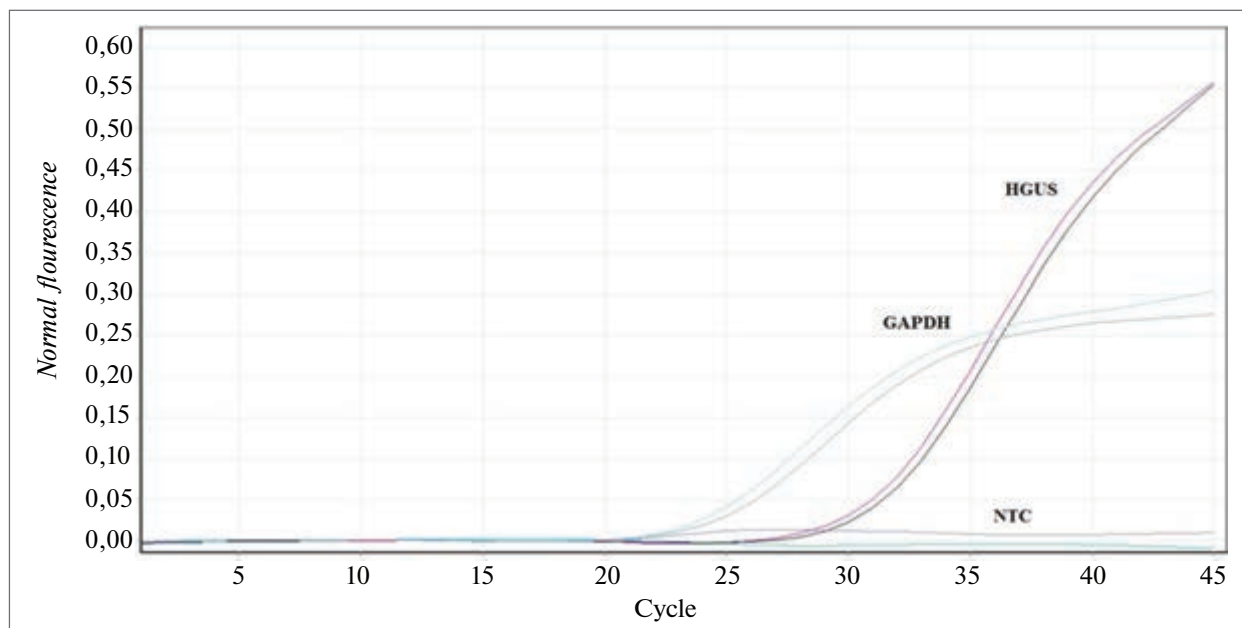
*SAT 1* 5'-CACCCCTTTTACCACTGCCT-3' (прямой праймер),  
*SAT 1* 5'-TGCCAATCCACGGGACATAG-3' (обратный праймер),  
*SAT 1* 5'-AGCACTGGACTCCGCAAGGACACAGCA-3'-(проба);  
*SKA 2* 5'-ACAGGCTGGAATATGAAATCAAGAC-3' (прямой праймер),  
*SKA 2* 5'-ATTGCTCTGCCGCAGTTTTTC-3' (обратный праймер),  
*SKA 2* 5'-TGTATGCCCGCATTAACCAGTTGCTGT-3' (проба);  
*BDNF* 5'-GACTTCGGGAAGGTGTCTGG-3' (прямой праймер),  
*BDNF* 5'-TGAAATGGGCTGAATGGGCT-3' (обратный праймер),  
*BDNF* 5'-ACCCTCTCCATGAAGAGACAGGATGGGCA-3' (проба);  
*GAPDH* 5'-GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC-3' (прямой праймер),  
*GAPDH* 5'-CATGAGTCCTTCCACGATACC-3' (обратный праймер),  
*GAPDH* 5'-CCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCCTG-3' (проба);  
*HGUS* 5'-CTCATTTGGAATTTGCCGATT-3' (прямой праймер),  
*HGUS* 5'-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTA-3' (обратный праймер),  
*HGUS* 5'-TGAACAGTCACCGACGAGAGTGCTGG-3' (проба).

Программа амплификации: 1 цикл  $95^{\circ}\text{C}$  — 15 мин, 45 циклов  $95^{\circ}\text{C}$  — 15 с,  $60^{\circ}\text{C}$  — 60 с. Детекцию проводили по отдельным каналам: FAM/Green — для целевых генов; JOE/Yellow — для референсных генов *GAPDH* и *HGUS*.

**Результаты и их обсуждение.** Из образцов слюны (цельная, 500 мкл) 45 лиц групп ЛППС, ЛСП и ГС выделена РНК со следующими характеристиками: концентрация 12,9 (9,6/14,7) нг/мкл, отношение абсорбций 260 нм/280 нм 1,8–2,2, результаты экспрессии референсных генов *GAPDH* и *HGUS* положительные (рисунок 1).

Чтобы оценить возможность анализа экспрессии генов *SAT 1*; *SKA 2* и *BDNF* в слюне,

определяли значения порогового цикла флуоресценции (Ct) по каналу детекции FAM/Green — для целевых генов при наибольшем количестве РНК, вносимом в реакцию ОТ. Для гена *SAT 1* значения находились в диапазоне от 22,2 до 31,8, тогда как для генов *SKA 2* и *BDNF* значения Ct составили более 34,3, что свидетельствовало о низком уровне выявляемой экспрессии данных генов в слюне, поэтому гены *SKA 2* и *BDNF* были исключены из дальнейшего анализа экспрессии генов, контролирующих синтез белков, ассоциированных с суицидальным поведением, в слюне.



**Рисунок 1 — Кривые флюоресценции, характеризующие амплификацию кДНК референсных генов *GAPDH* и *HGUS* человека**

Ассоциацию *SAT 1* (spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1) с психическими расстройствами анализируют в ряде публикаций [4, 5], при этом предполагают, что уровень экспрессии гена *SAT 1* является характерным биомаркером суицидального поведения [6]. Однако отсутствуют литературные данные об оценке экспрессии гена *SAT 1* в слюне при изучении ассоциации с суицидальным поведением.

Концентрация выделенной из слюны РНК составила 12,9 (9,6/14,7) нг/мкл. В ходе иссле-

дования определяли наиболее эффективные условия ОТ РНК и амплификации синтезированной кДНК. В качестве характеристик амплификации кДНК оценивали значения *Ct* и воспроизводимость амплификации от образца к образцу слюны ( $n = 10$ ).

Согласно таблице 1 наилучшая воспроизводимость амплификации достигалась при использовании на этапе ОТ Random Hexamers праймеров.

**Таблица 1 — Характеристики амплификации кДНК *SAT 1*, *GAPDH* и *HGUS* при различных вариантах праймирования синтеза кДНК**

Условие анализа	<i>SAT 1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HGUS</i>	Воспроизводимость амплификации кДНК		
	Ct, Me (min/max)			<i>SAT 1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HGUS</i>
Обратная транскрипция (ОТ)						
Oligo(dT) <sub>20</sub>	25,5 (25,1/26,7)	26,6 (26,2/26,8)	31,4 (30,8/31,6)	89%	93 %	85 %
Random Hexamers	24,4 (23,8/24,9)*	25,5 (25,2/26,0)*	30,2 (29,8/30,5)*	100 %	100 %	98 %
Гено-спец. праймер	25,3 (24,8/26,1)	26,4 (25,8/26,9)	31,6 (31,5/32,0)	98 %	99 %	96 %

Примечание — Me — медиана.

\* Уровень значимости  $p < 0,05$  (критерий Манна – Уитни).

В случае применения Oligo(dT)<sub>20</sub> или геноспецифичного праймера не все РНК, выделенные из слюны, в реакции ОТ позволили получить образец, который давал бы положительный результат амплификации. Известно, что эффективность применения Oligo(dT)<sub>20</sub> зависит от сохранения polyA последователь-

ности на мРНК, отсутствия длинных 3' UTR регионов [7]. Применение геноспецифичных праймеров в реакции ОТ является наиболее чувствительным методом, однако эффективность их применения в значительной степени зависит от количества РНК в реакции ОТ [7].

Чем больше РНК вносили в реакцию ОТ, тем более эффективной была последующая реакция амплификации равных объемов, полученных кДНК (таблица 2).

Таблица 2 — Характеристики амплификации кДНК *SAT 1*, *GAPDH* и *HGUS* при различных количествах вносимой РНК в ОТ

Условие анализа	<i>SAT 1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HGUS</i>	Воспроизводимость амплификации кДНК		
	Ct, Me (min/max)			<i>SAT 1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HGUS</i>
Обратная транскрипция (ОТ)						
РНК на реакцию:						
менее 50 нг	28,4 (28,0/29,2)	29,4 (29,0/30,3)	32,7 (32,3/33,1)	84 %	90 %	82 %
50–100 нг	25,5 (24,9/26,2)	26,3 (25,8/26,7)	31,6 (30,8/32,2)	97 %	100 %	95 %
более 100 нг	22,5 (21,7/22,8)	23,7 (23,2/24,0)	30,6 (30,2/31,6)	99 %	100 %	100 %

Примечание — Me — медиана.

Чтобы защитить РНК от действия РНКаз в реакцию ОТ рекомендуется вносить ингибитор РНКаз, однако избыточное его количество может вызвать обратный эффект — разрушение РНК и ингибирование ОТ, в таком случае кДНК не синтезируется и детектируется отрицательный результат амплификации, воспроизводимость амплификации значительно снижается (таблица 3, добавление 40 ед ингибитора РНКаз на реакцию ОТ).

Таблица 3 — Характеристики амплификации кДНК *SAT 1*, *GAPDH* и *HGUS* при внесении ингибитора РНКаз в ОТ

Условие анализа	<i>SAT 1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HGUS</i>	Воспроизводимость амплификации кДНК		
	Ct, Me (min/max)			<i>SAT 1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HGUS</i>
Обратная транскрипция (ОТ)						
Ингибитор РНКаз <sup>а</sup> :						
отсутствует	25,4 (25,0/26,4)	26,6 (26,0/27,0)	31,6 (31,3/32,2)	89 %	98 %	100 %
10 ед./реакцию	24,6 (24,2/25,1)	25,7 (25,3/25,9)	30,4 (30,0/30,8)	97 %	100 %	98 %
20 ед./реакцию	24,3 (23,7/24,8)*	25,4 (25,1/25,9)*	30,1 (29,7/30,4)*	100 %	100 %	98 %
40 ед./реакцию	25,2 (24,6/25,7)	26,9 (26,5/27,2)	31,6 (31,5/32,3)	77 %	82 %	81 %

Примечание — <sup>а</sup> — ингибитор РНКаз RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor (Invitrogen, США).

\* Уровень значимости  $p < 0,05$  (критерий Манна — Уитни).

Оптимальными концентрациями праймеров для применения с набором «Готовая смесь для ПЦР-РВ» стали при амплификации кДНК гена *SAT 1*: прямого — 200 мкМ и обратного — 300 мкМ, при амплификации кДНК генов *GAPDH* и *HGUS*: прямого — 300 мкМ и обратного — 300 мкМ (таблица 4).

Таблица 4 — Характеристики амплификации кДНК *SAT 1*, *GAPDH* и *HGUS* при различных концентрациях праймеров

Условие анализа	<i>SAT 1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HGUS</i>	Воспроизводимость амплификации кДНК		
	Ct, Me (min/max)			<i>SAT 1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HGUS</i>
Амплификация кДНК						
F/R <sup>б</sup> , мкМ:						
300/300	25,7 (25,3/26,9)	25,8 (25,5/26,3)*	30,5 (30,1/30,8)*	94 %	100 %	100 %
200/300	24,6 (24,0/25,1)*	26,4 (26,0/26,6)	31,6 (31,2/31,9)	100 %	100 %	97 %
300/200	25,5 (25,1/26,3)	26,2 (25,8/26,8)	31,7 (31,1/32,2)	98 %	98 %	98 %

Примечание — <sup>б</sup> — F — прямой праймер; R — обратный праймер; концентрация пробы в каждом случае 200 мкМ.

\* Уровень значимости  $p < 0,05$  (критерий Манна — Уитни).

В ходе исследования отмечено, что увеличение объема образца после ОТ, вносимого в реакцию амплификации, до 4 мкл, отрицательно влияет на прохождение реакции амплификации (таблица 5). Мы предположили, что имеет место ингибирование компонентами образца после ОТ.

Анализ присутствия ингибиторов ПЦР-РВ проводили путем сравнения результатов амплификации образцов кДНК, полученных из

слюны и вносимых в реакцию амплификации в объеме 4 мкл (кДНК-4) и их 2-кратных разведений: кДНК-2, кДНК-1, кДНК-0,5 и кДНК-0,25. Оценивали вид графиков зависимости  $C_t$  ПЦР-РВ при выявлении кДНК от концентраций кДНК (усл. ед.) и значения  $R^2$  (рисунок 2). Статистический параметр  $R^2$  показывает, насколько хорошо зависимость  $C_t$  ПЦР-РВ от концентрации кДНК описывается выбранной моделью (в данном случае линейной).

Таблица 5 — Характеристики амплификации кДНК *SAT 1*, *GAPDH* и *HGUS* при различных количествах вносимого в амплификацию образца после ОТ

Условие анализа	<i>SAT 1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HGUS</i>	Воспроизводимость амплификации кДНК		
				<i>SAT 1</i>	<i>GAPDH</i>	<i>HGUS</i>
Ct, Me (min/max)						
Амплификация кДНК						
Объем образца после ОТ, взятый на амплификацию:						
4 мкл	24,4 (23,9/24,7)	25,5 (25,0/25,7)	30,6 (30,0/31,2)	64 %	70 %	72 %
2 мкл	25,4 (25,0/25,7)	26,5 (26,0/26,8)	31,5 (31,0/31,9)	98 %	100 %	98 %
1 мкл	27,0 (26,8/27,2)	28,1 (27,4/28,3)	33,0 (32,7/33,9)	98%	100 %	100 %
0,5 мкл	28,4 (28,0/28,7)	29,5 (29,1/29,8)	34,8 (34,2/35,3)	89%	94%	97%
0,25 мкл	31,5 (31,0/31,7)	32,6 (32,0/32,8)	35,5 (35,1/36,4)	74%	95%	93%

Примечание — Me — медиана.

Титрование раствора кДНК снижает концентрацию как нуклеиновой кислоты, так и ингибиторов амплификации, поэтому  $C_t$  при амплификации кДНК меньшей концентрации относительно значения  $C_t$  при амплификации ДНК большей концентрации наступает раньше предполагаемого  $C_t$  для данного разведения до того момента, когда концентрация ингибиторов уже не будет оказывать влияния на процесс амплификации. Как следствие, в присутствии ингибиторов график зависимости  $C_t$  ПЦР-РВ от концентрации кДНК становится пологим, для него характерен меньший наклон, параметр  $R^2$  уменьшается.

Согласно полученным результатам (на примере амплификации кДНК гена *GAPDH*, рисунок 2, а) при переходе от образца кДНК-4 к образцу кДНК-2 значения  $C_t$  для образца кДНК-2 наступают раньше предполагаемых, наклон графика  $-1,875$ ,  $R^2 0,6878$ . Нами сделан вывод о влиянии на ПЦР-РВ ингибиторов при амплификации кДНК-4, при этом разбавление образцов кДНК-4 уже в 2 раза способствует установлению пропорционального изменения  $C_t$  с изменением концентрации (рисунок 2, б):  $R^2$  повышается до 0,8044, наклон графика изменяется и принимает значение  $-2,9837$ . Рас-

считана эффективность реакции амплификации кДНК гена *GAPDH* по формуле  $(10^{-1/\text{наклон}} - 1)$ , значение составило 115 % при оптимуме (94–110 %), что допустимо для *in house* методик.

Таким образом, при проведении ОТ РНК, выделенной из слюны пациентов, в реакцию вносили 50–100 нг РНК, использовали ингибитор РНКаз в количестве 20 ед/реакцию, для последующего анализа кДНК с применением ПЦР-РВ использовали 2 мкл полученного образца на реакцию (25 мкл).

Для оценки относительной экспрессии гена *SAT 1* в слюне выбран референсный ген *GAPDH*, поскольку значения  $C_t$  *SAT 1* и *GAPDH* сопоставимы (таблицы 1–5), оценку проводили по разнице среднего значения  $C_t$  для *SAT 1* и *GAPDH*.

Получены результаты оценки экспрессии гена *SAT 1* относительно гена *GAPDH* в слюне пациентов (медиана (мин/макс)): в ГС — 0,21 ( $-1,26/0,79$ ), группе ЛСП — 1,10 ( $-1,77/0,06$ ) и группы ЛППС — 1,68 ( $-2,86/0,72$ ). Достоверные отличия ( $p < 0,05$ , критерий Манна – Уитни) наблюдались в значениях относительной экспрессии гена *SAT 1* между ГС и группой ЛППС (рисунок 3).



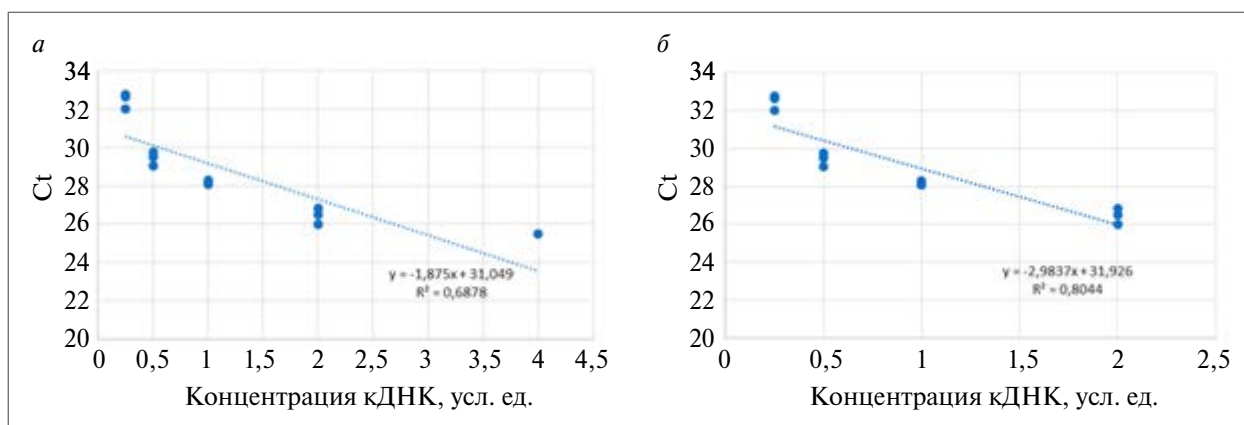


Рисунок 2 — Графики зависимости Ct ПЦР-РВ от концентрации кДНК гена *GAPDH*

Несмотря на достоверность различий в относительной экспрессии гена *SAT 1* в группе ЛППС, биологическая вариация данного признака высока (рисунок 3), поэтому требуется дополнительная валидация показателя относительная экспрессия гена *SAT 1* как потенциального биомаркера суицидального поведения.

**Заключение.** Применение слюны в качестве биологического материала для оценки экспрессии генов целесообразно вследствие возможности выделения РНК, пригодной для проведения ОТ ПЦР-РВ и неинвазивности процедуры получения данного биологического материала. В результате проведенного исследования впервые установлено, что относительная экспрессия гена *SAT 1* в слюне достоверно отличилась для ЛППС от значений данного параметра у ГС (ранее экспрессия гена *SAT 1* изучалась только в периферической крови лиц, совершивших парасуицид [2, 6]).

Таким образом, установлена целесообразность проведения дальнейших исследований, направленных на оценку возможности применять параметр относительной экспрессии гена *SAT 1* как генетического предиктора суицидального поведения у лиц, находящихся в состоянии суицидального кризиса.

### Список цитированных источников

1. Dissecting the shared genetic architecture of suicide attempt, psychiatric disorders, and known risk factors / N. Mullins [et al.] // *Biological Psychiatry*. — 2022. — Vol. 91, № 3. — P. 313–327.
2. Understanding and predicting suicidality using a combined genomic and clinical risk assessment approach / A. B. Niculescu [et al.] // *Mol Psychiatry*. — 2015. — Vol. 20, № 11. — P. 1266–1285.
3. Создание клеточных моделей инфекции, обусловленной *Mycoplasma pneumoniae* / Т. В. Глинкина [и др.] // От истоков к достижениям XXI века : сб. науч. тр. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посв. 90-летию БелМАПО, Минск, 7–8 окт. 2021 г. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Белорус. мед. акад. последипломн. образования; [редкол.: А. Н. Чуканов и др.]. — Минск, 2021. — С. 214–219.
4. Implication of SSAT by gene expression and genetic variation in suicide and major depression / A. Sequeira [et al.] // *Arch Gen Psychiatry*. — 2006. — Vol. 63, № 1. — P. 35–48.
5. Evidence of altered polyamine concentrations in cerebral cortex of suicide completers / G. G. Chen [et al.] // *Neuropsychopharmacology*. — 2010. — Vol. 35, № 7. — P. 1477–1484.

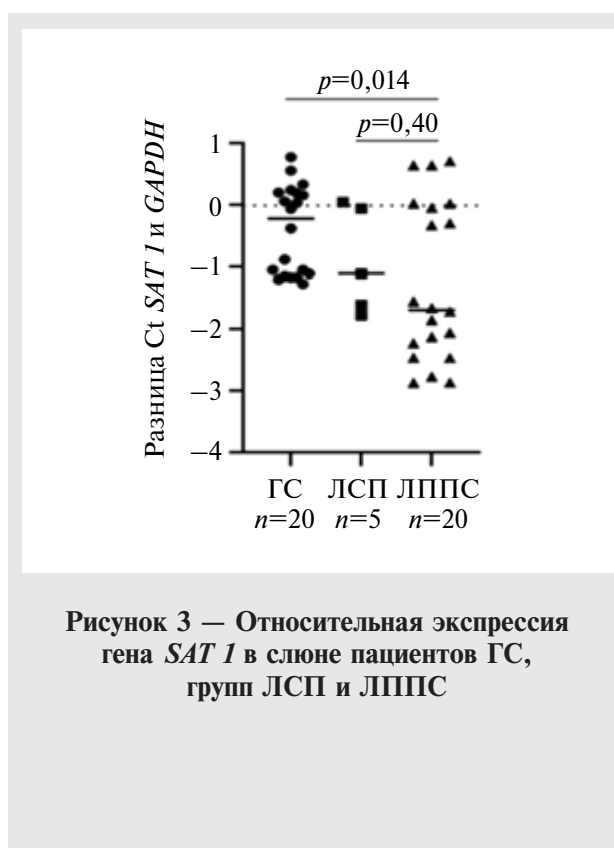


Рисунок 3 — Относительная экспрессия гена *SAT 1* в слюне пациентов ГС, групп ЛСП и ЛППС



6. Discovery and validation of blood biomarkers for suicidality / H. Le-Niculescu [et al.] // *Mol Psychiatry*. — 2013. — Vol. 18, № 12. — P. 1249–1264.
7. Nolan, T. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR / T. Nolan, R. E. Rebecca, S. A. Bustin // *Nat. Protoc.* — 2006. — Vol. 1, № 3. — P. 1559–1582.

## Methodological approach to identify genetic predictors of suicidal behavior

*Hlinkina T. V.<sup>1</sup>, Kastsiuk S. A.<sup>1</sup>, Davidouski S. V.<sup>1</sup>, Ibragimova J. A.<sup>2</sup>, Rudenkova T. V.<sup>1</sup>, Poluyan O. S.<sup>1</sup>, Kastsiuk D. D.<sup>3</sup>, Marchur S. I.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>State Educational Institution “The Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education”, Minsk, Republic of Belarus;*

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

*<sup>3</sup>Institute of Psychology of the University of Wrocław, Wrocław, Poland*

Currently, high attention is paid to the role of genetic factors in the study of suicidal behavior. In the course of this study of the expression of the SAT 1, SKA 2 and BDNF genes in the saliva of individuals who attempted suicide. The saliva of 20 persons who attempted suicide (PAS) was used as biological material; 5 persons who committed parasuicide (PCP) and 20 persons were included in the comparison groups (hereinafter referred to as GS) — persons who had undergone psychosocial stress and had not previously made suicidal attempts. To assess the possibility of analyzing the expression of the SAT 1, SKA 2, and BDNF genes in saliva, the values of the fluorescence threshold cycle (Ct) were determined during real-time PCR using cDNA samples obtained after reverse transcription of the RNA introduced into the reverse transcription reaction in the largest amount. A significant difference ( $p < 0.05$ , Mann — Whitney test) was observed in the value of the relative expression of the SAT 1 gene between the GS and the PAS group. For the SKA 2 and BDNF genes, the Ct values were more than 34.3, indicating a low level of detectable expression of the SKA 2 and BDNF genes in saliva.

**Keywords:** suicide, parasuicide, gene expression analysis, saliva, SAT 1.

*Поступила 24.06.2022*

УДК 57.083:616.2-002.1-008.6-092.9:612.017.12-005.6

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

*Матлакова М. А., Павлов К. И., Метелица Т. Г., Курклинская Г. А., Наборовская А. М., Хватова Л. А., Кундельская Л. М., Чегодаева Е. В.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) является важнейшей проблемой анестезиологии и реаниматологии. ОРДС характеризуется высокой летальностью, в связи с чем медицина XXI в. нуждается в новых актуальных знаниях о течении данного патологического процесса. С этой целью на сегодняшний день разрабатываются различные модели острого респираторного дистресс-синдрома, имеющие принципиальные различия в выборе экспериментального животного и контрольных характеристик, простоте постановки эксперимента и скорости получения результатов.

В статье предложена новая методика и представлены результаты экспериментального моделирования ОРДС с использованием кроликов и крыс Wistar.

**Ключевые слова:** острый респираторный дистресс-синдром, крысы Wistar, кролики, экспериментальное исследование.

**Введение.** Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС; J80, в соответствии с МКБ 10; СВ00, в соответствии с МКБ 11) — это острое диффузное поражение легких, развивающееся как неспецифическая воспалительная реакция на поражение паренхимы органа различной этиологии. Лечение пациентов с острым респираторным дистресс-синдромом требует значительных медицинских ресурсов. Пациенты с ОРДС подвержены высокому риску необходимости длительной искусственной вентиляции легких. Даже после окончания успешного восстановительного периода функциональные ограничения и предрасположенность к новым осложнениям требуют дополнительного лечения и обширной реабилитации реконвалесцентов. Последствия перенесенного острого респираторного дистресс-синдрома могут проявляться длительными нервно-мышечными, когнитивными и психологическими нарушениями.

Повышение эффективности лечения острого респираторного дистресс-синдрома является важной задачей для ученых в области фундаментальных и прикладных исследований. В последние годы было проведено множество исследований с целью улучшения методов лечения пациентов с ОРДС, обусловленных в первую очередь пандемией COVID-19. Предлагаются новые подходы к диагностике и лечению, расширяется доказательная база стандартных методов. Например, в 2020 г. было подтверждено, что высокопоточная назальная оксигенация через канюли является эффективным компонентом респираторной поддержки на ранних этапах ведения пациентов и после прекращения ИВЛ. Были охарактеризованы некоторые особенности течения ОРДС, вызванного новой коронавирусной инфекцией. Например, обнаружено, что показатели функционального состояния легких при COVID-19 могут оставаться в пределах нормы и не коррелировать с тяжестью гипоксемии. Также выявлено, что при коронавирусной инфекции ЛДГ и креатинин повышены чаще, чем тропонин; гистологические изменения в ткани сердца при этом не характерны. Текущие клинические рекомендации по лечению взрослых с острым респираторным дистресс-синдромом также были улучшены. Несмотря на острое воспаление, Всемирная организация здравоохранения

не рекомендует кортикостероиды для лечения острого респираторного дистресс-синдрома. Среди самых оригинальных новых подходов к ведению пациентов с COVID-19 можно отметить использование искусственного интеллекта, звуко- и вибротерапии. Алгоритмы машинного обучения были использованы для анализа данных, прогнозирования смертности и продолжительности пребывания в отделениях интенсивной терапии, а также определения риска осложнений.

Самые трудные для лечения клинические варианты коронавирусной инфекции характеризуются сочетанием повышенной продукции цитокинов, а также явлением иммунотромбоза. Для понимания зависимости данных явлений необходимо моделировать ОРДС и подробно описать его проявления.

Разработанные модели должны применяться для создания новых методов лечения и изменения актуальных руководств по ведению пациентов. Существуют различные модели респираторного поражения, среди них выделяются как асептические, так и микроорганизм-индуцированные. Одним из наиболее эффективных способов вызвать патологический процесс в респираторных путях лабораторного животного является интраназальное введение микроорганизма, однако ингаляционный путь требует использования дорогостоящего запорочного оборудования. Помимо этого, при данном способе поступления антигена сложно достичь достаточной интенсивности воспалительного процесса. Моделирование внутрилегочного заражения является технически трудной задачей. Представленные в научной литературе модели включают в себя внутрилегочное заражение крыс суспензией *Acinetobacter baumannii* посредством интубации (Taraz Z. и соавт., 2019) [1]; внутрилегочное заражение крыс суспензией *Streptococcus pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* посредством интубации (Van Oort, Pouline M. P. и соавт., 2019) [2]; колонизацию легких *Candida albicans* после внутриглоточной инкуляции крысам (Tan, X. и соавт., 2016) [3], что также требует наличие соответствующего оборудования для проведения эксперимента. Асептические модели представлены внутрилегочным введением крысам и мышам бактериального липополисахарида (Zhang S., et al., 2018) [4]; внутрилегочным вве-

дением крысам бактериального липополисахарида и масляной кислоты (Hagawane T. N., Gaikwad R. V., Kshirsagar N. A., 2016); [5] и внутривенным введением крысам раствора тромбопластина (Голубев А. М., Мороз В. В., Сундуков Д. В., 2005) [6]. При характеристике данных моделей не учтены нарушения в системе гемостаза, которые могут возникнуть при ОРДС. Поэтому следует предложить экспериментальную модель респираторного дистресс-синдрома, сочетающую признаки поражения легочной ткани и отражающую спектр нарушений в функционировании системы свертывания крови.

**Цель работы** — разработка экспериментальной модели оценки патогенетического потенциала острого респираторного дистресс-синдрома у лабораторных животных.

**Материалы и методы.** Для исследований использовали крыс-самцов линии Wistar. Возраст самцов — 3–4 месяца, вес тела в момент включения в эксперимент — 200–300 г. Животные содержались в соответствии с нормативами индивидуального размещения. Световой режим соответствовал естественному уровню освещенности в течение суток на географической широте г. Минска (53°54'N) в зимний и весенний периоды. Температура воздуха поддерживалась в пределах 20–22 °С, относительная влажность — 45–50 %. Животные получали стандартный рацион в количестве, определенном действующими нормами, в соответствии с рационом, разработанным в виварии БГМУ. Водный режим — *ad libitum*.

Также для исследования использовались беспородные кролики-самцы из вивария БГМУ, весом 3,5–4,5 кг, возрастом 12–15 недель. В период, предшествующий исследованию, животные потребляли стандартный рацион питания, включавший комбикорм и сено луговое.

Все манипуляции выполнялись у животных, фиксированных эластичным зондом, подвергнутых анестезии тиопенталом натрия из расчета 45 мг/кг массы животного. Моделирование ОРДС осуществлялось с использованием бактериального липополисахарида (ЛПС). Использовали внутрилегочное введение ЛПС. У наркотизированных животных в 6–8-м межреберье между лопаткой и грудным отделом позвоночника вводили 50 мкл раствора липополисахарида *E. coli* O111:B4 (концентрация раствора — 25 мг/мл) без непосредственного наблюдения (разреза). Контрольным животным внутрилегочно вводили тот же объем 0,9%-го раствора хлорида натрия. Обеим группам животных растворы вводились однократно.

Наблюдение за животными проводилось до момента их выведения из эксперимента. Часть животных была выведена спустя 5 ч после внутрилегочной инъекции, часть животных наблюдалась в течение 4 суток. Все иммунологические показатели и показатели крови были исследованы в материале, взятие которого производилось во время некропсии.

Суммарно исследования были выполнены на 45 крысах. Использовались 2 дозы ЛПС (10 и 20 мг/кг). Основная выборка исследованных животных как для опытной, так и для контрольной группы формировалась при некропсии, через 5 часов после введения ЛПС. Данный период для некропсии был использован для детекции признаков острого воспаления, включающих как активность цитокинов, так и возможные изменения в системе гемостаза. Некропсия через 5 ч выполнена для 13 животных опытной группы (ЛПС 10 мг/кг) и 12 животных контрольной группы (0,9%-й раствор хлорида натрия).

Выделенные препараты легких крыс после промывания в физиологическом растворе взвешивали, затем размещали на полимерной подложке белого цвета, фиксировали для визуальной оценки размеров и кровеносного рисунка.

Исследования показателей гемостаза были выполнены с использованием наборов для изучения показателей гемостаза производства ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских технологий». Учет результатов выполнен с помощью турбидиметрического гемокоагулометра CGL 2110 «СОЛАР» (ЗАО «Спектроскопия, оптика, лазеры — авангардные разработки», Республика Беларусь). Все исследования гемостаза были выполнены в течение двух часов от момента взятия крови.

Для исследования цитокинов использовались: ИФА-набор для определения IL-6, ИФА-набор для определения ФНО- $\alpha$  (производство VPlab, КНР, для крыс). Учет результатов осуществлялся с использованием микропланшетного ридера Rayto RT6100 (Rayto Life and Analytical Sciences Co., Ltd, КНР).

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи пакета статистической программы Statistica 10.0. Для морфологических признаков оценивали параметры среднего значения ( $M$ ) и стандартной ошибки среднего значения ( $Se$ ), медианы ( $Me$ ), интерквартильного (25 и 75% процентиля) и 95%-го доверительного интервалов (ДИ), максимального и минимального значения. Сравнение независимых выборок по количествен-

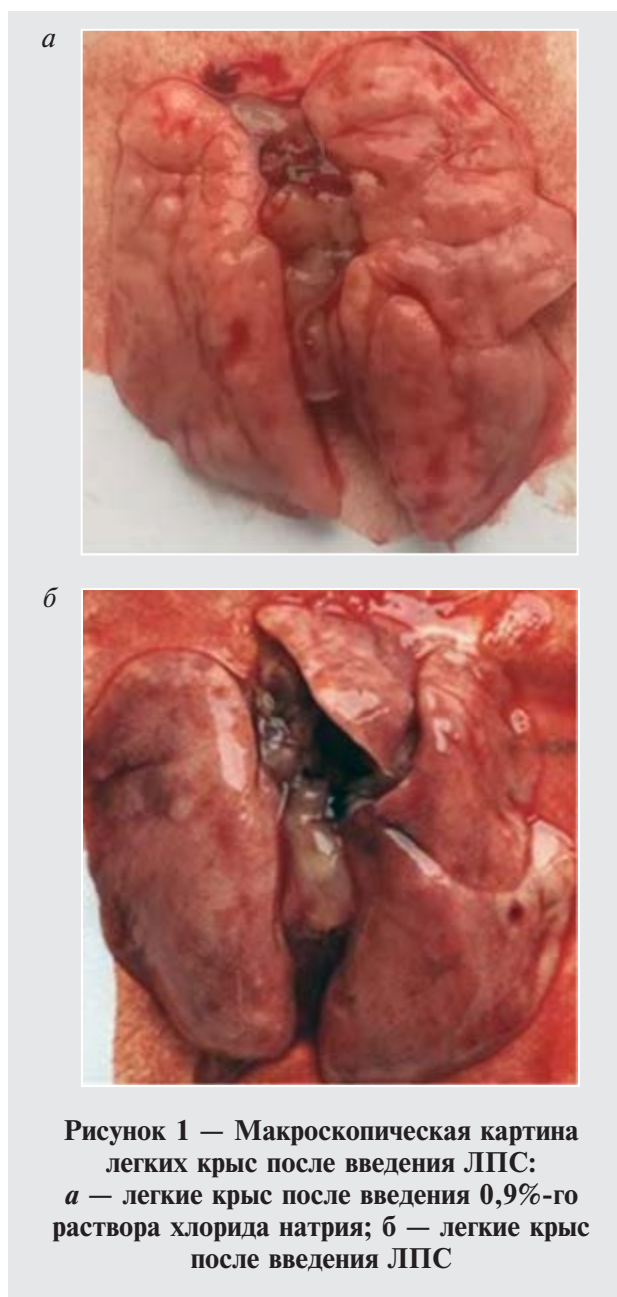


ным признакам проводилось с использованием дисперсионного анализа непараметрических данных ANOVA Манна – Уитни (*U*-критерий) с целью парного сравнения выборок, а также критерий Стьюдента для независимых выборок. Взаимосвязь между показателями определяли при помощи непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена (*rs*). Нулевую гипотезу о равенстве выборок отвергали при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** В серии экспериментов было установлено, что однократное внутрилегочное введение ЛПС приводило к острому локальному воспалительному процессу. Животные контрольной и опытной групп в первые 2 ч после введения находились под наркозом. Гибель животных опытной и контрольной группы в первые 5 ч составила 18,7 и 16,6 % соответственно. Клинические наблюдения после внутрилегочного введения как антигена, так и контрольного вещества выявили у животных одышку, пилоэрекцию, тремор, переворачивание. Нарушение двигательной активности соответствовало трем баллам по шкале S. Irwin. В течение данного периода прослеживалось затрудненное дыхание и увеличение его частоты. После пробуждения животные были относительно подвижны, пили и поедали корм.

По окончании срока эксперимента все животные были подвергнуты эвтаназии и некропии. При наружном осмотре опытные животные были правильного телосложения, удовлетворительного питания, выделений из естественных отверстий не обнаружено. Шерсть гладкая, блестящая, опрятного вида, очагов облысения не наблюдалось. Положение внутренних органов грудной и брюшной полостей без нарушений и особенностей. Париретальный и висцеральный листки плевры и брюшины тонкие, блестящие, гладкие. Макроскопический контроль легких крыс после введения ЛПС показал выраженные морфологические изменения самого органа (рисунок 1).

После введения бактериального ЛПС внутрилегочно у крыс развился патологический процесс, характеризовавшийся относительным изменением цвета легочной ткани, отеком, диффузными геморрагиями в паренхиме легких ярко-розового или красноватого цвета. Место введения визуально определялось интенсивными мелкоочаговыми кровоизлияниями в паренхиму темно-бордового или синюшного цвета. Вскрытие крыс контрольной группы, которым вводился 0,9%-й раствор хлорида



**Рисунок 1 — Макроскопическая картина легких крыс после введения ЛПС: а — легкие крыс после введения 0,9%-го раствора хлорида натрия; б — легкие крыс после введения ЛПС**

натрия, также выявляло геморрагию в месте введения, при этом прочих изменений в ткани легких не наблюдалось.

Патоморфологическое исследование не выявило изменений в органах и тканях крыс вне легких.

Были исследованы морфометрические параметры легких — отличия массы и размеров легких крыс. Морфометрические показатели легких животных в разных группах не характеризовались выраженными различиями (таблица 1). Следует отметить также отсутствие значительных различий в легочном коэффициенте крыс опытной и контрольной групп.

Таблица 1 — Изменение легочного коэффициента, показателей гемостаза, содержания цитокинов у крыс контрольной и опытной групп (все исследованные животные)

Параметр	Средние значения			
	Контрольная группа	Опытная группа		
		ЛПС	ЛПС+ тромбопластин	Тромбопластин
ТВ, с	32,3 ± 6,22	28,8 ± 7,01	30,9 ± 10,15	40,2 ± 4,90
ПВ, с	25,7 ± 1,71	19,6 ± 4,16	23,3 ± 1,70	22,6 ± 0,15
АПТВ, с	35,23 ± 1,84	35,19 ± 1,90	32,7 ± 0,70	29,1 ± 0,35
<i>m</i> легких, г	1,9 ± 0,08	1,94 ± 0,09	2,2 ± 0,16	1,7 ± 0,18
ЛК, %	0,79 ± 0,058	0,68 ± 0,035	0,87 ± 0,055	0,6 ± 0,004
IL-6, пг/мл	12,3 ± 2,43	14,2 ± 0,25	14,9 ± 2,81	4,5 ± 0,54
TNF-α, пг/мл	22,9 ± 1,47	25,3 ± 1,78	20,5 ± 0,58	25,5 ± 0,045

Примечание — ЛК — легочный коэффициент; ТВ — тромбиновое время; ПВ — протромбиновое время, АПТВ — активированное парциальное тромбопластиновое время.

В опытной группе животных, которым вводили только ЛПС ( $n = 22$ ), было зафиксировано увеличение значений таких показателей, как масса легких, концентрация IL-6, TNF-α, в сравнении с крысами, которым выполнялась инъекция 0,9%-го раствора хлорида натрия ( $n = 18$ ). В группе комбинированного введения ЛПС и тромбопластина ( $n = 3$ ) отмечено увеличение массы легких, ЛК, концентрации IL-6, однако данные изменения не носили достоверных различий с группой контроля.

Сравнение аналогичных показателей контрольной ( $n = 12$ ) и опытной групп ( $n = 13$ ) для

пятичасового исследования, приведенных в таблицах 2, 3, выявило, что у крыс опытной группы значение параметров АПТВ, IL-6, TNF-α было выше на 20,0 % ( $p = 0,019$ ), 35,1 % ( $p = 0,090$ ), 12,4 % ( $p = 0,447$ ). Уменьшение параметров ТВ, ПВ в опытной группе было значительным относительно контрольных животных, однако данные признаки характеризовались высокой индивидуальной вариативностью, без достоверных различий с животными, которым выполнялась инъекция 0,9%-го раствора хлорида натрия (26,0 % — для ТВ ( $p = 0,563$ ), 33 % — для ПВ ( $p = 0,155$ )).

Таблица 2 — Изменение легочного коэффициента, показателей гемостаза, содержания цитокинов у крыс контрольной и опытной групп (пятичасовое исследование)

Параметр	Средние значения показателей исследованных крыс	
	Опытная группа (ЛПС)	Контрольная группа
ТВ, с	23,9 ± 15,65	32,3 ± 6,24
ПВ, с	17,2 ± 9,60	25,7 ± 1,71
АПТВ, с	39,6 ± 2,23	33,0 ± 1,40
ЛК, %	0,68 ± 0,051	0,69 ± 0,071
IL-6, пг/мл	20,4 ± 0,23	15,1 ± 2,88
TNF-α, пг/мл	23,6 ± 2,92	21,0 ± 1,7

Таблица 3 — Достоверность сравнения легочного коэффициента, показателей гемостаза, системной активности цитокинов у крыс контрольной и опытной групп (пятичасовое исследование)

Критерий	Контрольная группа — Опытная группа (ЛПС)					
	ТВ	ПВ	АПТВ	ЛК	IL-6	TNF-α
T-критерий значимости	0,563	0,155	<b>0,0188</b>	0,939	0,090	0,447
Критерий Манна — Уитни	0,380	0,306	<b>0,015</b>	1,000	0,702	0,523

Таким образом, из 4 исследованных показателей гемостаза наиболее выраженные изменения после введения ЛПС отмечались в длительности АПТВ. Средняя длительность АПТВ у опытной группы животных, выведение

которых производилось спустя 5 ч после введения, составило 39,5 ± 2,23 с по сравнению с контрольной — 33,0 ± 1,40 с ( $p$ -критерий Стьюдента составил 0,019, критерий Манна — Уитни — 0,015). Удлинение АПТВ свидетельствует

об активации фибринолиза и гипокоагуляции.

Среди биохимических показателей, значимые изменения были обнаружены при оценке концентрации триглицеридов. В сыворотке крови крыс опытной группы как на 5-м часу после введения, так и спустя 4 суток наблюдения было выявлено повышение содержания триглицеридов ( $2,03 \pm 0,068$  ммоль/л против  $1,72 \pm 0,067$  ммоль/л,  $p = 0,004$  — для пятичасового исследования;  $2,00 \pm 0,053$  ммоль/л

против  $1,76 \pm 0,056$  ммоль/л,  $p = 0,005$  — все исследованные животные), что указывает на острое повреждение легких. Прочие биохимические показатели сыворотки крови не показали статистически значимых различий.

Внутрилегочная инъекция кроликам производилась без наркоза. Введение препарата животные переносили хорошо — без звуковой и двигательной реакции.

Клинические наблюдения за исследованными животными представлены в таблице 4.

Таблица 4 — Результаты наблюдения за кроликами-самцами

Группа	Срок наблюдения, ч	Клинические признаки
Опытная: кролик 1	24	Одышка появилась через 2 ч после введения. Зафиксировано покраснение конъюнктивы и слезотечение. В течение всего периода наблюдения кролик лежал на животе
	5	Беспокойство и одышка возникли сразу после введения. В течение всего периода наблюдения отмечались заторможенность, ступор, преимущественно лежачее положение. Спустя два часа к одышке присоединилось сипение при вдохе и признаки конъюнктивита
Контрольная: кролик 1	24	Весь период наблюдения животное было активно и подвижно. Охотно поедало корм (рисунок 2)
	5	Весь период наблюдения животное было подвижно. Дыхание сохранялось в норме

Однократное внутрилегочное введение ЛПС приводили к острому локальному воспалительному процессу также у кроликов. Клинические наблюдения после внутрилегочного введения выявили у животных заторможенность реакций, вялость, прослеживалась одышка, слезотечение, единичные подергивания, которые сохранялись 24 ч. В течение данного периода прослеживалось затрудненное дыхание и увеличение его частоты.

По окончании срока эксперимента животные были подвергнуты эвтаназии и некропсии. При наружном осмотре опытные животные были правильного телосложения, удовлетворительного питания, выделений из естественных отверстий не обнаружено. Шерсть гладкая, блестящая, опрятного вида, очагов облысения не наблюдалось. Зубы сохранены. Видимые слизистые оболочки бледной окраски, блестящие. Деформаций или отека конечностей не было. Брюшная полость выпота не содержала. Положение внутренних органов грудной и брюшной полостей без нарушений и особенностей. Parietalный и висцеральный листки плевры и брюшины тонкие, блестящие, глад-

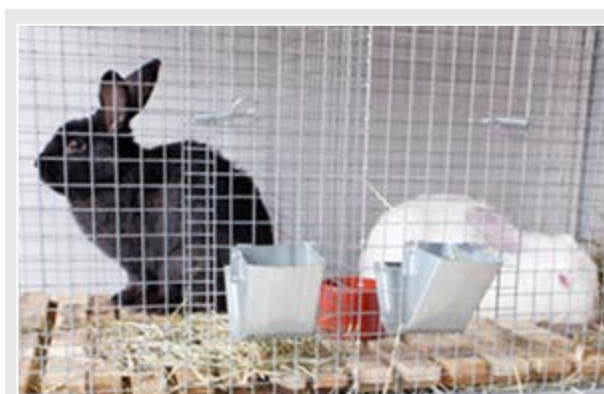


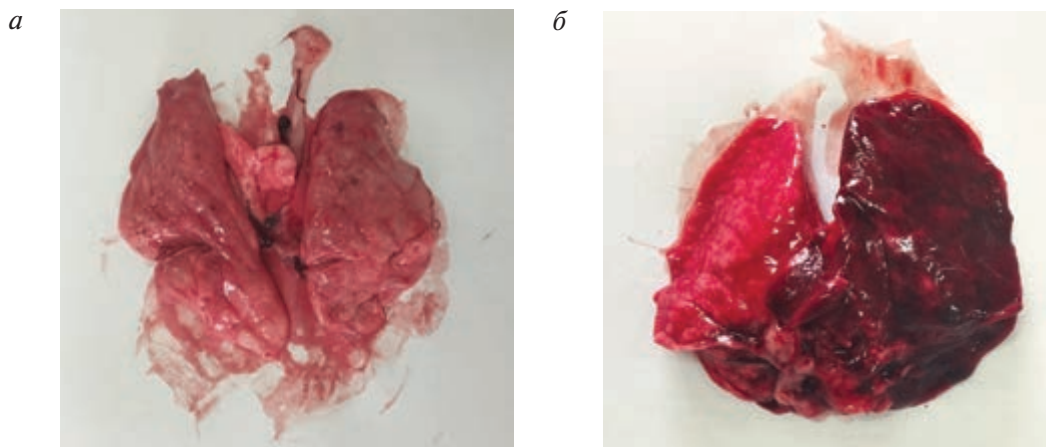
Рисунок 2 — Различия в двигательной активности кролика после внутрилегочного введения раствора хлорида натрия (черный) и раствора ЛПС (белый)

кие. Макроскопический контроль легких кроликов после введения ЛПС показал выраженные морфологические изменения самого органа (рисунок 3). После введения бактериального ЛПС внутрилегочно у кроликов развился пато-

логический процесс, характеризовавшийся обширным повреждением легкого, в которое производилось введение ЛПС, легкое отечное, темно-красного цвета с геморрагическим компонентом. Вскрытие кроликов контрольной группы, которым вводился 0,9%-й раствор хлорида натрия, также выявляло геморрагию в месте введения, при этом прочих изменений в ткани легких не наблюдалось.

Патоморфологическое исследование не выявило изменений в органах и тканях кроликов вне легких отсутствовали.

Различия в значении легочного коэффициента у исследованных кроликов было более выражено, чем у крыс. Сравнительные результаты для четырех исследованных животных представлены в таблице 5.



**Рисунок 3 — Макроскопическая картина легких кроликов после введения ЛПС:**  
*а* — легкие кроликов после введения 0,9%-го раствора хлорида натрия;  
*б* — легкие кроликов после введения раствора ЛПС

Таблица 5 — Морфометрическая характеристика внутренних органов кроликов-самцов (4)

Показатель	Внутрилегочное введение 0,9%-го раствора хлорида натрия (1)	Внутрилегочное введение бактериального ЛПС (2; 3)	Интактный (4)
Масса животного, кг	4,149	4,052; 3,840	3,620
Масса печени, г	178,7	130,9; 134,0	90,5
Масса сердца, г	16,5	18,1; 17,9	14,0
Масса легких, г	12,5	41,7; 24,4	12,6
Масса почек, г	22,7	20,2; 23,2	22,6
Масса надпочечников, г	0,8	1,2; 0,9	0,7
Масса селезенки, г	0,9	1,6; 2,8	0,8
Легочный коэффициент	0,30127	1,02912; 0,63541	0,34806

Легочный коэффициент у кроликов, которым вводили ЛПС, был в 2–3 раза выше, чем у животных контрольной группы.

**Заключение.** Модель ОРДС, вызванного внутрилегочным введением ЛПС, может быть реализована на обоих видах исследуемых животных. Клиническая картина демонстрирует проявления большей интенсивности после введения ЛПС кроликам: у опытных животных отмечается одышка, покраснение конъюнктивы и слезотечение, ступор, заторможенность, лежачее положение, затрудненное дыхание и сипение при вдохе. У крыс опытной группы

чаще наблюдается одышка и увеличение частоты дыхания. Патоморфологические изменения в ткани легких у кроликов по сравнению с крысами характеризуются большей наглядностью. Наблюдается более интенсивное распространение патологического процесса от зоны введения ЛПС по всей паренхиме с переходом на второе легкое, выраженные морфологические изменения, характеризующиеся отеком и диффузными кровоизлияниями.

Анализ показателей, полученных после забора крови, выявил незначительное увеличение концентрации цитокинов и укорочение време-



ни свертывания крови у крыс всех групп, кроме животных опытной группы 5-часового исследования. Длительность АПТВ в данной группе увеличилась, что свидетельствует об активации фибринолиза и гипокоагуляции. Также в сыворотке крови крыс опытных групп было выявлено повышение содержания триглицеридов, указывающее на острое повреждение легких.

Таким образом, нами разработана модель острого респираторного дистресс-синдрома с использованием двух видов животных, демонстрирующая разную интенсивность воспаления и видовую чувствительность у крыс и кроликов и оценивающая проявления иммунологически обусловленных нарушений гемостаза.

#### Список цитированных источников

1. Pharmacodynamics of Minocycline against *Acinetobacter baumannii* in a Rat Pneumonia Model / Z. Tarazi [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2019. — Vol. 63, № 2. — P. 1–8.
2. Exhaled breath metabolomics reveals a pathogen-specific response in a rat pneumonia model for two human pathogenic bacteria: a proof-of-concept / Pouline M. van Oort [et al.] // *J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* — 2019. — № 316. — P. L.751–L.756.
3. *Candida albicans* Airway Colonization Facilitates Subsequent *Acinetobacter baumannii* Pneumonia in a Rat Model / Tan Xiaojiang [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2016. — Vol. 60, № 6. — P. 3348–3354.
4. Pretreatment of ferulic acid attenuates inflammation and oxidative stress in a rat model of lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome / S. Zhang [et al.] // *International J. Immunopathology and Pharmacology*. — 2018. — Vol. 31. — P. 1–9.
5. Dual hit lipopolysaccharide & oleic acid combination induced rat model of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome / T. N. Hagawane, R. V. Gaikwad, N. A. Kshirsagar // *Indian J. Med. Res.* — 2016. — Vol. 143, № 5. — P. 624–632.
6. Острое повреждение легких, обусловленное тромбозом микрососудов / А. М. Голубев [и др.] // *Общая реаниматология*. — 2005. — Т. 1, № 3. — С. 17–20.

## Acute respiratory distress syndrome model in laboratory animals

*Matlakova M. A., Pavlov K. I., Metelitsa T. G., Kurklinskaya G. A., Naborovskaya A. M., Hvatova L. A., Kundelskaya L. M., Chegodaeva E. V.*

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

ARDS is a complex process and the management of patients with acute respiratory distress syndrome requires significant medical resources. Patients with acute respiratory distress syndrome have an increased risk that they may require prolonged mechanical ventilation. In order to increase the efficiency of studying the course of this disease, various models of acute respiratory distress syndrome are currently used, in this study a new technique is proposed and the results of experimental modeling of the pathological process of ARDS using Wistar rats and rabbits are presented.

**Keywords:** acute respiratory distress syndrome, Wistar rats, rabbits, experimental study.

*Поступила 15.06.2022*

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ХИРУРГИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЙ ПРИ БОЛЕЗНИ ГИРШПРУНГА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИХ НЕДОСТАТКОВ

Новицкая С. К.<sup>1,2</sup>, Дегтярев Ю. Г.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Государственное учреждение образования  
«Белорусская академия последипломного образования»,  
г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Государственное учреждение  
«Республиканский научно-практический центр детской хирургии»,  
г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>3</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** Для установления причин неудовлетворительных результатов после лечения болезни Гиршпрунга была разработана экспериментальная модель операции. Она осуществлялась путем прерывания парасимпатической иннервации дистального отдела толстой кишки. В дальнейшем проводилась оценка функциональных и морфологических изменений желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). В результате проведенного эксперимента установлено, что в условиях экстрамуральной денервации терминальной части толстой кишки сохраняется возможность рефлекторных взаимодействий между подвздошной и денервированной ободочной кишки. При гистохимическом исследовании собственной пластинки слизистой оболочки установлено увеличенное накопление ацетилхолинэстеразы в лишенной иннервации кишке, что объясняется ее денервацией и ишемией.

**Ключевые слова:** болезнь Гиршпрунга, экспериментальная модель операции, парасимпатическая иннервация, гистохимическое исследование, ацетилхолинэстераза.

**Введение.** Болезнь Гиршпрунга — первичная нейронная кишечная дисплазия, морфологическим проявлением которой является сужение пораженного участка кишки, распространяющееся в каудальном направлении вплоть до анального отверстия (сопровождается гипертрофией предлежащей нормально иннервированной кишки) и клинически проявляющееся упорными хроническими запорами, вплоть до полной непроходимости. Основная цель радикальной операции — резекция суженного аганглионарного и расположенного выше гипертрофированного участка кишки с низведением на промежность предварительно мобилизованной нормально иннервированной кишки при максимальном сохранении мышечного аппарата анальных сфинктеров и структуры анального канала. С момента начала оперативного лечения прошло более 100 лет и за это время предложены различные операции, разработанные в соответствии с уровнем развития анатомии, хирургии, анестезиологии. В настоящее время «золотым стандартом» лечения является трансанальное низведение кишки. Операция является эффективной в большинстве случаев

и может быть выполнена в периоде новорожденности. В ГУ «РНПЦ детской хирургии» выполняется с 2010 г. Несмотря на множество предложенных методов лечения в послеоперационном периоде часто отмечаются неудовлетворительные результаты: запоры отмечаются у 25 % детей после трансректального низведения толстой кишки и у 17 % пациентов, оперированных способами Дюамеля [1].

При любом виде операции возникает нарушение иннервации кишки при ее мобилизации и низведении. При изучении отдаленных результатов установлено, что после операции у детей возникают длительные запоры (стул отсутствует по 5–7 суток), угнетаются позывы на дефекацию. В литературе отсутствуют сведения об изменении механизмов регуляции моторики кишки в подобных условиях. Неизвестно, как происходит функционирование кишки как единого целого органа и какова роль его отдельных компонентов. В связи с этим мы решили провести экспериментальные исследования.

Для установления причин неудовлетворительных результатов после лечения была разработана экспериментальная модель операции.

Она осуществлялась путем прерывания парасимпатической иннервации дистального отдела толстой кишки. В дальнейшем проводилась оценка функциональных и морфологических изменений ЖКТ.

**Цель работы** — изучение ранних и отдаленных системных функциональных и морфологических изменений желудочно-кишечного тракта с помощью экспериментального моделирования операций, вариантов осложнений и неблагоприятных отдаленных последствий; изучение механизмов нервно-рефлекторных взаимодействий при создании модели экстрамуральной денервации и стеноза нисходящей ободочной кишки.

**Материалы и методы.** Экспериментальная работа осуществлена на базах центральной научно-исследовательской лаборатории Белорусского государственного медицинского университета и института физиологии НАН Республики Беларусь. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с правилами,

утвержденными Министерством здравоохранения СССР 6 июля 1973 г., и в соответствии с Директивой Совета ЕС от 24 ноября 1986 г. по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (86/609/ЕЕС), в индивидуальных клетках при температуре 18–22 °С, 12 ч — свет, 12 ч — темнота. Был установлен режим проветривания, обеспечивающий смену 15 объемов помещения в час, концентрацию CO<sub>2</sub> не более 0,15 объемных процентов. Использовали белых самцов крыс линии Вистар массой от 330 до 350 г. Животные получали стандартный пищевой рацион (ПК–120–1) и воду, соответственно ГОСТу «Вода пищевая» 2874-82. Эксперименты проводили согласно протоколу испытаний, который был одобрен комитетом по этике БГМУ.

Создавали модель операции Де ла Торре путем прерывания парасимпатической иннервации дистального отдела толстой кишки из S2-S4 (рисунок 1).

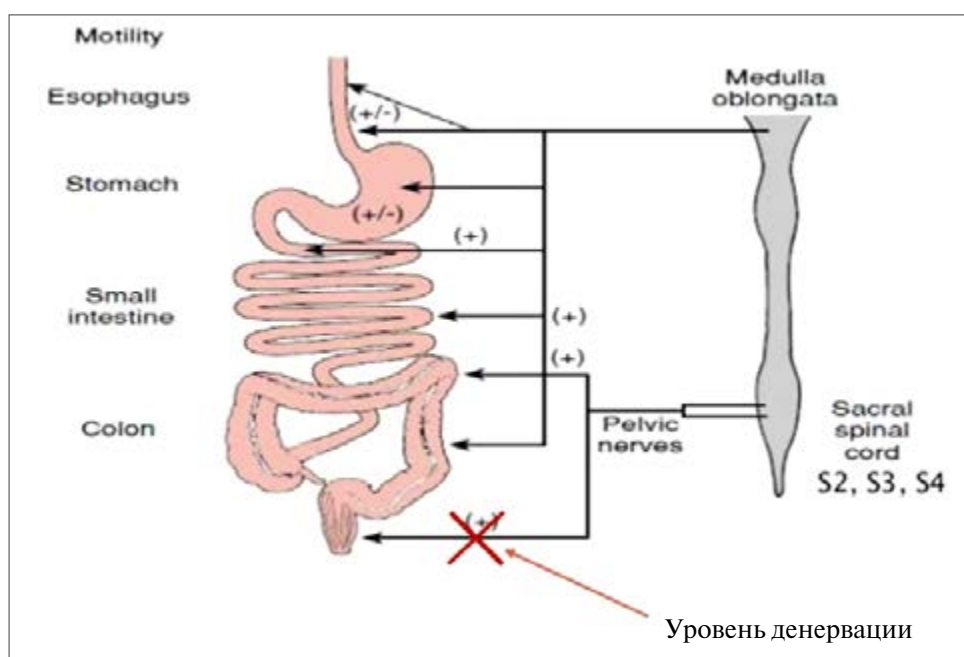


Рисунок 1 — Схема парасимпатической иннервации

**Методика операции:** осуществляли разрез, отступая 3 мм от слизисто-кожного перехода по задней полуокружности кожно-слизистого перехода прямой кишки. С помощью зажима мобилизовали кишку на расстоянии 3 см по задней стенке кишки до переходной складки брюшины, пересекая нервный ствол, прерывая иннервацию S2-S4 от спинного мозга к стенке кишки. Осуществляли гемостаз. Операционная рана по-

слойно ушивалась отдельными узловыми швами. Время операции составила 15 ± 4 мин. Животные были разделены на две группы: первая с созданной экспериментальной моделью операции Де ля Торре, вторая — контрольная группа здоровых животных. Были соблюдены одинаковые условия проживания и одинаковое питание. Обе группы животных были адаптированы к контакту с человеком и приучены к

нахождению в руках. Фиксировали общее состояние животных, измеряли кратность актов дефекации, объем и характер каловых масс. Условия проживания обеих групп животных и их количество также были идентичными, что позволило оценить их поведенческие особенности.

Через три недели животных выводили из эксперимента, проводили гистохимическое исследование активности ацетилхолинэстеразы в разных отделах толстой кишки.

*Моделирование стеноза толстой кишки.* Модель стеноза выполнена на крысах по следующей методике: после лапаротомии в 4 см от прямой кишки сквозь разрез брюшной полости вблизи стенки нисходящей ободочной кишки проводили силиконовую полоску шириной 2 мм. Соединяли нитью концы полоски, формируя кольцо, свободно вращающееся вокруг

кишки. Диаметр кольца формировали на 1–2 мм больше диаметра кишки для того, чтобы данный зазор частично сохранял естественную ее проходимость. Острые опыты проводили через 9–14 дней после указанных операций. Во время них регистрировали потенциалы гладких мышц (ПГМ) подвздошно-толстокишечного комплекса.

**Результаты и их обсуждение.** При моделировании низведения кишки на промежность животные наблюдались в течение трех недель. Экспериментальная группа животных вела себя беспокойно, животные часто прятались в угол клетки, избегали контакта с человеком, легкие касания боковой поверхности живота вызывали писк и беспокойство. Попытки взять экспериментальное животное в руки сопровождались выраженным нежеланием. Поведенческие реакции животных отражены в таблице 1.

Таблица 1 — Физиологические данные экспериментальной и контрольной групп животных

Критерий	Группа 1 (эксперимент) (n = 3)	Группа 2 (контроль) (n = 3)
Общее состояние	Защитная реакция: избегают контакта с человеком, на руках сидят неохотно, при касании пищат	Активные, поведение спокойное
Стул (длина, консистенция)	0,7–0,8 см Неплотный, глинообразный	0,3–0,5 см Плотный, оформленный

У животных первой группы отмечался несформированный, глинообразный характер кала, объясняемый обтеканием сформированного плотного калового камня, у животных контрольной группы при одинаковом характере кормового и пищевого режимов стул был плотной консистенции. Эти данные указывают на нарушение функции и растяжение нижних отделов толстой кишки у экспериментальной группы животных. Для объективизации результатов проводился подсчет каловых комочков и измерялись их размеры (длина). Установлено, что у животных первой группы среднее количество кала в сутки составило  $37,25 \pm 7,8$  ед., а у животных контрольной —  $44 \pm 16,2$  ед. ( $p > 0,005$ ). Усредненная длина каловых масс у экспериментальных животных была 0,7 см, у контрольной — 0,5 см ( $p > 0,005$ ).

Для выяснения нарушения механизма пассажа кишечного содержимого животные через три недели выводились из эксперимента. При вскрытии животных установлено: каловые массы в экспериментальной группе животных были расположены на протяжении  $5 \pm 1,4$  см во всей терминальной части толстой кишки (в

контрольной группе — на расстоянии  $2 \pm 0,7$  см ( $p > 0,005$ ).

Отмечалось увеличение в диаметре дистальных отделов толстой кишки у экспериментальных животных  $0,9 \pm 0,3$  см на 30 % по сравнению с контрольной группой  $0,4 \pm 0,2$  см ( $p > 0,005$ ) животных.

Проводилось гистохимическое исследование биопсийного материала (стенка дистального отдела толстой кишки) для изучения активности ацетилхолинэстеразы. При гистохимическом исследовании собственная пластинка слизистой оболочки была пронизана густой сетью АХЭ-позитивных сплетений с высокой активностью фермента. Установлено, что накопление ацетилхолинэстеразы в смоделированной, лишенной иннервации кишке значительно больше, чем в нормально иннервированном участке толстой кишки.

В результате проведенного исследования можно обозначить, что полученные морфологические изменения в денервированном участке толстой кишки, в том числе подтвержденные гистохимическим методом, имеют сходство с болезнью Гиршпрунга. Что под-



тверждено и клиническими экспериментальными данными — более редкий и плотными каловыми массами.

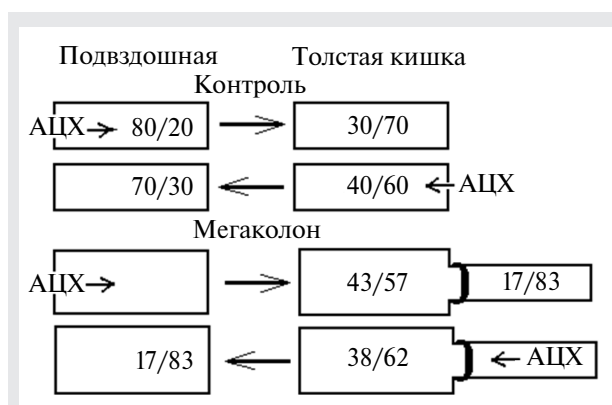
Во второй серии эксперимента для изучения механизмов физиологического функционирования пассажа содержимого по нижним отделам желудочно-кишечного тракта проводились запись потенциалов гладких мышц между подвздошной и толстой кишкой (ПГМ). В контрольной группе ПГМ подвздошно-толстокишечного комплекса во всех опытах были представлены высокоамплитудными медленными волнами (иногда с наложенными спайками) в подвздошной кишке и медленными волнами меньшей амплитуды, но более продолжительными с периодически возникающими длительными вспышками пиковых разрядов высокой амплитуды в нисходящей ободочной кишке.

Для изучения тонкотолстокишечного взаимодействия стимулировали перистальтику аппликацией ацетилхолина (АЦХ) нейромедиатором, осуществляющим нервно-мышечную передачу, стенку толстой и тонкой кишки. В 10 (100 %) опытах установлено, что аппликация ацетилхолина (АЦХ) на серозную оболочку подвздошной кишки вызывала в 8 (80 %) случаях местное торможение. Одновременно регистрируемые в толстой кишке ответы в семи (70 %) случаях приводили к усилению сокращений гладкой мускулатуры кишки. Напротив, стимуляция холиномиметиком толстой кишки сопровождалась в шести (60 %) случаях местным увеличением амплитуды ПГМ, тогда как проксимальнее, в подвздошной кишке, ответ был преимущественно в виде торможения у семи (70 %) животных. Таким образом, если при раздражении подвздошной кишки в ободочной кишке наблюдали чаще стимулирующий эффект, тогда как в обратном направлении (с ободочной на подвздошную) в большем числе проб отмечен тормозной рефлекторный ответ.

В следующей серии опытов на фоне сформировавшегося мегаколона подвздошно-толстокишечные медленные потенциалы, в отличие от контроля, сопровождались высокоамплитудными вспышками спайковых потенциалов, свидетельствующих о мощных сокращениях, растянутых, наполненных кишечным содержимым петель. В толстой кишке медленные волны либо отсутствовали, либо были низкоамплитудными с наложенной спайковой высокоамплитудной активностью.

Опыты показали, что аппликация АЦХ на нерасширенную (дистальнее преграды) тол-

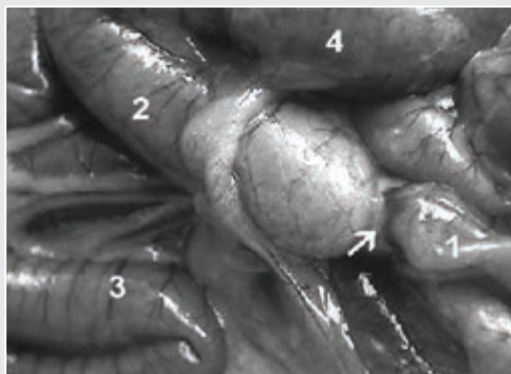
стую кишку приводит к увеличению амплитуды ПГМ гипертрофированного участка восходящей ободочной и подвздошной кишки в 8 (80 %) случаях. Наложение полоски, пропитанной холиномиметиком, на расширенную подвздошную кишку сопровождалось усиленным в 8 (80 %) случаях ответом нормального (нерасширенного) участка толстой кишки и неопределенной реакцией, гипертрофированной восходящей ободочной кишки, обусловленным разнонаправленностью изменений моторики, что отражено на схеме (рисунок 2).



**Рисунок 2 — Схема развития реакций подвздошной и толстой кишки на действие ацетилхолина (АЦХ — область аппликации холиномиметика (цифрами обозначено соотношение тормозящих (слева) и возбуждающих реакций, %)**

На рисунке представлена схема развития реакций подвздошной и толстой кишки на действие ацетилхолина. Большими стрелками обозначено направление развития рефлекторных реакций в пределах подвздошно-толстокишечного комплекса. В контроле у здоровых крыс при воздействии АЦХ на подвздошную кишку отмечали дистальнее стимулирующий эффект, тогда как в краниальном направлении, с ободочной на подвздошную, наблюдали торможение. В условиях мегаколона и денервации толстой кишки регистрируется повышенная миоэлектрическая активность гипертрофированной (толстой) и расширенной (подвздошной) кишки. Как спонтанная активность, так и ответы на стимуляцию холиномиметиком характеризовались местно и отдаленно увеличением амплитуды ПГМ (главным образом, пиковых), а в составе фазовых эффектов преобладало усиление.

На рисунке 3 представлены результаты формирования гипертрофированной толстой кишки.



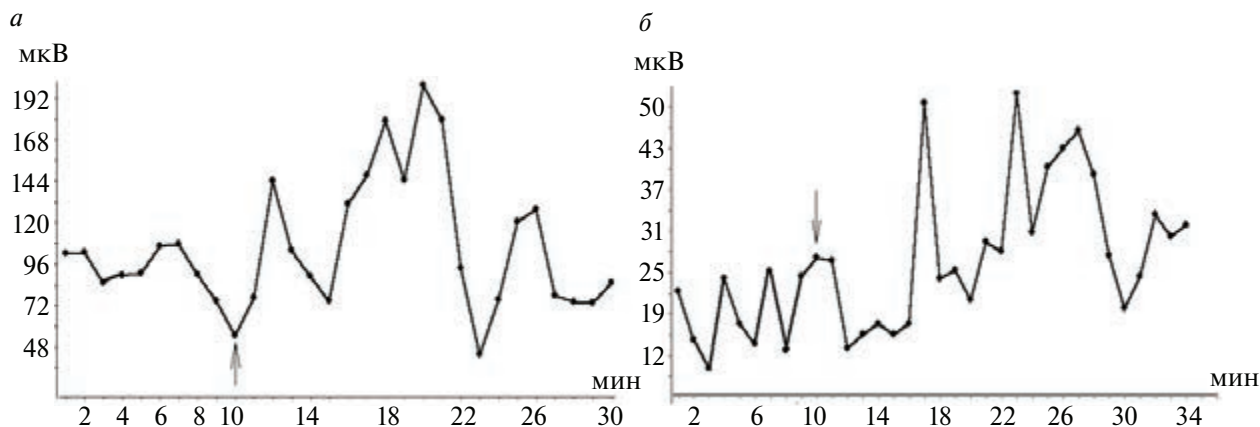
**Рисунок 3 — Макроморфологическая картина подвздошно-толстокишечного фрагмента**

Стрелка указывает на пережимающее кольцо. Проксимальнее последнего расположен расширенный участок толстой кишки (2) ниже — спавшийся участок нисходящей кишки. Слепая (4) и подвздошная кишка (3) расширены (14-е сутки после операции формирования окклюзии).

Толщина и диаметр просвета кишки крысы подвергаются увеличению проксимальнее искусственной преграды из-за гипертрофии и гиперплазии гладкой мускулатуры. Наблюдали также увеличение размера гладкомышечных клеток, уменьшение плотности иннервации гипертрофированной кишки, неоангиогенез и гипертрофию энтеральных и сенсорных (дорсальные корешковые ганглии) нейронов.

Взаимодействие и координация ПГМ между подвздошной и ободочной кишкой в условиях экстрамуральной денервации кишки привели к предположению о том, что экстрамуральные кишечные нервы не играют главную роль в гипертрофии кишечной мышцы, а интактная интрамуральная нервная система в этих условиях обеспечивает перистальтические рефлексы в полном объеме [2].

Запись изменения амплитуды потенциалов гладких мышц при раздражении АЦХ восходящей ободочной кишки и рефлекторный ответ подвздошной кишки на это воздействие у крыс с обструктивным мегаколоном представлена на рисунке 4.



**Рисунок 4 — Амплитуда потенциалов гладких мышц: а — ободочная кишка; б — подвздошная кишка (Стрелка «вверх» указывает момент нанесения раздражения, а стрелка «вниз» — на рефлекторный ответ подвздошной кишки.)**

Полученные в экспериментальных исследованиях на крысах данные свидетельствуют, что в условиях денервации терминальной части толстой кишки сохраняется возможность рефлекторных взаимодействий расширенных участков дистальной части подвздошной кишки и ободочной кишки. Однако рефлекторные влияния на активность гладких мышц тех и других сегментов кишки существенно изменены по регистрируемым реакциям: отсутствует четкая направленность эффектов. Предполагается, что в данных нарушениях моторной функции ведущую роль играет расстройство

механизмов нервного взаимодействия в илеоцекальной области.

В результате проведенного эксперимента установлено, что в течение 2–3 недель после разрушения нейронов развивается нарушение ноцицептивных реакций. Активизация перистальтики и гипертрофия проксимальных отделов кишки являются компенсаторной реакцией, и она формируется для продвижения кишечного содержимого через денервированную и стенозированную зону [3, 4].

**Закключение.** Предложенная методика операции позволяет воспроизвести операцию Де

ла Торре для изучения результатов лечения в клинической практике. Причиной осложнений является интраоперационное нарушение парасимпатической иннервации из S2–S4 низводимой кишки при выделении таковой из окружающих тканей и явлениями ишемии стенки кишки, проявляющееся симптоматикой болезни Гиршпрунга. Как следствие, данные пациенты нуждаются в дальнейшем симптоматическом лечении или повторной операции.

Доказано, что денервация и сужение толстой кишки приводит к увеличению давления в подвздошной и слепой кишке. Полученные данные доказывают необходимость, как можно раньше устранять препятствие для пассажа кишечного содержимого и, соответственно, уменьшать возраст, в котором проводится радикальная операция — резекция денервированного участка кишки.

В то же время установлено, что даже в условиях денервации терминальной части тол-

стой кишки сохраняется возможность рефлекторных взаимодействий расширенных участков дистальной части подвздошной кишки и ободочной кишки. Это подтверждает сохранение интрамуральных нервных связей при резекции участка толстой кишки. Экстрамуральная денервация и сужение толстой кишки при низведении на промежность, особенно при сужении и на протяжении, приводят к увеличению давления в подвздошной и слепой кишке и не приводит к расслаблению толстой кишки в ответ на раздражение подвздошной. Возможно, этим объясняются гипертрофия терминального отдела подвздошной кишки и перфоративные язвы при энтероколите, встречающиеся в послеоперационном периоде после лечения болезни Гиршпрунга. Нарастание этого состояния со временем указывает на необходимость, как можно быстрее уменьшать возраст, в котором проводится радикальная операция.

#### Список цитированных источников

1. Холостова, В. В. Эндохирургическое лечение хронических запоров органического происхождения у детей / В. В. Холостова, Е.Ю. Ермоленко // *Детская хирургия*. — 2019. — № 7. — С. 14–22.
2. Вавилова, Т. И. Гистохимическая диагностика болезни Гиршпрунга / Т. И. Вавилова, Г. И. Воробьев, А. П. Жученко // *Хирургия*. — 1986. — № 3. — С. 15–22
3. Problems of carcinogenesis / Y. Degtyarev [et al.] // *Inter. J. Current Advanced Research*. — 2020. — Vol. 9, № 3 (C). — P. 21603–21605. DOI: 10.24327/ijcar.2020.
4. Outcome of transanal endorectal vs. transabdominal pull-through in patients with Hirschsprung's disease / P. Romero [et al.] // *Langenbecks Arch. Surg.* — 2011. — 396 p.

## Modeling of surgical operations in Hirschsprung's disease to identify their shortcomings

*Novitskaya S. K.<sup>1,2</sup>, Degtyarev Yu. G.<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup> *State Educational Institution "The Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education", Minsk, Republic of Belarus;*

<sup>2</sup> *State Institution "Republican Scientific and Practical Center of Pediatric Surgery", Minsk, Republic of Belarus;*

<sup>3</sup> *Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

To establish the reasons for unsatisfactory results after treatment of Hirschsprung's disease, an experimental model of the operation was developed. It was carried out by interrupting the parasympathetic innervation of the distal colon. In alater experiment, functional and morphological changes of the gastrointestinal tract were evaluated. As a result of the experiment, it was found that in the conditions of extramural denervation of the terminal part of the colon, the possibility of reflex interactions between the ileum and the denervated colon remains. Histochemical examination of the own plate of the mucous membrane revealed an increased accumulation of acetylcholinesterase in the innervated intestine, which is explained by its denervation and ischemia.

**Keywords:** hirschsprung's disease, experimental model of surgery, parasympathetic innervation, histochemical examination, acetylcholinesterase.

*Поступила 14.06.2022*

УДК 616.132.2

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕОАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ В СТЕНТИРОВАННЫХ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЯХ

*Владимирская Т. Э., Адзерицо И. Э., Швед И. А., Михневич Д. Л., Жилкевич А. В.*

*Государственное учреждение образования  
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** В статье представлены результаты исследования неоатеросклеротических поражений стентированных коронарных артерий на аутопсийном материале умерших с инфарктом миокарда. Были использованы общегистологический и иммуногистохимический методы. Все полученные количественные данные подвергались статистической обработке. Установлено, что через 1–3 месяца после оперативного вмешательства признаки внутривенного атеросклероза обнаруживались у 26,7 % умерших. В 73,3 % случаев с неоатеросклерозом стенты стояли в коронарных артериях более года. Развившиеся неоатеросклеротические бляшки были зрелыми, 80 % неоатеросклеротических поражений относились к уязвимым бляшкам дистрофически-некротического или эрозивно-воспалительного типов. В коронарных артериях с неоатеросклерозом наблюдалось статистически значимое снижение экспрессии PDGF и Tgf- $\beta$ 1 ( $p < 0,001$ ) по сравнению с нестентированными атероматозными участками, что является неблагоприятным прогностическим фактором нестабильности бляшки.

**Ключевые слова:** неоатеросклероз, нестабильная бляшка, стентирование, тканевые факторы роста.

**Введение.** Эндоваскулярные вмешательства открыли новый этап в кардиологии, значительно расширив возможности лечения ишемической болезни сердца (ИБС), дополняя, а в некоторых случаях и вытесняя другие методы лечения. По интенсивности развития коронарное стентирование опередило все предыдущие технологии коронарной ангиопластики. Однако у данного метода был выявлен ряд факторов, лимитирующих его эффективность и применение, основным из которых был и продолжает оставаться рестеноз коронарных артерий (КА), возникающий через 6–12 месяцев после имплантации стента [1]. Возникновение рестеноза связано с нарушением целостности атеросклеротической бляшки (АСБ) и эндотелия сосуда. Причины и механизмы формирования неоатерогенных изменений в стентированных коронарных артериях до сих пор недостаточно изучены. Было предложено несколько механизмов, включая неполную эндотелизацию стента, приводящую к эндотелиальной дисфункции [2]. Эта неспособность поддерживать полностью функциональный, компетентный эндотелий проявляется плохо сформированными клеточными соединениями, сниженной экспрессией антитромботических молекул и

снижением продукции оксида азота. Нарушенная барьерная функция эндотелия позволяет проникать молекулам липопротеинов и протеогликанов в субэндотелиальное пространство на начальной стадии процесса неоатеросклероза [2]. В стентах с лекарственным покрытием (СЛП) регенерация эндотелиального барьера может замедляться действием антипролиферативных препаратов, которое усугубляется повреждением гладкомышечных (ГМК) и эндотелиальных (ЭК) клеток [3]. Неоатеросклероз в стенке гистологически характеризуется накоплением насыщенных липидами пенистых макрофагов с образованием липидно-некротического ядра и/или очагов кальцификации. Морфологическая картина обнаруженных поражений также соответствует по строению нестабильной фиброатеромы с тонкой крышкой [4]. Еще одним отличием неоатерогенных процессов от атеросклероза в нестентированных сосудах является скорость, с которой происходит их развитие, — если в нестентированных сегментах формирование атером занимает годы, то в стентированных участках признаки формирования атеромы проявляются уже через несколько месяцев после операции [4]. Неоатеросклероз не является добро-



качественным процессом и может привести к позднему и очень позднему тромбозу стента вследствие разрыва стеновой бляшки. Нестабильность бляшки может быть связана с избыточной экспрессией тканевых факторов роста. Некоторые ростовые факторы, такие как тканевый фактор роста (TGF- $\beta$ 1), показаны в качестве промотора неоинтимальной гиперплазии [5, 6]. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является белком, стимулирующим неоангиогенез [7] в атероматозных бляшках и в гиперплазированной интиме при атеросклерозе [8]. В настоящее время новой областью при изучении патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний является изучение роли фактора роста тромбоцитов (PDGF). PDGF-белковый фактор роста, участвует в регуляции процессов острого воспаления. Окисленные липопротеиды низкой плотности могут индуцировать секрецию фактора роста тромбоцитов и запускать активацию рецепторов к PDGF в ГМК сосудов [9]. Диагноз неоатеросклероза можно поставить на вскрытии или с помощью расширенной визуализации коронарных артерий [10]. Тем не менее, учитывая, что интракоронарная визуализация обычно не проводится и что многие кардиологи не знакомы с сущностью неоатеросклероза, некоторые врачи могут спутать поздний тромбоз стента из-за неоатеросклероза с неадекватной антитромбоцитарной терапией или нарушением целостности стента.

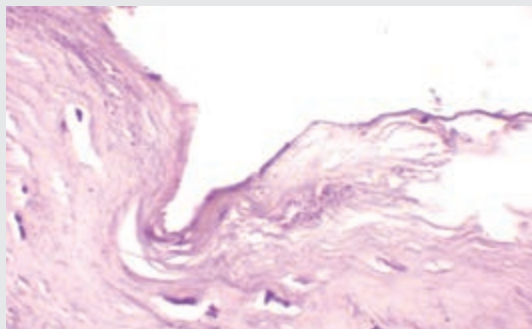
**Цель работы** — изучение патоморфологических изменений в стентированных коронарных артериях в участках неоатеросклеротических поражений на аутопсийном материале.

**Материалы и методы.** Забор аутопсийного материала осуществлялся на базах УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро» и УЗ «Минское областное патологоанатомическое бюро». Материалом для морфологического исследования были коронарные артерии со стентами 69 умерших с инфарктом миокарда. Артерии вскрывались в соответствии с методом патологоанатомического вскрытия коронарных артерий после стентирования [11]. Для исследования отбирались участки стентированных артерий в зоне и вне зоны стента. Полученный аутопсийный материал подвергался стандартной процедуре фиксации (10 % нейтральный формалин), проводке по спиртам возрастающей концентрации и заливке в парафиновые блоки. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3 мкм на микротоме Leica RM2265 (Leica, Гер-

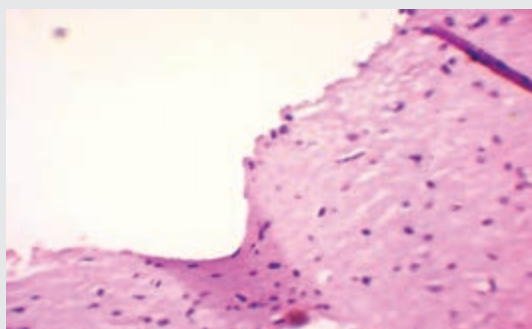
мания), которые окрашивали гематоксилин-эозином. Иммуногистохимическое исследование уровня экспрессии биомаркеров проводилось с использованием моноклональных антител PDGF-B (R&D systems, США) с разведением 1:100, TGF- $\beta$  и VEGF (Thermo Fisher Scientific, США) с разведением 1:30 и 1:300 соответственно. В качестве системы визуализации использовалась Expose Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit (Abcam, США), содержащая комплекс вторичных антител и хромоген диаминобензидин (DAB). Количественную оценку экспрессии биомолекулярных маркеров выполняли путем анализа цифрового изображения, полученного с помощью микроскопа Leica DMLS с программным обеспечением (Германия) и цифровой камерой JVC (при увеличении в 200 раз и минимальном количестве полей зрения 20) с использованием программы для морфометрии Aperio Image Scope 12.3.3. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием пакета статистических программ Statistica 10.0 (Version10-Index, StatSoft Inc., США). Представление результатов: Me (медиана) — значение, справа и слева от которого на оси значений признака располагаются равные количества значений признака данной выборки; 25; 75 перцентиль. Результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** При микроскопическом исследовании коронарных артерий после извлечения стентов признаки внутривентрикулярного атеросклероза обнаружались на аутопсиях у 15 пациентов (количество сегментов КА с НСБ — 45, с АСБ — 30). Осложнения стентирования клинически и патологоанатомически были верифицированы у 7 (46,7 %) человек, из них тромбозы стента отмечались у 6 человек (40 %), рестеноз был выявлен у одного пациента, женщины 64 лет, срок после операции 3 месяца. Большинство умерших — мужчины, средний возраст 62 (49; 72) года. У четырех умерших признаки неоатеросклероза развились через 1–3 месяца после операции.

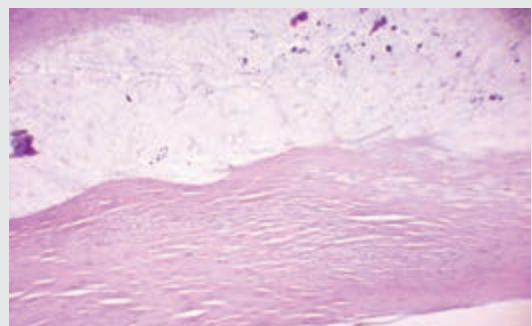
Микроскопическое исследование КА в области стента после его извлечения было затруднено вследствие механического повреждения стенки артерии, однако в большинстве микропрепаратов были визуализированы фрагменты АСБ с сохранившейся покрывкой, все оболочки КА, а также неоинтима вокруг стента. Патогистологическое исследование аутопсий-



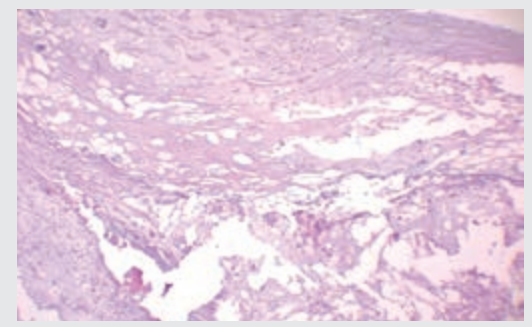
**Рисунок 1 — Сформированная капсула (неоинтима) вокруг стента, ×400**



**Рисунок 2 — Эндотелизация капсулы, миграция ГМК, ×400**



**Рисунок 3 — Атероматозная бляшка с плотной широкой фиброзной капсулой в очаге стентирования, ×100**



**Рисунок 4 — Сформированная неоатеросклеротическая бляшка, ×100**

ного материала выявило все признаки уязвимой бляшки: большое некротическое ядро, воспаление, тромбоз, внутривиточные кровоизлияния, тонкая фиброзная покрышка с разрывами и надрывами, васкуляризация. В зоне погружения стента в ткань сосуда наблюдались характерные углубления, соответствующие геометрии стента и формирование вокруг стента капсулы, по гистоструктуре подобной неоинтима (рисунок 1). В области соприкосновения витков стента с сосудистой стенкой наблюдалась очаговая эндотелизация и миграция ГМК (рисунок 2).

Во всех случаях отмечалась инкапсуляция стента, капсула (неоинтима), образующаяся вокруг стента, была сформирована плотной, очагово гиалинизированной фиброзной тканью (рисунок 3). В одном наблюдении отмечалась выраженная макрофагальная инфильтрация в неоинтима. Неоатеросклеротические бляшки (НСБ) обнаруживались внутрипросветно над капсулой стента и часто сопровождалась разрывами фиброзной покрышки (рисунок 4).

В областях инкапсуляции стентов со стороны меди наблюдались погружение бляшки в медию, ее истончение и деструкция мышечных волокон. В 80 % наблюдений фиброзная покрышка бляшки была истончена, сопровождалась разрывами, расслоением. В бляшках дистрофически-некротического типа в покрышке отмечался кальциноз, в бляшках эрозивно-воспалительного типа — инфильтрация пенистыми клетками и мононуклеарами.

Таким образом, при гистологическом исследовании сегментов КА после извлечения стента отмечалась инкапсуляция витков стента с интеграцией капсулы в ткань сосудистой стенки. Капсула (неоинтима) была выполнена фиброзной или склерозированной тканью, характеризовалась неполной эндотелизацией. НСБ имели признаки нестабильности: тонкая фиброзная покрышка, воспалительная инфильтрация покрышки, скопления в ней пенистых макрофагов, повреждения покрышки, отложения депозитов кальция.

Количественный анализ экспрессии PDGF показал достоверное снижение уровня экспрессии PDGF и TGF- $\beta$ 1 ( $p < 0,0001$ ) в НСБ по сравнению с атероматозной бляшкой (таблица).

Таблица — Экспрессия факторов роста в стентированных коронарных артериях умерших с ИМ (ИЭ %; Ме (25; 75))

Группа	PDGF	TGF-β1	VEGF
АСБ	5,51 (4,02; 7,23)	5,77 (3,65; 8,89)	7,71 (4,48; 11,27)
НСБ	3,42* (2,22; 5,70)	4,49* (2,59; 7,74)	6,19 (3,88; 8,29)

Отмечалась тенденция к уменьшению экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия в НСБ по сравнению с АСБ.

Иммуногистохимическое исследование показывает снижение экспрессии PDGF ( $p < 0,001$ ) в НСБ. PDGF является регулятором воспаления, стимулятором пролиферации клеток фибробластного дифферона и перехода ГМК сократительного типа в ГМК синтетического типа. Таким образом, избыточная экспрессия PDGF, также как и противовоспалительного цитокина Tgf-β1, способствует в ткани КА хроническому воспалению, накоплению внеклеточного матрикса и, как следствие, фиброзу и рестенозу. Таким образом, PDGF и Tgf-β1 в АСБ регулируют толщину фиброзного покрова бляшки. Снижение синтеза этих белковых молекул может способствовать истончению фиброзной покрывки бляшки, и, как следствие, ее уязвимости. Также Tgf-β1 обладает противотромбозным действием, препятствуя синтезу адгезивных молекул, снижение уровня его экспрессии может потенцировать тромбоз стента.

VEGF является белком, стимулирующим неоангиогенез в АСБ, что является одним из факторов нестабильности бляшки, также может усугубить рестеноз, воздействуя на прогрессирование атеросклеротической бляшки и индуцируя воспаление. В то же время избыточная экспрессия в ткани стентированной КА может способствовать полной эндотелизации стента и снизить риски развития неоатеросклероза.

**Заключение.** При микроскопическом исследовании коронарных артерий после извлечения стентов признаки внутривиткового атеросклероза обнаруживались у 26,7 % умерших уже через 1–3 месяца после оперативного вмешательства. В 73,3 % случаев с неоатеросклерозом стенты стояли в коронарных артериях более года. При этом развившиеся неоатеросклеротические бляшки были зрелыми, 80 % исследованных НСБ относились к уязвимым бляшкам дистрофически-некротического или эрозивно-воспалительного типов.

В микропрепаратах отмечалась инкапсуляция витков стента, капсула (неоинтима) в контактных участках была выполнена фиброзной или склерозированной тканью, характеризовалась неполной внутрипросветной эндотелизацией. По периметру неоинтимы формировалась эксцентрическая, в большинстве наблюдений, неоатеросклеротическая бляшка.

В коронарных артериях с неоатеросклерозом наблюдалось статистически значимое снижение экспрессии PDGF и Tgf-β1 ( $p < 0,001$ ) по сравнению с нестентированными участками, что является неблагоприятным прогностическим фактором нестабильности бляшки.

Тенденция к уменьшению уровня экспрессии VEGF в неоатеросклеротических поражениях ( $p > 0,05$ ) по сравнению с нестентированными участками с АСБ может свидетельствовать о неполной эндотелизации стента при избыточной васкуляризации бляшки и воспалении.

### Список цитированных источников

1. Влияние коронарной ангиопластики и стентирования на воспалительные биомаркеры у больных стабильной ишемической болезнью сердца / В. В. Тишко [и др.] // Атеросклероз и дислипидемии. — 2015. — № 1. — С. 17–23.
2. Mazin, I. Neoatherosclerosis—from basic concept to clinical implication / I. Mazin, G. Paul, E. Asher // Thrombosis Research. — 2019. — Т. 178. — С. 12–16.
3. Local determinants of thrombus formation following sirolimus-eluting stent implantation assessed by optical coherence tomography / H. Otake [et al.] // J. ACC: Cardiovascular Interventions. — 2009. — Т. 2, № 5. — С. 459–466.
4. Very early in-stent neoatherosclerosis assessed by optical coherence tomography / A. Vergara-Martel [et al.] // International J. of Cardiovascular Imaging. — 2019. — Т. 35, № 10. — С. 1793–1794.

5. TGF-Beta through Smad3 Signaling Stimulates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointimal Formation / S. Tsai [et al.] // American J. of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. — 2009. — Vol. 297 — P. 540–549.
6. Transforming Growth Factor Beta 1 Induces Neointima Formation through Plasminogen Activator Inhibitor-1-Dependent Pathways / G. Otsuka [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. — 2006. — Vol. 26. — P. 737–743.
7. VEGF in neoplastic angiogenesis / V. P. Chekhonin [et al.] // Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. — 2012. — Vol. 2. — P. 23–33.
8. An increase of VEGF plasma levels is associated with restenosis of drug-eluting stents / K. M. Katsaros [et al.] // EuroIntervention. — 2014. — Vol. 10 (2). — P. 224–230.
9. Тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и рестенозирование коронарных артерий после интервенционных вмешательств / Л. А. Бокерия [и др.] // Бюллетень НЦССХ им. А. Н. БАКУЛЕВА РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». — 2004. — № 5. — С. 301–305.
10. Mechanisms of very late drug-eluting stent thrombosis assessed by optical coherence tomography / M. Taniwaki [et al.] // Circulation. — 2016. — Т. 133, № 7. — С. 650–660.
11. Способ патологоанатомического вскрытия коронарных артерий после стентирования : пат. 2725858 РФ : МПК А 61В 16/00 / С. С. Тодоров [и др.]. — Оpubл. 06.07.20. — 6 с.

## Morphological and immunohistochemical characteristics of neoatherosclerotic lesions in stented coronary arteries

*Vladimirskaya T. E., Adzerikho I. E., Shved I. A., Mikhnevich D. L., Zhilkevich A. V.  
State educational institution “Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education”,  
Minsk, Republic of Belarus*

The paper presents the results of a study of neoatherosclerotic lesions of stented coronary arteries on autopsy material from those who died with myocardial infarction. General histological and immunohistochemical methods were used. All obtained quantitative data were subjected to statistical processing. It was found that 1–3 months after surgery, signs of intra-stent atherosclerosis were found in 26.7 % of the dead. In 73.3 % of cases with neoatherosclerosis, stents were in place in the coronary arteries for more than a year. The developed neoatherosclerotic plaques were mature, 80 % of neoatherosclerotic lesions were vulnerable plaques of dystrophic-necrotic or erosive-inflammatory types. In coronary arteries with neoatherosclerosis, a statistically significant decrease in the expression of PDGF and Tgf- $\beta$ 1 ( $p < 0.001$ ) was observed compared with non-stented atheromatous areas, which is an unfavorable prognostic factor for plaque instability.

**Keywords:** neoatherosclerosis, unstable plaque, stenting, tissue growth factors.

*Поступила 10.06.2022*



УДК 616.133.3—007—091.8

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТЕНОК ВНУТРЕННИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ИЗВИТОСТИ

*Трисветова Е. Л.<sup>1</sup>, Апинон О. В.<sup>2</sup>, Юдина О. А.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь;*

<sup>2</sup>*Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь;*

<sup>3</sup>*Государственное учреждение «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь, г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Патологическая извитость внутренних сонных артерий протекает бессимптомно или манифестирует острыми расстройствами мозгового кровообращения. Точная распространенность патологии неизвестна, по результатам ультразвукового исследования патологическую извитость внутренних сонных артерий определяют до 50 % случаев. Этиология патологических изменений внутренних сонных артерий обсуждается, у детей и молодых людей выявляют признаки врожденных нарушений, в среднем и пожилом возрасте преобладают атеросклеротическое поражение сосудов, артериальная гипертензия, дегенеративно-дистрофические изменения шейного отдела позвоночника. Изучению морфологических характеристик стенок внутренних сонных артерий при патологической извитости у молодых людей посвящена настоящая статья.

**Ключевые слова:** внутренние сонные артерии, патологическая извитость, морфологическая характеристика.

**Введение.** К важным медицинским и социальным проблемам относятся ранняя диагностика и лечение сосудистых заболеваний головного мозга из-за высокой распространенности и серьезных последствий для качества и прогноза жизни. Одной из причин цереброваскулярной недостаточности, переходящих нарушений мозгового кровообращения, считают патологическую извитость внутренних сонных артерий (ВСА). Нарушения гемодинамики при патологической извитости обусловлены врожденными или приобретенными изменениями конфигурации сосудов, кровоснабжающих головной мозг, с образованием изгибов (кинкинг), перегибов, петель (койлинг), влияющих на кровоток и сопровождающихся предшествующей или сформировавшейся морфологической перестройкой стенки сосуда. Патологическая извитость ВСА в 3 раза чаще встречается при моногенных наследственных нарушениях соединительной ткани по сравнению с показателем в популяции [1]. Ультразвуковая диагностика с доплеровским исследованием позволяет выявлять изменения в строении ВСА, появление турбулентных течений и особенности скоростных характеристик кровотока. Своевременное хирургическое лечение патологически извитых

ВСА является методом, предупреждающим развитие цереброваскулярных заболеваний. К настоящему времени обсуждается роль патологической извитости, причины структурных и гемодинамических изменений во ВСА в развитии острых нарушений мозгового кровообращения.

**Цель работы** — определение структурных морфологических особенностей стенок артерий у пациентов, перенесших оперативное вмешательство по поводу пластики или протезирования при патологической извитости ВСА.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено по фрагментам ВСА 45 пациентов: 8 мужчин и 37 женщин (средний возраст  $50,76 \pm 13,00$  лет), оперированных в связи с неврологической симптоматикой по поводу патологической извитости артерии. Группу контроля составили 10 случаев при аутопсии с известной причиной смерти без патологической извитости ВСА.

Гистологическую проводку материала осуществляли в автоматическом режиме с использованием гистопроектора карусельного типа Leica TP 1020 по стандартной (спирты—ксилон—парафиновая среда) методике. Материал заливали в парафин, изготавливали срезы толщиной

3 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, орсеином по Харту, MSB. Применяли световую микроскопию, фотофиксацию и морфометрию. При световой микроскопии в полученных фрагментах артерий определяли соотношение и толщину слоев стенки, наличие и тип фибромускулярной дисплазии, состояние внутренней эластической мембраны, изменения экстрацеллюлярного матрикса, гладкомышечных клеток, количества и структуры эластических и коллагеновых волокон меди, наличие признаков атеросклероза, диссекции, степень и тип сужения просвета сосуда.

По результатам морфологического исследования резецированных фрагментов ВСА сформированы четыре группы: 1 – с фибромускулярной дисплазией ( $n = 18$ , 40 %, мужчин 4, женщин 14), средний возраст  $37,1 \pm 8,13$  лет, 2 – с фибромускулярной дисплазией и атеросклерозом ( $n = 11$ , 24,4 %, мужчин 2, женщин 9), средний возраст  $60,9 \pm 5,13$  лет, 3 – с атеросклерозом ( $n = 16$ , 35,6 %, мужчин 2, женщин 14), средний возраст  $59,19 \pm 5,15$  лет, группа контроля – без патологических изменений ( $n = 10$ , мужчин 4, женщин 6), средний возраст  $32,4 \pm 9,11$  лет.

Для иммуногистохимического исследования использовали срезы толщиной 3 мкм, которые монтировали на высокоадгезивные предметные стекла Super Frost Plus. Для нивелирования антиген-маскирующего действия формалиновой фиксации срезы проходили высокотемпературную предобработку в Tris/EDTA буфере для депарафинизации и высокотемпературной демаскировки антител (Dewax and HIER buffer Low pH, Thermo) в микроволновой печи. Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартному протоколу. В качестве детекционной системы использовали систему UltraVision Quanto (Thermo), время инкубации 30 мин при комнатной температуре. В качестве хромогена применили DAB 3-диаминобензидин тетрагидрохлорид (Thermo), приготовленный непосредственно перед использованием.

Положительное окрашивание диаминобензидином фиксировали в 5 случайных полях зрения при увеличении  $\times 400$ . Окрашивание оценивали в баллах в цитоплазме мышечных клеток полуколичественно по распространенности в слоях стенки сосуда и интенсивности: негативное окрашивание – 0 баллов, слабой интенсивности – 1 балл, умеренной интенсивности – 2 балла, сильной интенсивности – 3 балла.

Контрастирование ядер осуществляли гематоксилином Майера, далее после обезвоживания срезы заключали в монтирующую среду

на основе полистирола. Для внешнего контроля иммуногистохимической реакции использовали парафиновые блоки тканей, рекомендованные производителем для первичного антитела.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программного обеспечения R, Statistica 10.0 for Windows.

При нормальном распределении количественных признаков рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение и доверительный интервал, в случае распределения признака отличного от нормального в качестве описательных статистик использовали медиану (Me), интерквартильный размах, 25-й и 75-й процентиля, максимальное и минимальное значение. Сравнение независимых выборок по количественным признакам проводилось с использованием критерия Манна – Уитни ( $U$ -критерий), в случае если количество сравниваемых групп превышало 2, использовался критерий Краскела – Уоллиса с последующим апостериорным сравнением. В качестве критерия для апостериорных сравнений применялся критерий Данна с поправкой Бонферрони на множественные сравнения. Корреляционные взаимосвязи между признаками вычисляли с использованием коэффициента корреляции Спирмена ( $\rho$ ) для количественных признаков и критерия хи-квадрат Пирсона или точный критерий Фишера для номинальных признаков. Уровень значимости устанавливали  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Исследованные фрагменты ВСА с патологической извитостью в большинстве случаев иссечены у женщин по сравнению с мужчинами 77,8 % против 22,2 %. Фибромускулярная дисплазия выявлена в 29 случаях (64,4 %), в том числе у 23 (51,1 %) женщин, 6 (13,3 %) мужчин (средний возраст пациентов  $46 \pm 14$  лет). Изолированная фибромускулярная дисплазия определена в 40 % случаев (средний возраст пациентов  $37,1 \pm 8,13$  лет) с преобладанием в группе женщин (14 против 4 мужчин). Частота поражения правой и левой сонной артерии не различалась (48,9 % и 51,1 %;  $\chi^2 = 0,02$ ,  $p = 0,8815$ ). Комбинация фибромускулярной дисплазии с атеросклерозом выявлена в 24,4 % случаев у 2 мужчин и 9 женщин. Атеросклеротические изменения ВСА встретили у 27 человек (6 мужчин и 21 женщина, средний возраст  $59,9 \pm 5,1$  лет), изолированный атеросклероз – у 16 человек (4 мужчины и 12 женщин).

В целом в группах 1 и 2 фибромускулярная дисплазия встречалась как интимальный (48,3 %), медиальный (37,9 %) и смешанный (13,8 %) типы преимущественно с циркулярным (86,2 %) поражением сосудов и диссекцией (69 %). В случае изолированной фиброму-

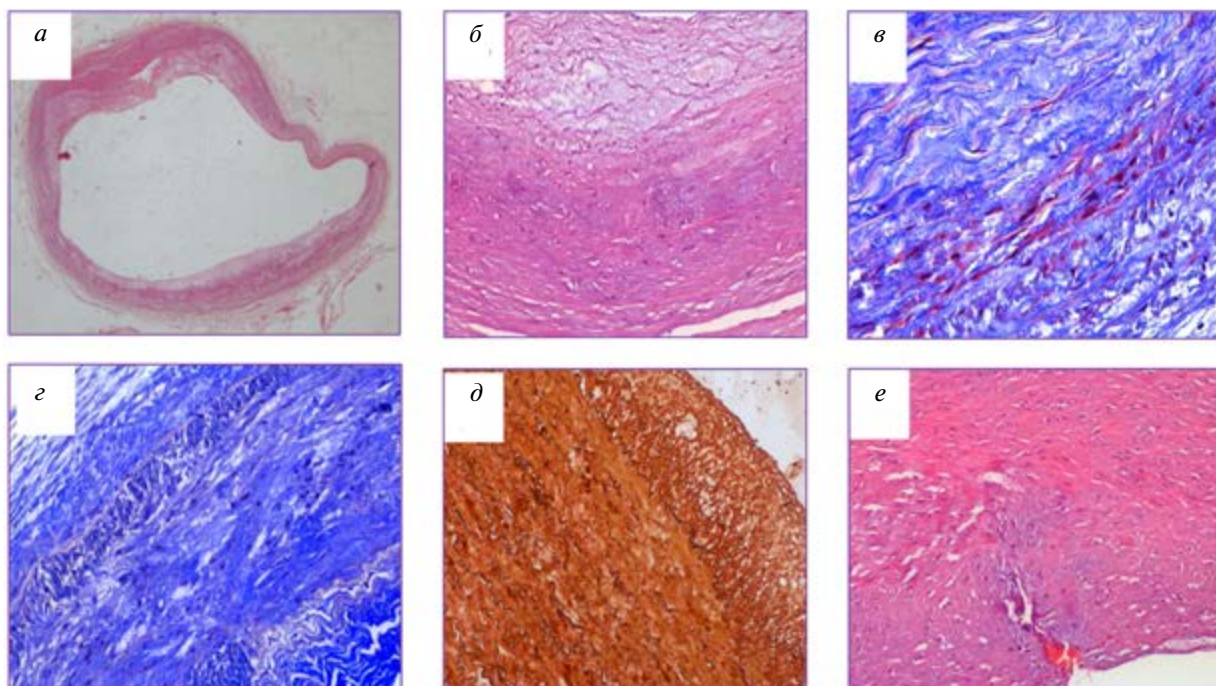
скулярной дисплазии интимальный и медиальный типы встречались одинаково часто (44,4 и 38,9 % соответственно), смешанный тип выявляли редко (16,7 %). Соотношение циркулярного и сегментарного поражения составило 83,3 и 16,7 % ( $\chi^2 = 0,1344$ ,  $p = 0,00025$ ) соответственно, диссекция сосуда выявлена в 72,2 % случаев.

Утолщение интимы с пролиферацией клеток со светлыми удлиненными ядрами и эозинофильной цитоплазмой, располагающихся по всей окружности ВСА, напоминающих по фенотипу гладкомышечные клетки, выявили во всех случаях интимальной фибромускулярной дисплазии циркулярного или сегментарного положения (рисунок 1, *a*). Увеличенную толщину меди, обусловленную изменениями экстрацеллюлярного матрикса с нарушенным соотношением и/или дезорганизацией волокон и клеток, выявили во всех случаях медиального типа фибромускулярной дисплазии циркулярного или сегментарного характера. Избыток продуктов экстрацеллюлярного матрикса наблюдали во всех образцах группы 1 (рису-

нок 1, *б*). Базофильное вещество экстрацеллюлярного матрикса с одинаковой частотой выявили только в интима или меди (изолированно) или в обеих оболочках ВСА (33,3, 27,8 и 38,9 % соответственно). Локализация избытка продуктов экстрацеллюлярного матрикса во всех образцах совпадала с типом фибромускулярной дисплазии ВСА.

Изменения в интима и в меди наблюдали во всех образцах группы 1, в 38,9 % случаев встречались очаговые ишемические повреждения гладкомышечных клеток меди (рисунок 1, *в*). Нарушение ориентации эластических и коллагеновых волокон отметили в 44,4 % при медиальном или смешанном типе фибромускулярной дисплазии (рисунок 1, *г, д*).

Просвет артерий в большинстве случаев (77,8 %;  $\chi^2 = 9$ ,  $p = 0,0027$ ) не имел сужений, в 22,2 % был сужен не более, чем на 15 % за счет увеличения толщины интимы. Диссекция патологически извитых ВСА с фибромускулярной дисплазией, которая встречалась часто (72,2 %;  $\chi^2 = 5,44$ ,  $p = 0,019$ ), представлена на рисунке 1, *е*.



**Рисунок 1 — Микроскопические изменения патологически извитой ВСА при фибромускулярной дисплазии:**

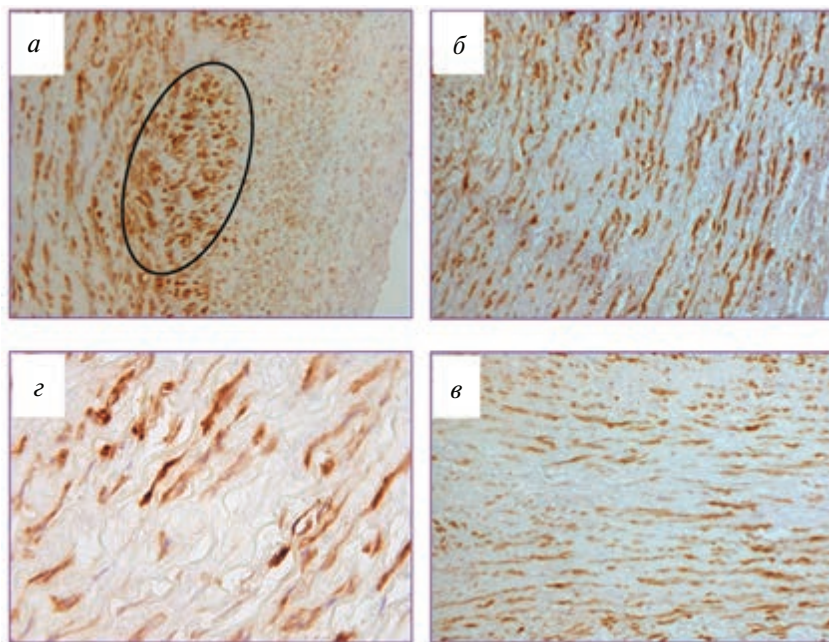
***a* —** неравномерная толщина интимы и меди с узловатыми утолщениями (окраска гематоксилин и эозин,  $\times 50$ ); ***б* —** избыточное накопление продуктов экстрацеллюлярного матрикса между волокнами (окраска гематоксилин и эозин,  $\times 12,5$  и  $\times 100$ ); ***в* —** очаговое ишемическое повреждение гладкомышечных клеток меди (окраска MSB,  $\times 50$  и  $\times 200$ ); ***г* —** очаговая дезорганизация коллагеновых волокон в склерозированной меди (окраска MSB,  $\times 100$ ); ***д* —** очаговый эластолиз в меди (окраска орсеином по Харту,  $\times 100$ ); ***е* —** зона диссекции гиперплазированной интимы (окраска гематоксилин и эозин,  $\times 100$ )



В большинстве образцов отметили отсутствие миграции *vasa vasorum* из адвентиции в медию (77,8 %;  $\chi^2 = 9$ ,  $p = 0,0027$ ) и нормальный просвет ВСА (77,8 %;  $\chi^2 = 9$ ,  $p = 0,0027$ ).

При иммуногистохимическом исследовании с антителом к кальпонию (маркер мышечных клеток) отметили, что пролиферирующие клетки в интима при интимальной фибромускулярной дисплазии имеют гладкомышечную

дифференцировку (рисунок 2, а). Выявили феномен «выпадения» ядер гладкомышечных клеток в медию при медиальном и смешанном типе, при котором в большинстве случаев наблюдали очаговый (рисунок 2, б, в), а не диффузный (рисунок 2г), характер выпадения ядер (70 %;  $\chi^2 = 68,9$ ,  $p = 0,0012$ ). При этом фокусы «выпадения» ядер гладкомышечных клеток совпадали по локализации с фокусами ишемического повреждения.



**Рисунок 2 – Результаты иммуногистохимического исследования ВСА с фибромускулярной дисплазией (антитело к кальпонию, окраска диаминбензидин):**  
**а — пролиферация гладкомышечных клеток в интима при интимальном типе ( $\times 200$ );**  
**б, в — очаговое «выпадение» ядер гладкомышечных клеток при медиальном типе фибромускулярной дисплазии ( $\times 100$ ,  $\times 400$ ); г — диффузное «выпадение» гладкомышечных клеток при медиальном типе фибромускулярной дисплазии ( $\times 100$ )**

В группе 2 (фибромускулярная дисплазия и атеросклероз) накопление липидов выявляли изолированно в интима и на границе с медиальной оболочкой сосуда, при минимальном объеме поражения — в макрофагах. Встречались макрофаги, утратившие ядро, в этом случае липиды свободно располагались между волокнами и кристаллы холестерина в виде ободовыпуклых линз. Очаговые скопления липидов со стороны просвета сосуда имели фиброзную крышку, состоящую из гомогенизированных коллагеновых волокон и фибробластов. Липидные депозиты в интима выявляли значимо часто при циркулярном по сравнению с сегментарным вариантом интимальной фибромускулярной дисплазии (90,9 %;  $\chi^2 = 11,64$ ,  $p = 0,00065$ ).

В случае сочетания фибромускулярной дисплазии с атеросклеротическим повреждением патологически извитой ВСА (группа 2) нарушение ориентации эластических и коллагеновых волокон и накопление избыточного экстрацеллюлярного матрикса в медию определяли практически во всех случаях (90,9 % и 100 % соответственно;  $\chi^2 = 11,64$ ,  $p = 0,00065$  и  $\chi^2 = 13,22$ ,  $p = 0,00003$ ). Избыточный экстрацеллюлярный матрикс одинаково часто находили в интима, медию или одновременно в обеих оболочках ВСА. При исследовании фрагментов ВСА группы 2 отметили, что редко встречались признак в виде «выпадения» ядер гладкомышечных клеток (27,3 %) и миграция *vasa vasorum* из адвентиции в медию.



Атеросклероз с циркулярным и сегментарным отложением липидов в стенке ВСА встречали одинаково часто (54,5 и 45,5 % соответственно), в одном случае выявили нестабильную атеросклеротическую бляшку и тромбоз сосуда. В 54,4 % случаев сужение просвета ВСА достигало 20 %.

Диссекция с избытком продуктов экстрацеллюлярного матрикса в меди и некротическими изменениями волокон и гладкомышечных клеток в группе 2 выявлена в 63,6 % случаев во всех фрагментах с миграцией *vasa vasorum* из адвентиции в медию. Зоны повреждения с некротическими изменениями волокон и гладкомышечных клеток одинаково часто встречали в интиме и меди (54,5 и 36,4 % соответственно;  $\chi^2 = 0,183$ ,  $p = 0,669$ ).

В группе 3 выявили циркулярную и сегментарную локализацию (37,5 и 62,5 % соответственно) атеросклеротического поражения патологически извитых ВСА. При циркулярной локализации атеросклеротического поражения отметили, что минимальная и максимальная толщина стенки ВСА и ее слоев значимо меньше, чем при ее сегментарной локализации.

В 93,75 % случаев наблюдали сужение просвета сосуда (до 50 % диаметра — 87,5 %, более 50 % — 12,5 % случаев) за счет атеросклеротических бляшек. Признаки повреждения фиброзной крышки атеросклеротической бляшки выявили в 25 % ВСА.

В группе 3 атеросклеротическое поражение сосуда сопровождалось диссекцией на границе между интимой и меди в 25 % случаев. Признаков эндотелизации и/или тромбоза с организацией дефекта не выявили.

Состояние экстрацеллюлярного матрикса, гладкомышечных клеток и ориентация волокон в стенках ВСА в группе 3 в большинстве образцов (14/16) не имели патоморфологически значимых изменений. Вторичные изменения (кальциноз и оссификация) в стенке патологически извитых ВСА обнаружили в 31,25 % случаев.

По сравнению с образцами контрольной группы во всех случаях патологически извитых ВСА за счет увеличения толщины интимы и меди определяли утолщение стенки сосуда, наиболее выраженное при атеросклеротическом поражении (группа 3) и атеросклеротическом поражении в сочетании с фибромускулярной дисплазией (группа 2).

В группе контроля на поперечном срезе стенок фрагментов ВСА имела равную толщину и пропорциональное соотношение интимы,

меди и адвентиция (1:4:2). Внутренняя оболочка неизменных ВСА представлена одним слоем эндотелиальных клеток, покрывающих тонкий подэндотелиальный слой интимы, содержащий тонкие соединительнотканые волокна и немногочисленные мало специализированные клетки. Агрегированные эластические волокна формировали внутреннюю эластическую мембрану на границе интимы и меди, хорошо заметную при малом увеличении зигзагообразную эозинофильную структуру.

Средняя оболочка состояла преимущественно из гладких миоцитов, между которыми располагались соединительнотканые клетки типа фибробластов, коллагеновые и эластические волокна. Эластические волокна меди на границе сливались с эластическими элементами интимы и адвентиции.

В наружной оболочке выявили рыхлую волокнистую неоформленную соединительную ткань с наличием мелких *vasa vasorum*, в которой волокна располагались косо и продольно.

С развитием визуализирующих методов исследования и их широкого применения часто выявляют патологическую извитость прецеребральных артерий. Превентивная диагностика структурных и гемодинамических особенностей артерий, кровоснабжающих головной мозг, способствует раннему проведению медицинской профилактики осложнений. Клинические исследования показали, что патологическая извитость артерий часто обусловлена старением, артериальной гипертензией, атеросклерозом и другими патологическими состояниями, встречающимися у людей пожилого возраста [2, 3]. Вместе с тем сосудистые изменения характерны для людей молодого возраста с моногенными и многофакторными наследственными нарушениями соединительной ткани (синдром Элерса — Данло, Лойеса — Дитца, патологической извитости артерий, марфаноподобный фенотип и т. п.), фибромускулярной дисплазии артерий [4].

Результаты нашего исследования артерий с патологической извитостью показали в большинстве случаев наличие у людей молодого и среднего возраста фибромускулярной дисплазии артерий с диссекцией или без нее. Изолированную фибромускулярную дисплазию ВСА выявили у людей молодого возраста, в то же время атеросклеротическое поражение артерий — у людей 59 и более лет. Известно, что фибромускулярная дисплазия артерий встречается как самостоятельный синдром (генетиче-

ски опосредованный) либо в структуре наследственных нарушений соединительной ткани. Недавние исследования геномных ассоциаций при фибромускулярной дисплазии показали, что интронный вариант, расположенный в гене регулятора 1 фосфатазы и актина — *PHACTR1*, влияет на транскрипционную активность гена эндотелина-1 (*EDNI*), расположенного на хромосоме 6. Известно, что ген *PHACTR1* участвует в развитии гипертрофии стенок артерий, диссекции сонной артерии, ишемической болезни сердца и мигрени [5, 6].

Признаки дисплазии артериальной стенки с увеличением толщины интимы и меди, нарушенным соотношением и дезорганизацией волокон и клеток, изменением объема экстрацеллюлярного матрикса и неизменным просветом сосуда характерны для случаев фибромускулярной дисплазии изолированной и в сочетании с атеросклерозом. В случае атеро-

склеротического поражения ВСА уменьшается просвет сосуда, отсутствуют изменения экстрацеллюлярного матрикса и дезорганизация его волокон. Нарушения соединительной ткани стенки ВСА при фибромускулярной дисплазии часто по сравнению с атеросклеротическим поражением предрасполагали к диссекции сосуда.

**Заключение.** В результате проведенных исследований выявлено, что среди оперированных по поводу патологической извитости ВСА пациентов с неврологической симптоматикой преобладают женщины с фибромускулярной дисплазией сосуда. Нарушения качества и количества экстрацеллюлярного матрикса и клеток соединительной ткани стенок артерии могут являться причиной патологической извитости ВСА, развития диссекции и гемодинамических нарушений, приводящих к цереброваскулярному дефициту.

#### Список цитированных источников

1. Carotid Artery Tortuosity Is Associated with Connective Tissue Diseases / J. P. Welby [et al.] // *Am. J. Neurorad.* — 2019. — Vol. 40, № 10. — P. 1738–1743.
2. ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries / V. Aboyans [et al.] // *Eur. Heart J.* — 2017. — Vol. 39, № 9. — P. 763–816.
3. Патологическая извитость внутренней сонной артерии: клиника, диагностика и хирургическое лечение / А. В. Гавриленко [и др.] // *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия.* — 2016. — Т. 9, № 1. — С. 29–33.
4. Трисветова, Е. Л. Аномалии артериальных сосудов при наследственных нарушениях соединительной ткани / Е. Л. Трисветова, О. В. Дарчия // *Мед. новости.* — 2019. — Т. 298, № 7. — С. 13–19.
5. Keser, Z. Craniocervical Artery Dissections: A Concise Review for Clinicians / Z. Keser, J. F. Meschia, G. Lanzino // *Mayo Clin. Proc.* — 2022. — Vol. 97, № 4. — P. 777–783.
6. Genomics of Fibromuscular Dysplasia / S. di Monaco [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* — 2018; № 19 (5). — P. E1526. DOI: 10.3390/ijms19051526.

## Morphological characteristics of the walls of the internal carotid arteries in pathological tortuosity

*Trisvetova E. L.<sup>1</sup>, Apinon O. V.<sup>2</sup>, Yudina O. A.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;*

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

<sup>3</sup>*State Institution “Republican Clinical Medical Center of the Administration of the President of the Republic of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus*

Pathological tortuosity of the internal carotid arteries is asymptomatic or manifests as acute disorders of cerebral circulation. The exact prevalence of the pathology is unknown, according to the results of ultrasound examination, pathological tortuosity of the internal carotid arteries is determined in 40–50 % of cases. The etiology of pathological changes in the internal carotid arteries is discussed. Signs of congenital disorders are found in children and young people, atherosclerotic vascular lesions, arterial

hypertension, and degenerative-dystrophic changes in the cervical spine predominate in middle and old age. This work is devoted to the study of the morphological characteristics of the walls of the internal carotid arteries in pathological tortuosity in young people.

**Keywords:** internal carotid arteries, pathological tortuosity, morphological characteristics.

*Поступила 15.06.2022*

УДК 616.132.13-007.6-091.8

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ СТЕНКИ АОРТЫ У ЛИЦ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА

*Валюженич Я. И.<sup>1</sup>, Юдина О. А.<sup>2</sup>, Рудой А. С.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь;*

<sup>2</sup> *Государственное учреждение «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь, г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Гистологическое исследование интраоперационного материала является одним из наиболее объективных методов исследования, позволяющих детально оценить морфологическое состояние аортальной стенки. Качественная и количественная оценка параметров медийной дегенерации имеет важное значение. Оценка медийной дегенерации зависит от суммирования тяжести и степени отдельных дегенеративных изменений.

**Ключевые слова:** медийная дегенерация, ламинарный медийный коллапс, дегенеративные аортопатии.

**Введение.** Аневризма восходящего отдела аорты — заболевание, характеризующееся сочетанием минимальных клинических проявлений либо их отсутствием и высокой вероятностью драматически быстро наступающих тяжелых, зачастую фатальных осложнений. Основными осложнениями данной патологии являются расслоение и/или разрыв аорты. Встречаемость аневризм грудного отдела аорты в популяции составляет 0,16–1,15 % [1]. Частота развития расслоения грудной аорты в мире в среднем составляет 3–8 случаев на 100 тыс. населения в год [2]. При этом отмечается крайне высокий риск внезапной смерти. Огромное значение имеет фактор времени от момента расслоения до операции. Среди оперированных пациентов 30-дневная госпитальная летальность до 1985 г. была более 30 %, а к 2013–2015 гг. составляла уже 11–12,5 %, 5-летняя выживаемость в середине 1990-х гг. составляла 50–71 %, в середине 2000-х гг. — 63–94 %, 10-летняя выживаемость — 37–64 % и 65–84 % соответственно [3]. Также стоит отметить, что при хроническом расслоении 5-летняя выживаемость без операции составляет 10–15 % [4]. Необходимость в хирургическом лечении при

остром расслоении по абсолютным показаниям обусловлена крайне высоким риском летального исхода при естественном течении патологии и бесперспективности консервативных методов лечения [5]. В то же время стабильное состояние пациентов при хроническом проксимальном расслоении аорты дает возможность провести полную диагностику и подготовку к плановой операции. Операции по протезированию аорты при диссекции грудной аорты и торакоабдоминального отдела являются одними из самых сложных. В основе патогенеза аневризмы аорты лежит изменение ее стенки. Одним из наиболее объективных методов исследования, позволяющих детально оценить морфологическое состояние аортальной стенки, является гистологическое исследование интраоперационного материала. При этом понимание морфологического статуса аортальной стенки на разных участках может помочь в выборе адекватного уровня резекции аневризмы восходящей аорты.

Составными компонентами медийной дегенерации являются:

накопление мукоидного внеклеточного матрикса;

фрагментация и/или потеря эластичного волокна;

истончение эластичных волокон;  
 дезорганизация эластичных волокон;  
 потеря ядер гладкомышечных клеток;  
 ламинарный медийный коллапс  
 дезорганизация гладкомышечных клеток;  
 медийный фиброз.

**Цель работы** — поиск гистологических критериев для дифференциальной диагностики дегенеративных аортопатий, которые могут быть использованы на этапе прижизненного гистологического исследования у лиц молодого возраста.

Каталогизировать основные медийные дегенеративные заболевания аорты у лиц молодого возраста наряду с современными знаниями относительно мутировавших генов и известных связанных гистологических находок; представить современную стандартизованную номенклатуру изменений меди аорты — важные и актуальные задачи исследования.

**Материалы и методы.** В исследование был включен 21 пациент (20 мужчин и одна женщина). Материалом для исследования служили фрагменты восходящего отдела грудной аорты, полученные во время протезирования аневризм грудной аорты в РНПЦ «Кардиология». Образцы после измерения и макроскопического описания фиксировали 10%-м нейтральным забуференным формалином и обрабатывали по общепринятой методике: спирты — ксилол — гистомикс. Толщина срезов составила 4 мкм. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, пентахром по Мовату. Выполняли световую микроскопию и морфометрическую оценку толщины интимы, меди и адвентиции, а также толщину всей стенки аорты. Для опти-

мизации заключительного диагноза применяли стандартизованную номенклатуру в соответствии с консенсусной документацией, относящейся к унифицированной номенклатуре для различных невоспалительных дегенеративных поражений аорты [6]. Результаты патоморфологического сопоставляли с клиническим диагнозом.

Образцы аорт на основании сопоставления клинико-морфологических данных разделили на две группы: ОГ1 — 18 (86 %) пациентов с генетически детерминированными наследственными заболеваниями и ОГ2 — 3 пациента, у которых основным патологическим фактором развития аневризмы восходящей аорты являлась артериальная гипертензия.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что общая толщина стенки аорты преобладала у лиц с артериальной гипертензией, а у лиц с наследственными нарушениями соединительной ткани (ННСТ) была минимальной (11121,4 (9433,8–12952,5) мкм и 5150,35 (4207,8–5828,2) мкм соответственно ( $p = 0,023$ ). Данные представлены в таблице 1.

Толщина интимы в исследуемых группах была вариабельной, однако отличий по толщине интимы в ОГ1 и ОГ2 выявлено не было ( $p = 0,051$ ). Данные представлены в таблице 2. Медия была значимо тоньше в ОГ1 в сравнении с ОГ2 (3338,55 (2764,6–3884,7) мкм и 4712,4 (3786,8–5277,8) мкм соответственно ( $p = 0,039$ ). Результат представлен в таблице 3. Утолщение адвентиции наблюдалось в ОГ2, в тоже время у лиц с ННТС (ОГ1) толщина адвентиции была минимальной (6481,7 (4315,2–6871,2) мкм и 1423,85 (775,9–2045,7) мкм соответственно ( $p = 0,018$ ). Данные представлены в таблице 4.

Таблица 1 — Дисперсионный анализ толщины стенки аорты (Манна – Уитни)

Показатель	Толщина стенки аорты (мкм)		<i>p</i>
	ОГ 1	ОГ 2	
Ме (25–75 %)	5150,35 [4207,8–5828,2]	11121,4 [9433,8–12952,5]	$p = 0,023$

Таблица 2 — Дисперсионный анализ толщины интимы (Манна – Уитни)

Показатель	Толщина интимы (мкм)		<i>p</i>
	ОГ 1	ОГ 2	
Ме (25–75 %)	221 [181,7–413,7]	803,5 [406,2–852,9]	$p = 0,051$

Таблица 3 — Дисперсионный анализ толщины меди (Манна – Уитни)

Показатель	Толщина меди (мкм)		<i>p</i>
	ОГ 1	ОГ 2	
Ме (25–75 %)	3338,55 [2764,6–3884,7]	4712,4 [3786,8–5277,8]	$p = 0,039$



Таблица 4 — Дисперсионный анализ толщины адвентиции (Манна – Уитни)

Показатель	Толщина адвентиции (мкм)		p
	ОГ 1	ОГ 2	
Me (25–75 %)	1423,85 [775,9–2045,7]	6481,7 [4315,2–6871,2]	p = 0,018

Накопление базофильного гомогенного экстрацеллюлярного матрикса в медии (МЕМА) наблюдали при окраске гематоксилин и эозин в виде очагов, ограниченных окончатými эластическими мембранами — интраламеллярный тип (МЕМА-И) — и/или распространяющихся на несколько мембран — трансламеллярный тип (МЕМА-Т). Варианты МЕМА, выявленные в ОГ1 и ОГ2, представлены на рисунке 1. МЕМА-И в ОГ1 был мультифокальным 7 (39 %)

и выраженным 10 (56 %), изменения в ОГ2 носили фокальный 2 (67 %) и выраженный характер 2 (67 %). Фрагментация эластических волокон в ОГ1 была фокальной 8 (44 %) и выраженной 5 (28 %), в ОГ2 была незначительной 2 (67 %).

Распространенность и степень потери эластических волокон была выше и тяжелее в группе пациентов с ОГ1 (рисунок 2).

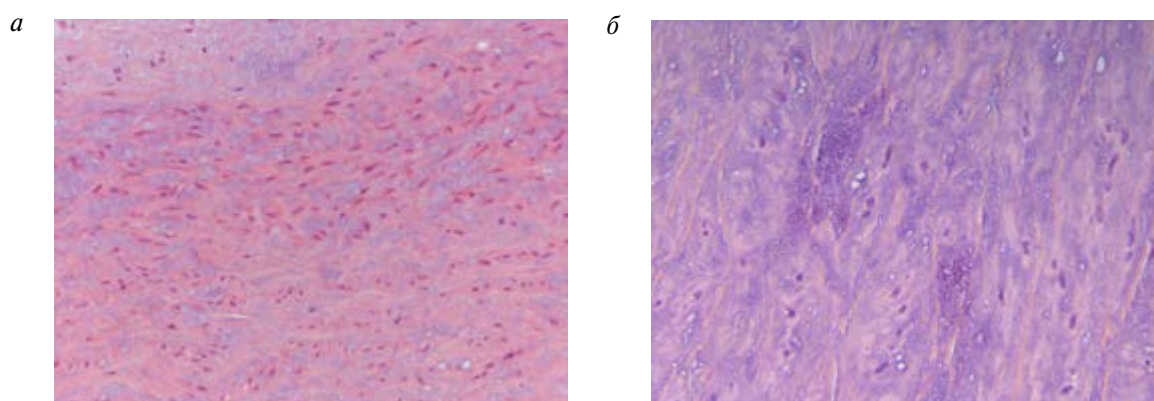


Рисунок 1 — Микроскопическая картина типов МЕМА (окраска гематоксилин и эозин, ×200): а — интраламеллярный; б — трансламеллярный

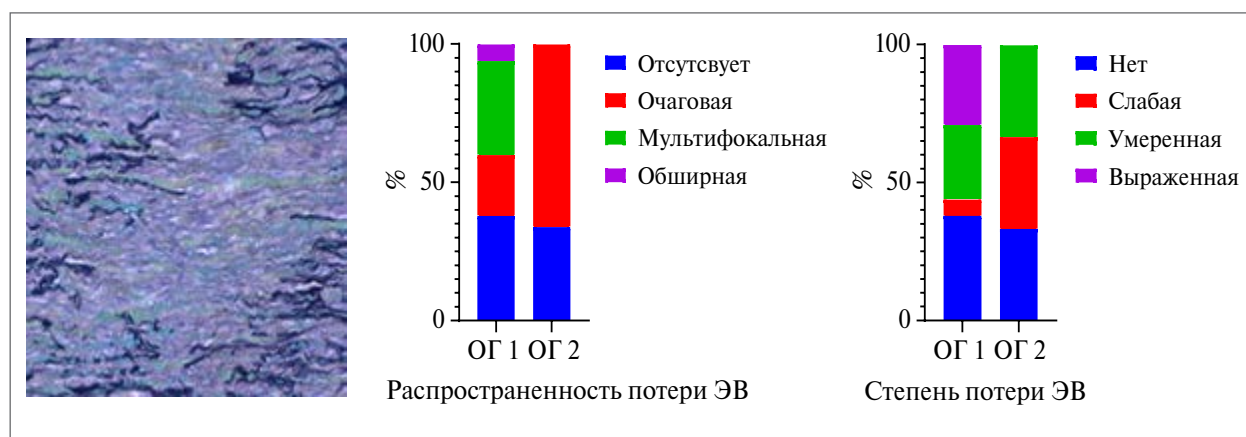
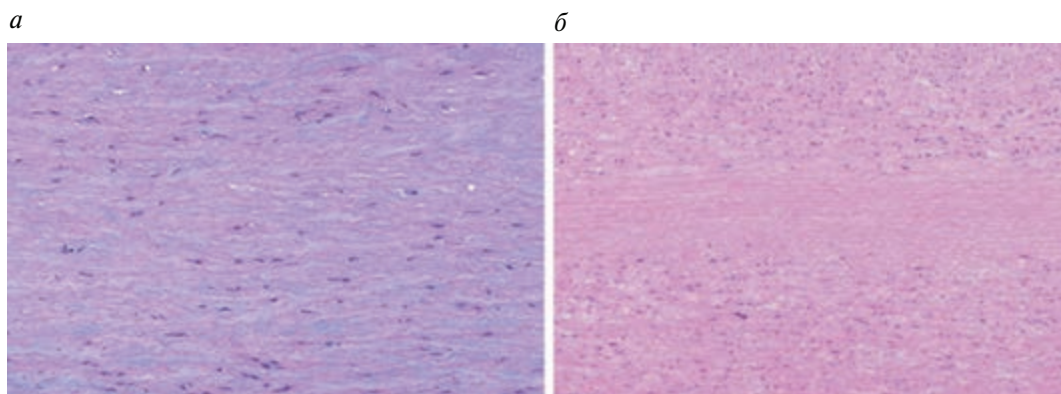


Рисунок 2 — Сравнительная характеристика распространенности и степени потери эластических волокон

Одной из морфологических характеристик в оценке состояния медии стала сохранность, плотность и равномерность распределения ядер гладкомышечных клеток. В тех случаях когда в медии артерии не могут быть четко идентифици-

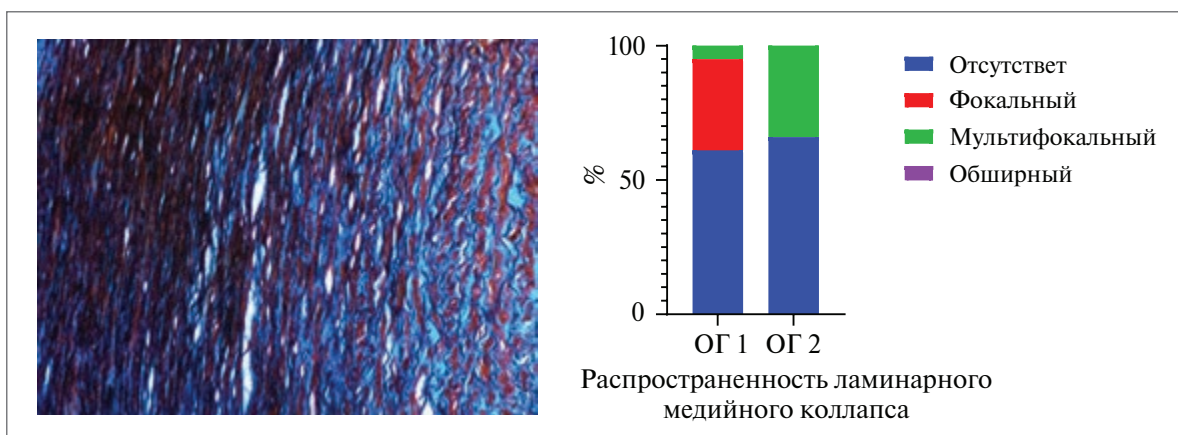
рованы ядра ГМК, говорят об их утрате. В ОГ2 установлена частая 2 (67 %) и обширная 1 (33 %) утеря ядер ГМК, тогда как в ОГ1 лишь половина образцов характеризовалась мелкими фокусами утери ГМК (рисунок 3).



**Рисунок 3 — Типы утраты ядер ГМК (окраска гематоксилин и эозин, ×200):  
а — очаговый; б — ленточный**

Старый термин «ламинарный медиа некроз» был заменен на новый «ламинарный медийный коллапс», при котором морфологическая картина характеризуется уплотне-

нием эластических волокон. Сравнительная характеристика по распространенности в исследуемых группах представлена на рисунке 4.



**Рисунок 4 — Сравнительная характеристика распространенности ламинарного медийного коллапса**

Ламинарный медийный коллапс при окраске пентахромом по Мовату представлен как более темная полоса плотно расположенных эластических волокон. Установлено, что ламинарный медийный коллапс в ОГ2 имел широкую распространенность и носил мультифокальный характер, тогда как в ОГ1 отмечали лишь фокальные изменения. В половине образцов ОГ1 ламинарный медийный коллапс отсутствовал.

Каждый образец в изучаемых группах оценивался отдельно по степени и распространенности общей медийной дегенерации, которая определялась суммой различных отдельных гистопатологических дегенеративных поражений, влияющих на ламеллярную единицу (как клеточную, так и внеклеточную). Выраженная медийная дегенерация выявлена в обеих группах.

Во всех образцах ОГ2 и в 12 (67 %) образцах ОГ1 медийная дегенерация оценена как выраженная. Следует отметить, что в одном случае в ОГ1 медийная дегенерация не выявлена.

Выявлен ряд факторов, обладающих наибольшей значимостью при проведении клинко-анатомического анализа у лиц молодого возраста с расширением грудного отдела аорты. Толщина меди в группе ННСТ статистически меньше 4712,4 (3786,8–5277,8) мкм ( $p = 0,039$ ), а именно патология меди является предрасполагающим фактором формирования аневризмы, расслоения и разрыва аорты. Утолщение всех слоев стенки аорты у лиц с артериальной гипертензией носит характер компенсаторно-приспособительных изменений. Степень медийной дегенерации может значительно варьировать от незначительных до

выраженных деструктивных изменений ламеллярных единиц стенки аорты.

**Заключение.** Таким образом, качественная и количественная оценка параметров медийной дегенерации имеет важное значение. Кроме того, поскольку изученные морфологические изменения неспецифичны для какого-либо одного заболевания, сбор стандартизированных данных — единственный способ определить нозологическую принадлежность патологии расслоившейся аорты. Рутинная патологоанатоми-

ческая оценка образцов не позволяет использовать сложные системы количественной оценки или детальный морфометрический анализ. Общая оценка медийной дегенерации (легкая/умеренная/тяжелая) получена на основе комбинации как тяжести, так и распределения отдельных дегенеративных поражений. Ввиду этого не может быть строгих определений тяжести медийной дегенерации, но ее оценка зависит от суммирования тяжести и степени отдельных дегенеративных изменений.

### Список цитированных источников

1. Распространенность и природа аневризм и расслоений аорты по данным анализа последовательных патологоанатомических вскрытий в течение десяти лет в ГКБ № 15 им. О. М. Ф. В. Филатова / Ф. В. Кузнецовский [и др.] // Российский кардиологический журнал. — 2004. — Т. 9, № 6. — С. 5–13.
2. Aortic dissection in pregnancy in England: an incidence study using linked national databases / A. Banerjee [et al.] // *B.M.J. Open*. — 2015. — Vol. 5, № 8. — P.e008318.
3. Early and late outcomes of acute type A aortic dissection: analysis of risk factors in 487 consecutive patients / B. Chiappini [et al.] // *Eur. Heart J.* — 2005. — Vol. 26, № 2. — P.180–186.
4. Acute aortic dissection: population-based incidence compared with degenerative aortic aneurysm rupture / W.D. Clouse [et al.] // *Mayo Clin. Proc.* — 2004. — Vol. 79, № 2. — P. 176–180.
5. 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) / R. Erbel [et al.] // *Eur. Heart J.* — 2014. — Vol. 35. — P. 2873–2926.
6. Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association For European Cardiovascular Pathology: II. Noninflammatory degenerative diseases—nomenclature and diagnostic criteria / M. K. Halushka [et al.] // *Cardiovascular pathology*. — 2016. — Т. 25, №. 3. — С. 247–257.

## Morphological changes in the aortic wall at a young age

*Valiuzhenich Y. I<sup>1</sup>, Udina O. A.<sup>2</sup>, Rudoy A. S.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;*

*<sup>2</sup> State Institution “Republican Clinical Medical Center” of the Administration of the President of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

Histological examination of intraoperative material is one of the most objective research methods that allow a detailed assessment of the morphological state of the aortic wall. Qualitative and quantitative assessment of the parameters of medial degeneration is essential. The assessment of media degeneration depends on the summation of the severity and extent of individual degenerative changes.

**Keywords:** medial degeneration, laminar medial collapse, degenerative aortopathies.

*Поступила 09.06.2022*



УДК 577.3.57.084:599.3.616.5

## НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ЛОВУШКИ КОЖИ КРЫС ПРИ НОРМОТЕРМИИ И ОБЩЕЙ ГЛУБОКОЙ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ГИПОТЕРМИИ

Мяделец О. Д.<sup>1</sup>, Мяделец Н. Я.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup> Учреждение образования «Витебский государственный медицинский колледж имени академика И. П. Антонова», г. Витебск, Республика Беларусь

**Реферат.** В статье излагаются сведения по изучению нейтрофильных лейкоцитов и нейтрофильных внеклеточных ловушек кожи крыс при нормотермии и общей глубокой пролонгированной гипотермии (18–20 °С в прямой кишке) с последующей пролонгацией охлажденного состояния в течение 6 ч. Нетоз выявляли путем окрашивания полнослойных срезов кожи на щелочную фосфатазу по методу М. Берстона. В норме в коже наблюдался градиент увеличения количества нейтрофилов и нейтрофилов, подвергшихся дегрануляции и нетозу, от сосочкового слоя к гиподерме. На глубине охлаждения после согревания и в течение 6 ч после него изученные показатели достоверно не отличались от контрольных значений. Далее отмечалось существенное увеличение по сравнению с контролем общего количества нейтрофилов в состоянии нетоза на протяжении 10 суток постгипотермического периода, а затем показатели постепенно снижались до уровня контроля.

**Ключевые слова:** крысы, кожа, нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные ловушки, нормотермия, пролонгированная гипотермия.

**Введение.** Нейтрофилы — наиболее распространенный вид лейкоцитов. Они являются важной составляющей врожденного иммунитета и представляют собой первую линию защиты организма от инфицирования бактериями, грибами и простейшими. Каждые сутки в организме человека образуется около  $10^{11}$  новых нейтрофилов. Число сегментоядерных нейтрофилов в крови составляет от 47 до 67 %. Однако это лишь 1–2 % зрелых нейтрофилов от всех образующихся нейтрофилов костного мозга. Все остальные эти клетки локализованы в тканях (тканевые нейтрофилы). Они являются важной составляющей частью врожденного иммунитета и представляют собой одну из первых линий защиты организма от инфицирования бактериями, грибами и простейшими. В коже тканевые нейтрофильные гранулоциты обнаруживаются в большом количестве, особенно в рыхлой соединительной ткани гиподермы. При активации этих клеток происходит так называемый респираторный взрыв, т. е. усиленное образование активных форм кислорода — гипероксида анио-

на, синглетного кислорода и др. Они повреждают клеточные стенки микроорганизмов и вызывают их осмотическую гибель. Фагоцитоз, респираторный взрыв и секреция антимикробных белков из гранул — не единственные функции нейтрофилов. В 2004 г. ученым V. Brinkmann и соавт. был открыт еще один механизм борьбы с микробной инвазией: формирование *нейтрофильных внеклеточных ловушек*, *neutrophil extracellular traps* (общепринятая аббревиатура соответственно НВЛ и NETs) [1]. Нейтрофильные внеклеточные ловушки позволяют нейтрофилам уничтожать экстрацеллюлярные патогены при минимальном повреждении клеток хозяина, что препятствует развитию гнойных инфекций. Вместе с тем другие факторы (например, факторы респираторного взрыва нейтрофильных лейкоцитов) обладают цитотоксичностью по отношению не только к микроорганизмам, но и в отношении клеток. При этом не только чужеродных, например, раковых или клеток чужеродных трансплантатов, но и собственных клеток организма при гнойном воспалении и при других патологиче-



ских состояниях. Учение о нетозе имеет большое значение для различных медицинских дисциплин и, несомненно, для дерматологии. Кожа как самый периферический орган организма подвержен воздействию разнообразнейших неблагоприятных факторов внешней среды [2]. В связи с этим в ней находится большое количество нейтрофилов. Эти клетки участвуют в поддержании тканевого гомеостаза в коже в условиях нормы. Вместе с тем нейтрофилы задействованы во всех патологических процессах, возникающих в ней [2]. Большое значение процесс формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек имеет для заживления кожных ран, поскольку позволяет быстро уничтожать тканевой дебрис [3, 4]. М. Sabbatini с соавт. дает следующую характеристику нетоза и нейтрофильных внеклеточных ловушек: «...Нейтрофильные внеклеточные ловушки... представляют собой ячеистую сеть ДНК, гистоновых белков, а также микробицидных агентов, которая распространяется за пределы клетки в результате серии событий, затрагивающих ядро и цитоплазму. ...Нетоз, первоначально считавшийся защитным апоптотическим механизмом, теперь рассматривается как способ защиты в экстремальных ситуациях, который в отдельных случаях оказывает сильные неблагоприятные эффекты на физиологию тканей, усугубляя патологию...» [4]. Вместе с тем И. И. Долгушин и соавт. [3] считают, что нейтрофилы играют важную иммунорегуляторную роль как в условиях гомеостаза, являясь факторами врожденного иммунитета, так и при различных видах патологии. Авторы подчеркивают амбивалентную, т. е. двойную роль в тканях тканевых и циркулирующих нейтрофилов. Различают суицидальный и витальный нетоз. При суицидальном нетозе происходит гибель нейтрофила, в то время как при витальном нетозе нейтрофилы сохраняют способность повторно разрушать бактерии. Как долго могут существовать такие безъядерные нейтрофилы, пока в научной литературе сведения отсутствуют. Активация нетоза при его суицидальной форме может быть вызвана различными индукторами: микроорганизмами, бактериальными компонентами, активированными тромбоцитами, компонентами комплемента, аутоантителами, IL-8, перекисью водорода, кристаллами урата, сигаретным дымом и другими вредными факторами внешней и внутренней среды [3–5]. В результате действия этих факторов происходит активация внутриклеточной НАДФН-оксидазы. Она начинает вырабатывать актив-

ные формы кислорода, что вызывает в свою очередь деконденсацию хроматина, разрушение кариолеммы и проникновение в ядро нейтрофила ферментов азурофильных гранул. Это ведет к выходу ДНК и гистонов в цитоплазму нейтрофила. В результате внутриклеточного разрушения мембран гранул нейтрофилов и митохондрий их содержимое оседает на хроматине, и в результате формируются внутриклеточные нити хроматина, содержащие ферменты и бактерицидные вещества (нейтрофильная эластаза, миелопероксидаза, катепсин G, лактоферрин, желатиназа, лизоцим C, кальпротектин и другие, всего 24 белка). Эти бактерицидные вещества, ДНК и гистоны в комплексе Гольджи упаковываются в секреторные гранулы. Наряду с этим продолжается уменьшение конденсации хроматина. Ядро набухает и теряет свою специфическую конфигурацию в виде сегментов, округляясь (делобуляция ядра). Кариолема распадается на везикулы. Выделившиеся из нейтрофила отрицательно заряженные деконденсированные фибриллы хроматина служат скелетом для ловушки. Они распространяются и уплотняются с образованием внеклеточных нитей, сливающихся в сеть, или «ловушки» [1]. В последующем после формирования сети остатки плазмолеммы нейтрофила подвергается разрушению макрофагами и факторами внешней среды, в том числе и факторами, вызвавшими травматическое повреждение ткани. В дерматологии существует большая группа заболеваний, которая называется «нейтрофильные дерматозы» [2]. При них нейтрофилы становятся одними из главных клеток патогенеза. Работ, посвященных распределению нейтрофилов в соединительной ткани кожи в норме, мало [6]. При неблагоприятных воздействиях внешней среды в кожном покрове возникают повреждения и раневые процессы, сопровождающиеся воспалением. При них нейтрофилы опять-таки становятся одними из главных клеток. Поэтому изучение нетоза при указанных нозологиях является весьма актуальным. Одним из постоянных неблагоприятных факторов внешней среды, с которым постоянно сталкивается человек, является холод. Вместе с тем он используется в медицине как физиотерапевтический фактор, например, в виде местной гипотермии для уменьшения воспалительных процессов в тканях и снижения их гиперемии. Общее же охлаждение организма используется в хирургии, в частности в кардиохирургии и трансплантологии. Однако морфологические исследования суицидального

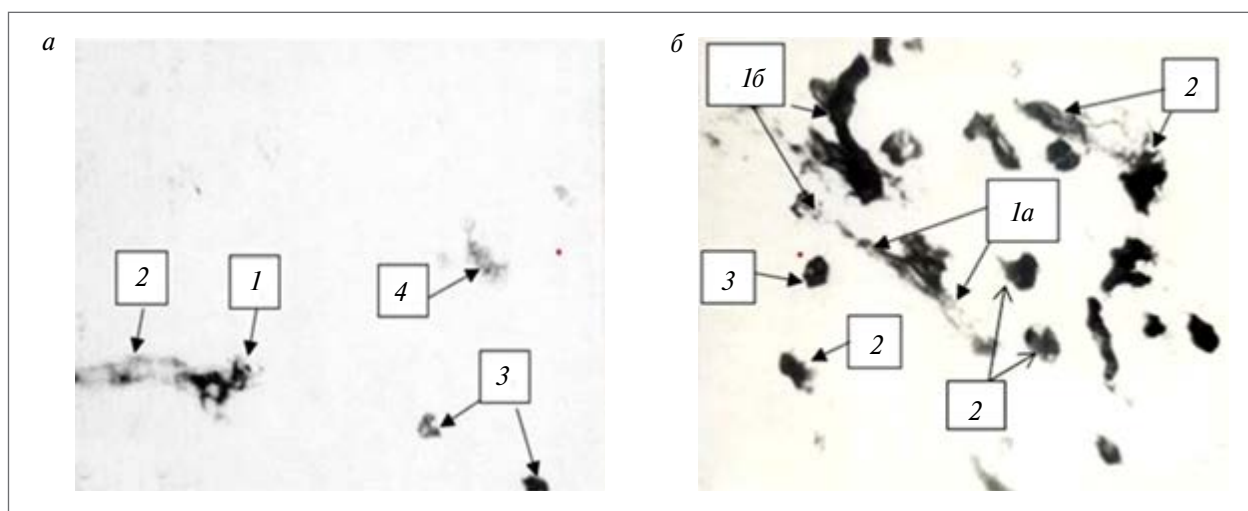
нетоза нейтрофильных лейкоцитов кожи в норме и при общей глубокой пролонгированной гипотермии на современном уровне изучены недостаточно.

**Цель работы** — изучение суицидального нетоза нейтрофилов кожи в условиях нормы и при воздействии на организм крыс общей глубокой пролонгированной гипотермии.

**Материалы и методы.** В работе использованы архивные материалы сотрудников кафедры УО «ВГМУ»: протоколы экспериментов, обзорные гистопрепараты и микрофотографии с них и гистоэнзимологических препаратов [6], изготовленные для научных целей. В то время когда выполнялись эксперименты (80–90-е гг. прошлого столетия), представления о нетозе отсутствовали. Указанные материалы сохранились и послужили в качестве объектов данного исследования. Эксперименты были выполнены на 120 белых беспородных крысах. Для моделирования общей глубокой пролонгированной гипотермии была использована оригинальная методика [7]. Животных после наркотизации эфиром на полиэтиленовой пленке помещали в ванночку на смесь воды и льда. Скорость охлаждения составляла  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  за 5 мин. После достижения ректальной температуры тела животных  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$  состояние гипотермии пролонгировали в течение 6 ч. Поскольку при такой температуре тела у большинства животных прекращалось собственное дыхание, использовали искусственное дыхание с помощью специального портативного дыхательного аппарата. По истечении времени пролонгации животных согревали с помощью лампы-рефлектора со скоростью аналогичной скорости охлаждения. Весь эксперимент от начала охлаждения до конца согревания занял около 10 ч. Животных декапитировали под эфирным наркозом на глубине охлаждения, сразу после его завершения, после завершения согревания и при возвращении двигательной активности, спустя 6 ч, 1 суток, а также через 3, 5, 7, 10, 15, 20 и 30 суток эксперимента. Кожу межлопаточной области получали с помощью пробойника диаметром 1 см. Парафиновые срезы окрашивали традиционным методом (гематоксилином и эозином) для обзорных целей. Замороженные в жидком азоте срезы толщиной 10 микрометров фиксировали 10 мин в ацетоне и выявляли в них щелочную фосфатазу по методу М. Берстона. Как указывают С. Н. Плескова и соавт. [5], этот метод позволяет успешно идентифицировать как неизмененные, так и подвергнутые нетозу нейтрофилы и позволяет описать кри-

терии нетоза. В качестве контроля служили интактные животные, материал от которых для объективности сравнения получали в одно и то же время с получением его от опытных животных каждого срока наблюдения в связи с большей продолжительностью эксперимента. Подсчет общего количества нейтрофилов и нейтрофилов в состоянии нетоза осуществляли с использованием программы обработки изображений ImageJ. Для морфометрической оценки в каждом препарате анализировали 30 непересекающихся полей зрения при увеличении 1000. Производили подсчет количества клеток с перерасчетом на  $1\text{ мм}^2$  площади микрофотографии. Производили 20 измерений по каждой микрофотографии. Полученные цифровые данные подвергали статистической обработке с использованием методов непараметрической статистики с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft inc., STA999K347156-W). Проверку статистических гипотез равенства средних генеральной совокупности проводили с помощью критерия  $U$  (Манна — Уитни) при принятом уровне значимости  $\alpha = 0,05$ . Результаты представлены в тексте (только достоверные) в виде средней ( $M$ ) и доверительного интервала.

**Результаты и их обсуждение.** При исследовании кожи интактных животных установлено, что в сосочковом слое дермы обнаруживались единичные нейтрофильные лейкоциты, расположенные в основном вблизи сосочковых капилляров (рисунок 1, а). Их число составляло  $6,00\text{ клеток/мм}^2$  ( $4,76\text{--}7,24$ ). Некоторые клетки находились в состоянии умеренного нетоза. Количество таких клеток было минимальным и составляло  $1,04\text{ клеток/мм}^2$  ( $0,24\text{--}1,84$ ). В отдельных участках эпидермиса в базальном слое обнаруживались группы кератиноцитов с низкой активностью щелочной фосфатазы. Активность фермента в неизмененных нейтрофилах была максимальной. В сетчатом слое дермы по сравнению с сосочковым слоем количество нейтрофилов было значительно и достоверно увеличено —  $24,00\text{ клеток/мм}^2$  ( $22,24\text{--}25,76$ ). Часть из них находилась вблизи гемокapилляров и формировала агрегаты, в которых значительная доля клеток была в состоянии нетоза. Количество нейтрофилов в состоянии нетоза составляло  $4,40\text{ клеток/мм}^2$  ( $2,98\text{--}5,82$ ), что было достоверно выше аналогичного показателя в сосочковом слое дермы. Помимо периваскулярных, обнаруживалось умеренное количество удаленных от микроциркуляторного русла клеток. Среди них также встречались клетки в состоянии нетоза (рисунок 1, б).

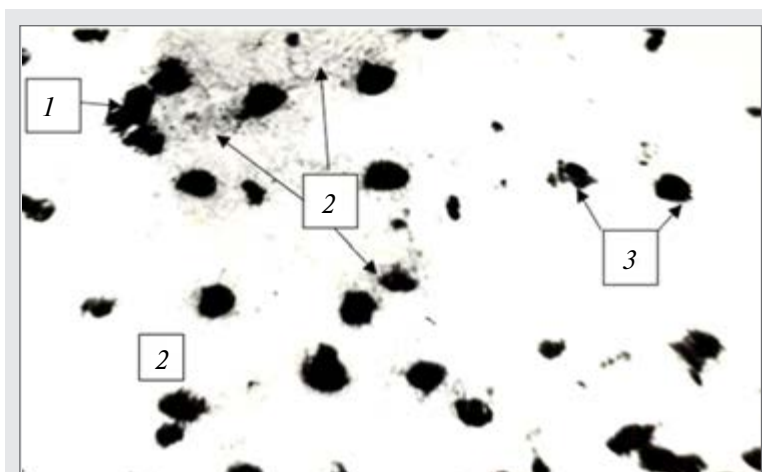


**Рисунок 1– Нейтрофильные лейкоциты сосочкового и сетчатого слоя дермы intactных животных:**

*a* – сосочковый слой (*1* – нейтрофил в состоянии нетоза; *2* – гемокапилляр; *3* – intactные нейтрофилы; *4* – участок базального слоя эпидермиса с фосфатазопозитивными кератиноцитами); *б* – сетчатый слой увеличение содержания нейтрофилов, часть из которых находится в состоянии нетоза (*1* – микрососуды: *1a* – гемокапилляр, *1б* – венула с максимальной активностью щелочной фосфатазы; *2* – нейтрофилы в состоянии нетоза: два нейтрофила образуют контакты, слева и вверху нити нейтрофильных внеклеточных ловушек; *3* – intactные нейтрофилы (Щелочная фосфатаза по М. Берстону (1965),  $\times 600$ .)

В гиподерме количество фосфатазопозитивных нейтрофилов существенно и достоверно увеличивалось по сравнению с этим показателем в сосочковом и сетчатом слоях дермы. Общая численность нейтрофилов на единицу площади составляла 58,80 клеток/мм<sup>2</sup> (53,73–63,87). Большинство клеток находились в состоянии дегрануляции и нетоза, при этом часть их формировала конгломераты. В этих конгломератах находились многочисленные нейтрофильные внеклеточные ловушки (рисунок 2).

Они представляли собой тонкие переплетающиеся нити, окрашивающиеся тетразолием в темносиний цвет. Эти нити выявлялись вблизи конгломератов нейтрофилов, вокруг разрозненных нейтрофилов в виде групп и лежащих отдельно нейтрофилов. Нити сливались и формировали сеть. Количество нейтрофилов в состоянии нетоза составляло 22,60 клеток/мм<sup>2</sup> (19,36–25,84). Таким образом, в коже intactных крыс существует градиент распределения нейтрофильных лейкоцитов. Значительная



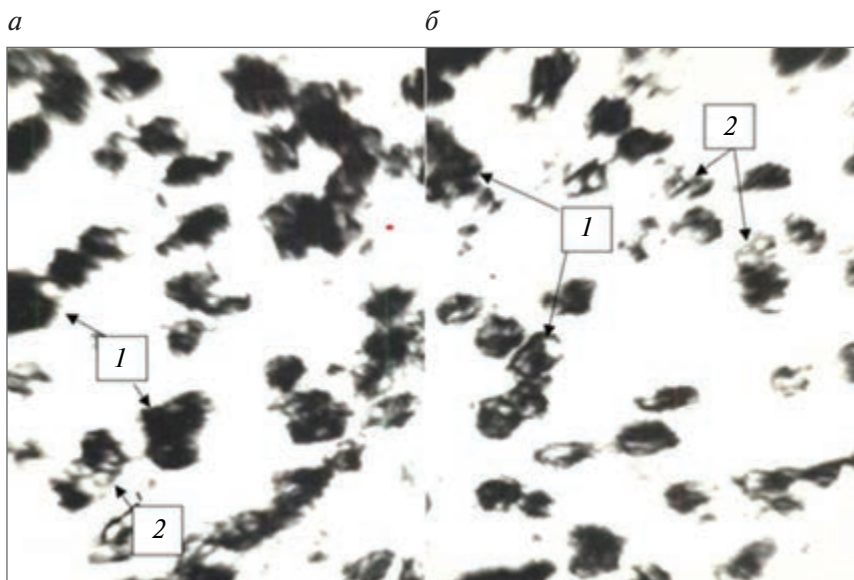
**Рисунок 2 – Значительное увеличение фосфатазопозитивных нейтрофильных лейкоцитов в гиподерме при нормотермии: *1* – нейтрофилы в состоянии нетоза, формирующие конгломераты; правее от них располагаются одиночные нейтрофилы в состоянии нетоза; *2* – нейтрофильные внеклеточные «ловушки»; *3* – нейтрофилы в состоянии дегрануляции (Щелочная фосфатаза по М. Берстону (1965),  $\times 1000$ .)**

часть нейтрофилов располагается периваскулярно, причем такие клетки часто находятся в состоянии нетоза. Наибольшее их количество



и активность обнаружены в гиподерме. При воздействии на организм животных общей глубокой гипотермии наблюдались как количественные, так и качественные изменения в популяции нейтрофилов кожи. На глубине охлаждения и в течение 6 ч после завершения согревания эти изменения были незначительными и достоверно не отличались от таковых при нормотермии. Однако уже через 1 и 3 суток после эксперимента происходило значительное увеличение количества нейтрофилов во всех слоях кожи, причем распространение их по слоям кожи было похоже на таковое при нормотермическом состоянии животных, т. е. градиентным, с минимумом в сосочковом слое дермы и максимумом в гиподерме, но на достоверно более высоком уровне. На глубине охлаждения сразу после согревания и через 6 ч после него изменения затрагивали в основном

эпидермис и сосудистое русло. Так, в эпидермисе, в котором в условиях нормотермии в кератиноцитах активность щелочной фосфатазы отсутствовала или выявлялись ее следы, через 1 сутки после согревания обнаруживалась достаточно высокая активность фермента. В стенках кровеносных микрососудов она была максимальной. Содержание нейтрофильных лейкоцитов в сосочковом слое практически не отличалось от такового в интактном контроле. В сетчатом слое дермы и гиподерме достоверные изменения также отсутствовали. На 3-и сутки постгипотермического периода наблюдалось выраженное достоверное увеличение количества нейтрофилов: в сосочковом слое 15,7 клеток/мм<sup>2</sup> (9,3–22,1), сетчатом слое дермы — 31,40 клеток/мм<sup>2</sup> (25,70–37,10), и в гиподерме — 71,81 клеток/мм<sup>2</sup> (65,92–77,69) (рисунок 3).



**Рисунок 3 — Увеличение содержания нейтрофильных лейкоцитов в гиподерме кожи крыс на 3-и (а) и 7-е сутки (б) постгипотермического периода:**

**1 — нейтрофилы в состоянии нетоза, формирующие конгломераты; 2 — нейтрофильные внеклеточные ловушки (Щелочная фосфатаза по М. Берстону (1965), ×1000.)**

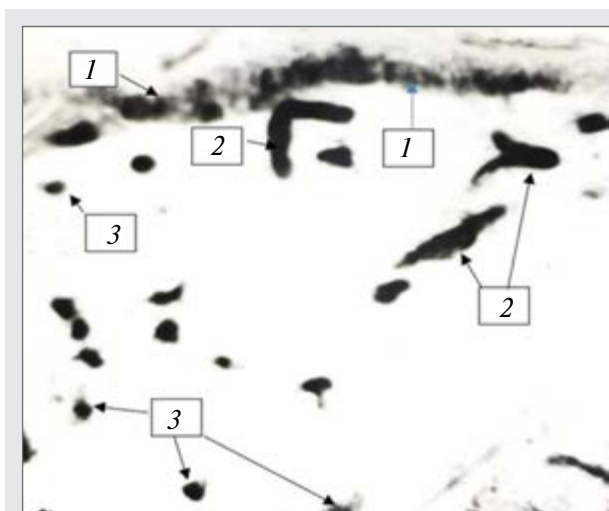
При этом возрастало и содержание нейтрофилов в состоянии нетоза. Многие нейтрофилы формировали агрегаты, в которых выявлялись нейтрофильные внеклеточные ловушки в виде сети. При этом погибающие нейтрофилы подвергались резкой деформации. Они формировали отростки, с помощью которых соседние нейтрофилы сливались друг с другом. В них наблюдались неокрашенные полости и просветления, формировались «тени» нейтрофилов. Похожие изменения наблюдались через 10 суток после охлаждения. Отличия от контрольных величин были достоверны. В

последующие сроки наблюдения (15–30-е сутки постгипотермического периода) происходило постепенное снижение количества нейтрофильных лейкоцитов и их физиологической активности до контрольных величин. Так, на 20-е сутки общее количество нейтрофилов в сосочковом слое составляло 7,75 клеток/мм<sup>2</sup> (4,53–10,97). Количество нейтрофилов в состоянии нетоза составляло 1,76 клеток/мм<sup>2</sup> (1,57–1,95). Возрастало количество неизмененных нейтрофилов. Следует также отметить, что на 3–10-е сутки постгипотермического периода в эпидермисе наблюдались значительные



участки, в которых в базальных и в нижних рядах шиповатых кератиноцитов регистрировалась достаточно высокая активность щелочной фосфатазы (рисунок 4). Как известно, этот фермент активируется в клетках, которые активно синтезируют ДНК и делятся митозом. К 30 суткам постгипотермического периода показатели достоверно от контрольных величин не отличались.

Таким образом, во всех соединительно-тканых слоях кожи находятся нейтрофильные лейкоциты, количество и функциональная активность которых в условиях нормы и при гипотермическом воздействии нарастают в направлении от сосочкового слоя к гиподерме. Это увеличение можно объяснить тем, что аналогичным образом в коже распределены кровеносные микрососуды, которые обеспечивают транслокацию нейтрофилов из крови в рыхлую соединительную ткань кожи. Объем микрососудов и рыхлой соединительной ткани в гиподерме максимальный. В ней нейтрофилы участвуют в обеспечении тканевого гомеостаза и гомеокинеза [2–5,7]. Несмотря на то что многие научные работы посвящены роли нетоза в патологических процессах, необходимо согласиться с утверждением авторов, которые рассматривают нетоз как физиологический процесс, прежде всего обеспечивающий участие его в формировании важнейшей функции внешнего покрова — барьерно-защитной [3–5]. Так, указывается, что при своей амбипотентности нейтрофилы могут проявлять как хелперное, так и супрессорное действие на клетки врожденного и адаптивного иммунитета. Поэтому подчеркивается их большая роль как в условиях гомеостаза, так и при различных видах патологии [3–5,7]. Нарастающий к глубоким слоям характер расположения нейтрофилов в коже, очевидно, следует рассматривать как «реализацию экономического использования механизмов ее барьерно-защитной функции». Так, с одной стороны, эпидермис обладает собственными мощными защитными свойствами, и в условиях нормы в расположенном под ним сосочковом слое дермы не требуется большое количество нейтрофилов. С другой стороны, наличие там хоть и небольшого количества этих клеток все же необходимо для участия в определенной степени в реализации тканевого гомеостаза, механизмы которого чрезвычайно разнообразны. Поэтому можно считать, что соединительная ткань гиподермы в связи с большим количеством в ней рыхлой соединительной ткани и микрососудов, через стенки которых в соединительную ткань из крови осуществляется пассаж нейтрофилов,



**Рисунок 4 — кожа белых крыс на 10-е сутки постгипотермического периода. Существенное уменьшение количества нейтрофилов и их функциональной активности. Выявление в базальных и шиповатых кератиноцитах эпидермиса максимальной активности щелочной фосфатазы: 1 — высокая активность щелочной фосфатазы в кератиноцитах базального и шиповатого слоев эпидермиса; 2 — кровеносные сосуды с максимальной активностью щелочной фосфатазы; 3 — нейтрофилы со слабо выраженным нетозом (метод М. Берстона, ×600)**

является своеобразным коллектором для этих клеток, которые, не исключено, в силу своей подвижности затем постоянно мигрируют в более высокие слои кожи. Нарушение структурного обеспечения этой функции в таком случае может лежать в основе не только дерматологических, но и многих общесоматических заболеваний. Таким образом, тканевой гомеостаз в коже обеспечивается мощной сбалансированной совокупностью клеток и структур эпидермиса, дермы и гиподермы. Общая глубокая пролонгированная гипотермия, не изменяя градиентного принципа локализации нейтрофилов в коже, спустя некоторое время после ее завершения приводила к увеличению количества этих клеток во всех слоях кожи с нарастанием их функциональной активности. Это выразилось в возрастании их количества в состоянии нетоза. Особенно резко такие изменения были выражены с 3 по 10-е сутки постгипотермического периода. Незначительную реакцию нейтрофилов на процесс охлаждения, его пролонгацию и согревание животных можно объяснить тем, что в это время под действи-

ем холодого фактора происходил спазм микрососудов, что, естественно, затрудняло пассаж нейтрофилов в расположенную более поверхностно дерму. В более поздние сроки постгипотермического периода существенное нарастание количества нейтрофилов в коже можно объяснить поражающим стрессорным деструктивным эффектом холодого фактора, который вызывает в коже воспалительный процесс и необходимость адаптивных процессов. В этих процессах, наряду с нейтрофилами и другими клетками, участвуют макрофаги кожи [3, 4]. В собственной работе [6] показано, что при общей глубокой гипотермии наряду с изменениями в коже количества нейтрофилов синхронно происходят изменения этих показателей со стороны 5-нуклеотидазопозитивных макрофагов кожи. Поскольку общая глубокая пролонгированная гипотермия является сильнейшим повреждающим фактором, как и другие травмирующие кожу факторы, в ней происходит гибель значительного количества клеток и внеклеточных структур [6]. Это должно привести к образованию дебриса, возникновению воспалительного процесса активации нейтрофилов, избыточному образованию ими нейтрофильных внеклеточных ловушек и к дополнительному повреждению клеток. Далее возможно формирование замкнутого порочного круга. Как уже отмечалось при цитировании авторов работ [3, 4], хотя нетоз и является физиологическим процессом, отвечающим на внедрение из внешней среды в кожу микроорганизмов и регулирующим воспаление и обычно хорошо завершающимся для организма, для достижения соответствующего сбалансированного состояния он может осуществлять устранение дефектных и «лишних» нейтрофилов и созданных ими внеклеточных ловушек. Эту функцию выполняют и клетки второй линии защиты — макрофаги. Поэтому после 10 суток постгипотермического периода наблюдалось постепенное снижение количества нейтрофилов и их нетозов с

возвращением к уровню интактного контроля. При разбалансировке процесса элиминации нейтрофилов и созданных ими нейтрофильных внеклеточных ловушек могут развиваться хроническое воспаление кожи — дерматозы, нарушаться заживление ран, повреждаться ткани органа и в конечном счете наступать его органная недостаточность [3–5].

**Заключение.** В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. В условиях нормы в соединительной ткани кожи животных происходит увеличение количества нейтрофильных лейкоцитов по направлению от сосочкового слоя дермы к сетчатому слою и далее к гиподерме. В сосочковом слое обнаруживаются немногочисленные нейтрофилы, тогда как в гиподерме их количество максимально.

2. Несмотря на низкое содержание нейтрофилов в сосочковом слое, некоторые из них находятся в состоянии нетоза, что является проявлением функциональной активности этих клеток по обеспечению тканевого гомеостаза.

3. После продолжительного общего глубокого охлаждения крыс во время проведения эксперимента и в первые часы после него выраженные изменения со стороны количества нейтрофилов и количества их нетозов отсутствовали, что может быть связано с вазоконстрикторным эффектом холодого фактора.

4. В более поздние сроки постгипотермического периода наблюдалось сильно выраженное увеличение количества нейтрофилов и их нетозов. Это может быть связано с воспалительными и репаративно-адаптивными процессами в тканях кожи в ответ на экстремальный экзогенный фактор.

5. Изученная характерная динамика формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек в коже позволяет объяснять закаливающее действие холодого фактора на организм гомойотермных животных.

### Список цитированных источников

1. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann [et al.] // *Science*. — 2004. — Vol. 303. — P. 1532–1535. DOI: 10.1126/science.1092385.
2. Адаскевич, В. П. Дерматозы нейтрофильные и эозинофильные / В. П. Адаскевич, О. Д. Мяделец. — М.: Медицинская книга, 2001. — 278 с.
3. Долгушин, И. И. Нейтрофильные гранулоциты: участие в гомеостатических и репаративных процессах. Часть II / И. И. Долгушин, Е. А. Мезенцева // *Инфекция и иммунитет*. — 2021. — Т. 11, № 1. — С. 25–41. DOI: 10.15789/2220-7619-NGP-1258.
4. Sabbatini, M. Netosis in Wound Healing: When Enough is Enough / M. Sabbatini, V. Magnelli, F. Reno // *Cells*. — 2021. — Vol. 3, № 10. — P. 494–508. DOI: 10.3390/Cells10030494.
5. Плескова, С. Н. Морфологические особенности быстрого и классического нетоза / С. Н. Плескова, Е. Н. Горшкова, Ф. В. Боряков // *Цитология*. — 2019. — Т. 61, № 9. — С. 704–712. DOI: 10.1134/S0041377119090098.

6. Мяделец, О. Д. Воздействие общей глубокой гипотермии на морфофункциональное состояние нейтрофильных лейкоцитов и макрофагов кожного региона / О. Д. Мяделец, А. Ф. Суханов // Проблемы криобиологии. — 1991. — № 2. — С. 23–27.

7. Борисов, В. А. Методика искусственной гипотермии на мелких лабораторных животных / В. А. Борисов, О. Д. Мяделец, В. Н. Бринкевич // Криобиология. — 1989. — № 4. — С. 49–51.

## **Neutrophilic extracellular traps in the skin of rats normothermia and general deep prolonged hypothermia**

*Myadelets, O. D., Myadelets, N. Ya.*

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

*Vitebsk State Medical College named after Academician I. P. Antonov, Vitebsk, Republic of Belarus*

The article presents the study of neutrophilic leukocytes and neutrophil extracellular traps of rat skin during normothermia and general deep prolonged hypothermia (18–20 °C in the rectum), followed by prolongation of the chilled state for 6 hours. Netosis was detected by staining full-thickness sections of skin for alkaline phosphatase according to the method of M. Burstone. Normally observed in the skin gradient of increase in the number of neutrophils and neutrophils exposed netosis, from the papillary layer to the hypodermis. At the cooling depth, after warming and in within 6 hours after it, the studied parameters did not significantly differ from control values. There was a significant increase compared to control of the total number of neutrophils in the state of netosis during 10 days of the posthypothermic period. Subsequently there was a gradual decrease in indicators of the level of control.

**Keywords:** rats, skin, neutrophils, neutrophil extracellular traps, normothermia, prolonged hypothermia.

*Постуила 02.09.2022*

УДК 616.381-002-092.4:616.36:612.111.19:577.175.44:612.56

## **ОБ УЧАСТИИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ И КЛЕТОК КУПФЕРА В РЕГУЛЯЦИИ СОДЕРЖАНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА В ПЕЧЕНИ И ЛИПОПРОТЕИНАХ КРОВИ, УРОВНЯ ЙОДСОДЕРЖАЩИХ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПЕРИТОНИТОМ**

*Чепелева Е. Н., Висмонт Ф. И.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Перитонит является одним из тяжелейших осложнений различных заболеваний и повреждений органов брюшной полости. Диагноз перитонита в общем смысле подразумевает любую форму и степень выраженности воспаления брюшины. В настоящее время проблема перитонита остается актуальной, несмотря на все достижения научно-технического прогресса. Так, несмотря на успехи современной хирургии, достижения асептики и антисептики, достаточно широкие возможности антибактериальной, инфузионной и детоксикационной терапии, частота возникновения перитонита и летальность от него остаются на высоком уровне.

Целью исследования являлось выяснение значимости активности аргиназы печени и клеток Купфера в регуляции содержания общего холестерина в печени и липопротеинах крови, уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы и температуры тела у крыс с экспериментальным перитонитом.

Установлено, что в условиях экспериментального перитонита у крыс снижается активность аргиназы печени, повышается содержание  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  и снижается уровень йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови, развивается вторичная атерогенная дислиппротеинемия. В изменениях содержания общего холестерина в печени, общего холестерина, холестерина липопротеинов, уровня йодсодержащих гормонов в крови и температуры тела при перитоните участвуют аргиназа печени и клетки Купфера.

Снижение активности клеток Купфера при перитоните сопровождается повышением уровня трийодтиронина в крови, менее выраженным снижением активности аргиназы печени и ослаблением развития характерных изменений в содержании общего холестерина в печени, холестерина липопротеинов в крови и препятствует развитию вторичной дислиппротеинемии. Депрессия аргиназы печени в условиях перитонита усугубляет изменения содержания общего холестерина в липопротеинах крови и печени, трийодтиронина в крови и способствует развитию вторичной дислиппротеинемии.

**Ключевые слова:** экспериментальный перитонит, клетки Купфера, аргиназа печени, холестерин липопротеинов, йодсодержащие гормоны.

**Введение.** Перитонит — локальная, регионарная или системная воспалительная реакция организма на развитие деструктивного и инфекционного процесса в органах брюшной полости, сопровождающаяся развитием абдоминального сепсиса с полиорганной дисфункцией. Перитонит представляет собой системный ответ организма на вовлечение брюшины в патологический процесс, в основе которого лежит комплекс патофизиологических реакций, проявляющийся тяжелой общей интоксикацией, нарушением водно-электролитного баланса и нарушением функций жизненно важных органов. Брюшина неизбежно реагирует на воспалительные или травматические изменения органов брюшной полости, что наряду с обширной площадью брюшины, исключительной важностью выполняемых ею функций, стремительным прогрессированием патологического процесса в замкнутой брюшной полости и тяжелым течением, не оставляет сомнений в опасности перитонита для жизнедеятельности организма.

Перитонит является хирургической, общеклинической и общепатологической проблемой. Несмотря на прогресс современной хирургии и реаниматологии, обширные возможности антибактериальной, инфузионной и детоксикационной терапии, летальность при распространенном перитоните составляет порядка 30 %, резко возрастающая среди больных с терминальной стадией перитонита и достигая 50–70 % [1].

В связи с этим поиск путей коррекции основных жизненных функций и обмена веществ при септических состояниях, и перитоните в частности, является одной из актуальных задач современной медицины.

Проведенные за последние десятилетия исследования позволили по-новому взглянуть на проблему перитонита и оценить роль печени в этом процессе.

Известно, что печеночная недостаточность сопровождается значительными нарушениями

обменных процессов, особое значение среди которых имеют изменения метаболизма липидов, в частности обмена липопротеинов (ЛП) сыворотки крови. Предполагается, что холестерин (ХС) ЛП, являясь важнейшим фактором поддержания физико-химических свойств и функций клеточных мембран, основным субстратом для стероидогенеза, обеспечивает формирование компенсаторного ответа организма на инфекцию.

Показано, что при септических состояниях и перитоните имеет место выраженная эндотоксинемия. К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значении аргиназы печени и клеток Купфера (КК) в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии, в процессах детоксикации и элиминации эндотоксинов в печени [2, 3]. Показано, что патогенные эффекты эндотоксинов на метаболизм и функции различных клеток и гепатоцитов, в частности при перитоните, связаны с усиленной продукцией КК целого ряда цитокинов, а также монооксида азота (NO), под воздействием которых происходят изменения в системе нейроэндокринной регуляции органов и систем.

Рядом исследователей выявлено, что печень участвует в метаболизме гормонов и физиологически активных веществ, имеет значение в регуляции обмена ХС ЛП сыворотки крови, и в частности, гормонов щитовидной железы, обеспечивая поддержание их оптимальной концентрации в крови [4].

Однако, несмотря на то что исследования по выяснению роли функционального состояния печени в патогенезе септических состояний многочисленны, значимость активности аргиназы печени и клеток КК в процессах изменения липидного профиля, метаболизма ХС ЛП крови, уровня йодсодержащих гормонов в плазме крови и температуры тела при перитоните остается во многом не изученной.



**Цель работы** — выяснить значимость активности аргиназы печени и клеток Купфера в регуляции содержания общего холестерина в печени и липопротеинах крови, уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови и температуры тела у крыс с экспериментальным перитонитом (CLP-модель).

**Материалы и методы.** Опыты выполнены на 124 взрослых белых крысах обоего пола массой 180–250 г. До постановки эксперимента животных адаптировали к условиям вивария. Они получали полноценный пищевой рацион в соответствии с правилами содержания лабораторных животных. Питьевой режим соответствовал принципу *ad libitum*.

В связи с имеющимися в литературе данными о том, что у животных в течение суток происходят значительные колебания уровня ряда гормонов и биогенных аминов в крови, которые сопровождаются изменениями в энергетическом и пластическом обмене, опыты проводили в строго определенное время (8–12 часов утра), соблюдая термонеутральные условия (20–22 °С).

Для создания экспериментального перитонита использована модель лигирования и последующего однократного пунктирования слепой кишки — CLP (*cecal ligation and puncture*) [5]. Для этого крысам под гексеналовым наркозом (100 мг/кг, внутривенно) производили 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). Пассаж 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 [5]. В качестве контроля использовали ложнопериорванных (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.

Селективную депрессию КК вызывали у животных за 12 ч до CLP-операции или ложной операции внутривенным введением водного раствора гадолиния хлорида ( $GdCl_3$ ) в дозе 10 мг/кг. Считается, что  $GdCl_3$  является селективным ингибитором КК [3]. Активность аргиназы печени определяли спектрофотометрически [6].

Декапитацию животных проводили через 24 ч после лигирования и пунктирования слепой кишки или ложной операции. Взятие для исследования крови, ткани печени у контрольных и опытных животных проводилось за максимально короткое время после декапитации. Суммарную фракцию липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) из сыворотки крови выделяли путем осаждения по методу M. Burstein, J. Samaille (1955). Для определения содержания общего ХС, ХС липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в сыворотке крови и ХС в тканевых гомогенатах проводили экстракцию липидов по методу М. А. Креховой, М. К. Чехрановой (1971). Содержание ХС в сухих липидных экстрактах сыворотки крови оценивали с использованием реакции Либермана — Бурхарда, а содержание ХС суммарной фракции ЛПОНП + ЛПНП — по формуле  $ХС\ ЛПОНП + ЛПНП = \text{общий ХС сыворотки крови} - ХС\ ЛПВП$ .

Коэффициент атерогенности рассчитывали по следующей формуле: коэффициент атерогенности =  $(ХС\ ЛПОНП + ЛПНП) / ХС\ ЛПВП$ .

Продукцию NO оценивали по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов ( $NO_3^-/NO_2^-$ ) [7], содержание общего трийодтиронина ( $T_3$ ) и тироксина ( $T_4$ ) в плазме крови — радиоиммунологическим методом с использованием наборов реактивов РИА- $T_3$ -СТ и РИА- $T_4$ -СТ производства УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси».

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

У всех животных с помощью электротермометра ТПЭМ-1 (НПО «Медфизприбор», Российская Федерация) измеряли ректальную температуру. Эксперименты проводили в соответствии с этическими нормами обращения с животными. Полученные цифровые данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики с помощью критерия Стьюдента. Все данные представляли в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего арифметического ( $\bar{X} \pm S_x$ ). Статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Опыты показали, что через 24 ч после CLP-операции у всех крыс развиваются некротические изме-

нения в слепой кишке, отмечается 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, но не у ЛО крыс, ректальная температура снижается на 1,1 °С: с  $37,9 \pm 0,09$  до  $36,8 \pm 0,21$  °С ( $p < 0,05$ ;  $n = 12$ ). Активность АлАТ и АсАТ в плазме крови животных с перитонитом через 24 ч после CLP-операции возростала. Развитие перитонита у крыс ( $n = 10$ ) сопровождалось повышением активности АлАТ в сыворотке крови по сравнению с данным показателем у ЛО животных ( $n = 10$ ) на 71,2 % ( $p < 0,01$ ): активность составляла  $0,59 \pm 0,05$  мккат/л у ЛО крыс и  $1,01 \pm 0,09$  мккат/л у опытных животных после CLP-операции. Активность АсАТ в плазме крови крыс в этих условиях возростала по сравнению с ее активностью у ЛО животных на 15,5 % ( $p < 0,05$ ) и составляла  $0,84 \pm 0,04$  мккат/л у ЛО крыс ( $n = 10$ ) и  $0,97 \pm 0,05$  мккат/л у опытных животных ( $n = 10$ ). Соотношение активностей АлАТ/АсАТ составляло  $0,70 \pm 0,04$  у ЛО крыс и  $1,04 \pm 0,08$  у животных с перитонитом.

Выявлено, что содержание общего ХС в печени крыс после CLP-операции повышалось на 14,1 % ( $p < 0,05$ ): у ЛО животных ( $n = 10$ ) оно составляло  $0,298 \pm 0,007$  мг/100 мг ткани, а у крыс с перитонитом ( $n = 10$ ) —  $0,340 \pm 0,014$  мг/100 мг ткани. Также имели место повышение уровня общего ХС в сыворотке крови на 23,3 % ( $p < 0,05$ ) — от  $2,66 \pm 0,14$  ( $n = 10$ ) до  $3,28 \pm 0,11$  мМоль/л ( $n = 10$ ) и выраженные изменения в содержании ХС различных классов ЛП в сыворотке крови крыс: содержание ХС ЛПВП по сравнению с таковым у ЛО животных снижалось на 37,1 % ( $p < 0,01$ ) — с  $1,32 \pm 0,09$  мМоль/л ( $n = 10$ ) до  $0,83 \pm 0,07$  мМоль/л ( $n = 10$ ), уровень ХС ЛПОНП + ЛПНП повышался на 82,8 % ( $p < 0,001$ ) — от  $1,34 \pm 0,07$  мМоль/л ( $n = 10$ ) до  $2,45 \pm 0,08$  мМоль/л ( $n = 10$ ). Установлено, что в условиях перитонита имеет место возрастание коэффициента атерогенности (Ка) на 189,2 % ( $p < 0,001$ ) — от  $1,02 \pm 0,07$  ед. у ЛО крыс ( $n = 10$ ) до  $2,95 \pm 0,08$  ед. у опытных животных ( $n = 10$ ).

Как следует из результатов исследования, повышение Ка обусловлено как понижением содержания ХС ЛПВП, так и главным образом увеличением содержания ХС суммарных фракций ЛПОНП + ЛПНП в крови, что свидетельствует о развитии вторичной атерогенной дислипотеинемии.

Обнаружено, что при перитоните через 24 ч после CLP-операции имеет место снижение в плазме крови крыс уровня  $T_4$  на 69,7 % ( $p < 0,05$ ) и содержания  $T_3$  на 24,1 % ( $p < 0,05$ ): с  $48,40 \pm 9,5$  нМоль/л у ЛО крыс ( $n = 8$ ) до  $14,67 \pm 1,6$  нМоль/л у опытных животных ( $n = 8$ ) и с  $1,62 \pm 0,12$  нМоль/л ( $n = 8$ ) до  $1,23 \pm 0,07$  нМоль/л ( $n = 8$ ) соответственно.

Выявлено, что в этих условиях у крыс изменяется активность аргиназы печени и содержание в плазме крови  $NO_3^-/NO_2^-$  — конечных продуктов деградации NO. Развитие перитонита у крыс приводило к снижению активности аргиназы печени и повышению концентрации  $NO_3^-/NO_2^-$  в плазме крови животных на 31,3% ( $p < 0,05$ ) и 81,8 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Активность аргиназы печени и концентрация  $NO_3^-/NO_2^-$  в плазме крови крыс с перитонитом ( $n = 8$ ) составляли  $3,1 \pm 0,26$  мкМоль мочевины/г ткани/час и  $9,58 \pm 1,27$  мкМоль/л.

Учитывая, что КК играют важные эндотоксинэлиминирующую и эндотоксинобезвреживающую функции в организме и в образовании целого ряда цитокинов, а также NO, участвующих в регуляции процессов жизнедеятельности, в частности в обмене тиреоидных гормонов и ЛП в крови, были основания полагать, что в выявленных изменениях тиреоидного статуса организма, содержания ХС ЛП и температуры тела в условиях перитонита, сопровождающегося печеночной дисфункцией, могут иметь значение и КК.

Подтверждение было получено в опытах на крысах при выяснении особенностей изменения температуры тела, содержания ХС ЛП, уровня  $NO_3^-/NO_2^-$  и тиреоидных гормонов в плазме крови в условиях действия в организме животных селективного ингибитора КК  $GdCl_3$ .

Обнаружено, что действие в организме у крыс  $GdCl_3$  в дозе 10 мкг/кг (дозе, подавляющей эндотоксинобезвреживающую функцию КК) сопровождается изменением температуры тела и уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови животных. Внутривентриальное введение раствора  $GdCl_3$  приводило через 12 ч после введения препарата к повышению температуры тела на 1,1 °С ( $p < 0,05$ ;  $n = 12$ ) по сравнению с контрольными животными (внутрибрюшинное введение 1,0 мл раствора). Через 12 ч после введения препарата возростал уровень  $T_3$  в плазме крови у крыс на 171,4 % ( $p < 0,05$ ;  $n = 8$ ), а концентрация  $T_4$  в крови была на 38,9 % ( $p < 0,05$ ;  $n = 8$ ) ниже, чем в контрольной группе.

Депрессия КК  $GdCl_3$  сопровождалась менее выраженным снижением активности арги-

назы печени и ослабляла развитие характерных изменений уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы, общего ХС в печени и ЛП

крови, а также температуры тела у крыс с перитонитом (таблица 1).

Таблица 1 — Изменение температуры тела, содержания общего холестерина в крови и печени, холестерина липопротеинов крови, активности АлАТ и АсАТ и уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови у крыс в эксперименте

Группа животных	Ректальная температура, °С	Общий ХС крови, мМоль/л	Общий ХС печени, мг/100 мг ткани	ХС ЛПВП, мМоль/л	ХС ЛПОНП + ЛПНП, мМоль/л
1. Интактные	37,4 ± 0,07 (n = 12)	2,68 ± 0,10 (n = 10)	0,271 ± 0,08 (n = 10)	1,35 ± 0,08 (n = 10)	1,33 ± 0,06 (n = 10)
2. ЛО	37,9 ± 0,09 (n = 12)	2,66 ± 0,14 (n = 10)	0,298 ± 0,007 (n = 10)	1,32 ± 0,09 (n = 10)	1,34 ± 0,07 (n = 10)
3. Перитонит	36,8 ± 0,21 * <i>p</i> <sub>3-2</sub> < 0,05 (n = 12)	3,28 ± 0,11 * <i>p</i> <sub>3-2</sub> < 0,05 (n = 10)	0,340 ± 0,014 * <i>p</i> <sub>3-2</sub> < 0,05 (n = 10)	0,83 ± 0,07 * <i>p</i> <sub>3-2</sub> < 0,01 (n = 10)	2,45 ± 0,08 * <i>p</i> <sub>3-2</sub> < 0,01 (n = 10)
4. Физраствор + перитонит	36,9 ± 0,27 (n = 12)	3,26 ± 0,12 (n = 10)	0,346 ± 0,011 (n = 10)	0,86 ± 0,08 (n = 10)	2,40 ± 0,09 (n = 10)
5. GdCl <sub>3</sub> + перитонит	36,3 ± 0,23 * <i>p</i> <sub>5-4</sub> < 0,05 (n = 12)	2,54 ± 0,12 * <i>p</i> <sub>5-4</sub> < 0,05 (n = 10)	0,287 ± 0,015 * <i>p</i> <sub>5-4</sub> < 0,05 (n = 10)	1,08 ± 0,11 * <i>p</i> <sub>5-4</sub> < 0,01 (n = 10)	1,46 ± 0,07 * <i>p</i> <sub>5-4</sub> < 0,01 (n = 10)

Ка, ед.	АлАТ/АсАТ	АлАТ, мккат/л	АсАТ, мккат/л	T <sub>3</sub> , нМоль/л	T <sub>4</sub> , нМоль/л
0,99 ± 0,05 (n = 10)	0,82 ± 0,04 (n = 10)	0,51 ± 0,05 (n = 10)	0,62 ± 0,04 (n = 10)	1,6 ± 0,11 (n = 8)	54,6 ± 5,22 (n = 8)
1,02 ± 0,07 (n = 10)	0,70 ± 0,04 (n = 10)	0,59 ± 0,05 (n = 10)	0,84 ± 0,04 (n = 10)	1,62 ± 0,12 (n = 8)	48,40 ± 9,5 (n = 8)
2,95 ± 0,08 * <i>p</i> <sub>3-2</sub> < 0,01 (n = 10)	1,04 ± 0,08 * <i>p</i> <sub>3-2</sub> < 0,01 (n = 10)	1,01 ± 0,09 * <i>p</i> <sub>3-2</sub> < 0,01 (n = 10)	0,97 ± 0,05 * <i>p</i> <sub>3-2</sub> < 0,05 (n = 10)	1,23 ± 0,07 * <i>p</i> <sub>3-2</sub> < 0,05 (n = 8)	14,67 ± 1,6 * <i>p</i> <sub>3-2</sub> < 0,05 (n = 8)
2,79 ± 0,07 (n = 10)	1,37 ± 0,06 (n = 10)	0,97 ± 0,11 (n = 10)	0,71 ± 0,04 (n = 10)	1,24 ± 0,06 (n = 8)	14,71 ± 1,7 (n = 8)
1,24 ± 0,09 * <i>p</i> <sub>5-4</sub> < 0,01 (n = 10)	1,11 ± 0,06 * <i>p</i> <sub>5-4</sub> < 0,05 (n = 10)	0,72 ± 0,07 * <i>p</i> <sub>5-4</sub> < 0,05 (n = 10)	0,65 ± 0,05 * <i>p</i> <sub>5-4</sub> < 0,05 (n = 10)	1,58 ± 0,09 * <i>p</i> <sub>5-4</sub> < 0,05 (n = 8)	44,51 ± 7,8 * <i>p</i> <sub>5-4</sub> < 0,05 (n = 8)

\* Изменения достоверны по отношению к контролю.

Опыты показали, что предварительное (за 12 ч до CLP-операции) введение крысам GdCl<sub>3</sub> в дозе 10 мг/кг не приводило к значительному снижению содержания общего T<sub>4</sub> в их крови по сравнению с животными контрольной группы. Содержание T<sub>4</sub> в плазме крови крыс опытной группы (n = 8) увеличилось на 302,6 % (*p* < 0,01) по сравнению с его уровнем в крови животных контрольной группы (n = 8), подвергнутых CLP-операции и получивших внутривентриально 1,0 мл физраствора. Применение GdCl<sub>3</sub> препятствовало и практически устраняло снижение содержания T<sub>3</sub> у животных с перитонитом, а также приводило к менее

значимому снижению активности аргиназы печени и не столь выраженному повышению уровня NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в крови. Через 24 ч после CLP-операции концентрация T<sub>3</sub> в плазме крови крыс (n = 8), предварительно получивших GdCl<sub>3</sub>, составила 1,58 ± 0,09 нМоль/л, а у крыс с перитонитом (n = 8), предварительно получивших физраствор, — 1,24 ± 0,06 мМоль/л. Активность аргиназы печени у крыс с перитонитом, получивших GdCl<sub>3</sub>, по сравнению с животными с перитонитом, получившими физраствор, была выше на 17,8 % (*p* < 0,05), а уровень NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в плазме крови животных был ниже на 31,8 % (*p* < 0,05) и составлял соответ-

ственно  $3,75 \pm 0,28$  мкМоль мочевины/г ткани/час ( $n = 8$ ) и  $6,51 \pm 1,04$  мкМоль/л ( $n = 8$ ).

Выявлено, что у крыс с перитонитом в условиях депрессии КК ( $n = 10$ ) отмечаются менее выраженные изменения содержания общего ХС в крови и печени, ХС ЛП в крови, а также менее значимое повышение уровня АлАТ и АсАТ в плазме крови. Так, уровень общего ХС в крови и печени в этих условиях по сравнению с его уровнем у животных контрольной группы ( $n = 10$ ), подвергшихся СLP-операции и получивших внутривентриально 1,0 мл физраствора, был ниже на 22,1 и 17,1 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Имело место снижение по сравнению с животными контрольной группы содержания ХС ЛПОНП + ЛПНП в сыворотке крови на 39,1% ( $p < 0,01$ ;  $n = 10$ ) и повышение содержания ХС ЛПВП в сыворотке крови на 22,6 % ( $p < 0,01$ ;  $n = 10$ ). Активность АлАТ и АсАТ в плазме крови крыс опытной группы ( $n = 10$ ) (развитие перитонита в условиях депрессии КК) по сравнению с животными с перитонитом, получившими физраствор ( $n = 10$ ), понижалась на 25,8 и 28,6 % ( $p < 0,01$ ) соответственно.

Температура тела у крыс с перитонитом, которым до СLP-операции предварительно внутривентриально вводили  $GdCl_3$  (10 мкг/кг), была ниже на 0,6 °С ( $p < 0,05$ ;  $n = 12$ ) по сравнению с животными с экспериментальным перитонитом, которые получили 1,0 мл физраствора.

Известно, что у людей и крыс более 2/3 циркулирующего 3,5,3'-трийодтиронина — высокоэффективного тиреоидного гормона — продуцируется в периферических органах из тироксина путем 5'-дейодирования последнего. Показано, что конверсия  $T_4$  в  $T_3$ , происходящая в основном в печени, — одно из ведущих звеньев клеточного метаболизма тиреоидных гормонов, во многом определяющего тиреоидный статус организма. Показано, что тиреоидные гормоны ингибируют окисление ХС ЛПНП, проявляя тем самым антиатерогенный эффект. В некоторых исследованиях показано, что тиреоидные гормоны могут стимулировать активность ГМГ-КоА-редуктазы — ключевого фермента биосинтеза ХС и таким образом индуцировать синтез ХС.

Можно было предположить, что выявленные изменения уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови при перитоните в условиях поражения печени  $GdCl_3$  могут быть обусловлены изменениями функционального состояния печени, ее детоксикационной и эндотоксинобезвреживающей функций и, возможно, являются важным звеном оптимизации

тиреоидного статуса организма при этом состоянии.

С целью подтверждения выдвинутого предположения представляло интерес выяснить значимость гипертиреоидного состояния, вызываемого  $T_3$ , в выявленных изменениях содержания ХС в печени, ЛП крови и температуры тела у крыс при перитоните, вызываемом СLP-операцией.

С этой целью были изучены сдвиги содержания общего ХС в крови и печени и ХС ЛП крови, а также изменения ректальной температуры у крыс с повышенным уровнем йодсодержащих гормонов в организме при перитоните. Для этого крысам через 3 ч после оперативного вмешательства (ЛО или СLP-операции) однократно интрагастрально вводили на 1%-м крахмальном растворе синтетический препарат трийодтиронина гидрохлорид (Liothyronin, Berlin Chemi, Германия) в дозе 30 мкг/кг.

Установлено, что интрагастральное введение  $T_3$  крысам через 3 ч после СLP-операции предотвращает развитие у них гипотермии. Так, если через 24 ч после СLP-операции ректальная температура снижалась с  $37,9 \pm 0,09$  °С ( $n = 12$ ) до  $36,8 \pm 0,21$  °С ( $n = 12$ ) ( $p < 0,05$ ), то в условиях действия  $T_3$  у крыс с перитонитом ( $n = 12$ ) она составляла  $37,8 \pm 0,29$  °С ( $p < 0,05$ ). У крыс с перитонитом действие  $T_3$  ослабляло вызываемое СLP-операцией снижение содержания ХС ЛПВП в крови, а также характерное для перитонита повышение уровня ХС в печени, ХС ЛПОНП + ЛПНП в крови и коэффициента атерогенности. Так, если у крыс с экспериментальным перитонитом, получивших интрагастрально 1,0 мл 1%-го крахмального раствора, содержание ХС ЛПВП крови понижалось на 37,7 % ( $p < 0,01$ ): с  $1,30 \pm 0,11$  мМоль/л у ЛО животных ( $n = 10$ ), получивших 1%-й крахмальный раствор, до  $0,81 \pm 0,07$  мМоль/л у крыс с перитонитом ( $n = 10$ ), получивших 1%-й крахмальный раствор, то у крыс с перитонитом, получивших  $T_3$  ( $n = 8$ ), данный показатель по сравнению с ЛО крысами ( $n = 10$ ), получившими 1%-й крахмальный раствор, снижался лишь на 19,2 % ( $p < 0,01$ ) — до  $1,05 \pm 0,04$  мМоль/л.

Развитие перитонита у крыс, получивших  $T_3$ , сопровождалось менее значимым возрастанием в крови содержания ХС ЛПОНП + ЛПНП — на 29,3 % ( $p < 0,01$ ). Содержание ХС ЛПНОП + ЛПНП в крови животных с перитонитом, получивших 1%-й крахмальный раствор ( $n = 8$ ), составляло  $2,49 \pm 0,08$  мМоль/л, а у крыс с перитонитом, получивших  $T_3$  ( $n = 8$ ), —  $1,76 \pm 0,14$  мМоль/л. Коэффициент атерогенности у крыс с перитонитом, получив-



ших 1%-й раствор крахмала, повысился до 192,4 % ( $p < 0,01$ ): от  $1,05 \pm 0,05$  ед. у ЛО животных ( $n = 10$ ) до  $3,07 \pm 0,16$  ед. у крыс с перитонитом ( $n = 10$ ), в то время как у животных, получивших  $T_3$  на 1%-м крахмальном растворе, развитие перитонита сопровождалось менее выраженным возрастанием данного показателя — на 60,0 % ( $p < 0,01$ ): от  $1,05 \pm 0,05$  ед. у ЛО крыс, получивших 1%-й крахмальным раствором ( $n = 10$ ), до  $1,68 \pm 0,11$  ед. у крыс с перитонитом, получивших  $T_3$  на 1%-м крахмальном растворе ( $n = 8$ ).

У крыс с перитонитом, получивших  $T_3$  на 1%-м крахмальном растворе ( $n = 8$ ), по

сравнению с животными после CLP-операции и получивших 1%-й крахмальным раствором содержание общего ХС в печени крыс было меньше на 12,9 % ( $p < 0,05$ ):  $0,340 \pm 0,014$  у крыс с перитонитом, получивших 1%-й крахмальным раствором ( $n = 10$ ), и  $0,296 \pm 0,018$  мг/100 г ткани у крыс с перитонитом, получивших  $T_3$  на 1%-м крахмальном растворе ( $n = 8$ ).

Изменения ректальной температуры, содержания общего ХС в печени и крови и уровня ХС ЛП в крови после CLP-операции у крыс, получивших интрагастрально  $T_3$  (30 мкг/кг), представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Изменения ректальной температуры, содержания общего ХС в крови и печени и уровня ХС ЛП крови после CLP-операции у крыс, получивших интрагастрально  $T_3$  (30 мкг/кг)

Группа животных	Ректальная температура, °С	Общий ХС печени, мг/100 мг ткани	Общий ХС крови, мМоль/л	ХС ЛПВП, мМоль/л	ХС ЛПОНП + ЛПНП, мМоль/л	Ка, ед.
1. ЛО + 1%-й крахмальным раствором	$37,8 \pm 0,10$ ( $n = 12$ )	$0,307 \pm 0,009$ ( $n = 8$ )	$2,66 \pm 0,12$ ( $n = 10$ )	$1,30 \pm 0,11$ ( $n = 10$ )	$1,36 \pm 0,06$ ( $n = 10$ )	$1,05 \pm 0,05$ ( $n = 10$ )
2. Перитонит + 1%-й крахмальным раствором	$36,6 \pm 0,21$ $*p_{2-1} < 0,05$ ( $n = 12$ )	$0,340 \pm 0,014$ $*p_{2-1} < 0,05$ ( $n = 10$ )	$3,30 \pm 0,11$ $*p_{2-1} < 0,05$ ( $n = 10$ )	$0,81 \pm 0,07$ $*p_{2-1} < 0,01$ ( $n = 10$ )	$2,49 \pm 0,08$ $*p_{2-1} < 0,01$ ( $n = 10$ )	$3,07 \pm 0,16$ $*p_{2-1} < 0,01$ ( $n = 10$ )
3. ЛО + $T_3$ на 1%-м крахмальном растворе	$38,5 \pm 0,32$ ( $n = 12$ )	$0,281 \pm 0,016$ ( $n = 8$ )	$2,48 \pm 0,14$ ( $n = 8$ )	$1,41 \pm 0,12$ ( $n = 8$ )	$1,07 \pm 0,11$ ( $n = 8$ )	$0,76 \pm 0,07$ ( $n = 8$ )
4. Перитонит + $T_3$ на 1%-м крахмальном растворе	$37,8 \pm 0,29$ $*p_{4-3} < 0,05$ $*p_{4-2} < 0,05$ ( $n = 12$ )	$0,296 \pm 0,018$ $*p_{4-3} < 0,01$ $*p_{4-2} < 0,05$ ( $n = 8$ )	$2,81 \pm 0,16$ $*p_{4-3} < 0,05$ $*p_{4-2} < 0,05$ ( $n = 8$ )	$1,05 \pm 0,04$ $*p_{4-3} < 0,01$ $*p_{4-2} < 0,01$ ( $n = 8$ )	$1,76 \pm 0,14$ $*p_{4-3} < 0,01$ $*p_{4-2} < 0,05$ ( $n = 8$ )	$1,68 \pm 0,11$ $*p_{4-3} < 0,01$ $*p_{4-2} < 0,01$ ( $n = 8$ )

\* Изменения достоверны по отношению к контролю.

Таким образом, развитие перитонита у крыс, которым интрагастрально однократно вводили  $T_3$  на 1%-м крахмальном растворе, сопровождалось менее значительным приростом содержания общего ХС в печени и крови, ХС ЛПОНП + ЛПНП, менее значимым снижением ХС ЛПВП в крови и коэффициента атерогенности по сравнению с таковыми в контрольной группе животных после CLP-операции. Полученные экспериментальные данные дают основание полагать, что повышение уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови при перитоните, как и в условиях депрессии КК  $GdCl_3$ , ослабляет характерные для его развития атерогенные нарушения показателей липопротеинового обмена крови.

Обнаружено, что в условиях депрессии аргиназы печени, вызванной внутрибрюшинным

введением за 24 и 12 ч до CLP-операции ингибитора аргиназы  $N^{\omega}$ -гидрокси-нор-L-аргинина (nor-NOHA) фирмы VAScEM (Германия) в дозе 10 мг/кг развитие перитонита сопровождалось более выраженными изменениями содержания ХС ЛП в крови и печени.

Развитие перитонита у крыс ( $n = 8$ ), получивших nor-NOHA, по сравнению с животными после CLP-операции и получивших физраствор, сопровождалось более значимым возрастанием содержания ХС ЛПОНП + ЛПНП — на 28,5 % ( $p < 0,01$ ) и составило  $3,16 \pm 0,11$  мМоль/л. У крыс с перитонитом, получивших nor-NOHA, по сравнению с животными указанной контрольной группы, содержание общего ХС в сыворотке крови и печени крыс были больше на 19,1 и 14,8 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. У крыс с перитони-

том содержание общего ХС в сыворотке крови в этих условиях составляло  $3,70 \pm 0,12$  ммоль/л, а в печени —  $0,365 \pm 0,016$  мг/100 г ткани.

Установлено, что у крыс с CLP-перитонитом (через 24 ч с момента CLP-операции) в условиях угнетения аргиназы печени погНОНА содержание  $T_3$  и  $T_4$  в крови было ниже по сравнению с контрольными (физраствор внутривенно за 24 и 12 ч до CLP-операции) на 44,1 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) и 15,6 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) соответственно, а уровень  $NO_3^-/NO_2^-$  возрос на 30,4 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ).

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях экспериментального перитонита у крыс через 24 ч после CLP-операции снижается активность аргиназы печени, уровень йодсодержащих гормонов щитовидной железы, повышается содержание  $NO_3^-/NO_2^-$  в крови, развивается вторичная ате-

рогенная дислиппротеинемия. В изменениях содержания общего холестерина в печени и липопротеинах крови, уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови и температуре тела при перитоните (CLP-модель) участвуют аргиназа печени, клетки Купфера и монооксид азота. Угнетение клеток Купфера при перитоните сопровождается менее выраженным снижением активности аргиназы печени, уровня трийодтиронина в крови и ослаблением развития характерных изменений в содержании общего холестерина в печени, холестерина липопротеинов и  $NO_3^-/NO_2^-$  в крови и препятствует развитию вторичной дислиппротеинемии. Депрессия аргиназы печени усугубляет изменения содержания общего холестерина в липопротеинах крови и печени, трийодтиронина в крови и способствует развитию вторичной дислиппротеинемии.

#### Список цитированных источников

1. Перитонит как одна из основных причин летальных исходов / Н. Д. Томнюк [и др.] // Современные наукоемкие технологии. — 2010. — № 10. — С. 81–84.
2. Висмонт, Ф. И. О роли клеток Купфера и гепатоцитов в механизмах реализации влияния трийодтиронина на процессы детоксикации и регуляции температуры тела / Ф. И. Висмонт, С. А. Артюшкевич // Белорус. мед. журн. — 2005. — Т. 13, № 3. — С. 45–47.
3. Volmar, B. Modulation of Kupfer cells activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats / B. Volmar, D. Rettinger, G. A. Wanner // Shock. — 1996. — Vol. 6, № 6. — P. 434–441.
4. Функциональное состояние щитовидной железы и липидный профиль крови / С. В. Мустафина [и др.] // Атеросклероз. — 2010. — Т. 6, № 2. — С. 15–19.
5. 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.
6. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation / H. Moshage [et al.] // Clin. Chem. — 1995. — Vol. 41, № 6. — P. 892–896.
7. Geyer, J. W. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates / J. W. Geyer, D. Dabich // Analytical Biochemistry. — 1971. — Vol. 39, № 2. — P. 412–417.

## On the involvement of liver arginase and Kupffer cells in the regulation of cholesterol in the liver and blood lipoproteins, the level of iodine-containing thyroid hormones and body temperature in rats with experimental peritonitis

*Chepeleva E. N., Vismont F. I.*

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

It has been established that under conditions of experimental peritonitis in rats, the activity of liver arginase decreases, the content of  $NO_3^-/NO_2^-$  increases and the level of iodine-containing thyroid hormones in the blood decreases, secondary atherogenic dyslipoproteinemia develops. Liver arginase and Kupffer cells are involved in changes in the content of total cholesterol in the liver, total cholesterol, lipoprotein cholesterol, the level of iodine-containing hormones in the blood and body temperature in peritonitis.

A decrease in the activity of Kupffer cells in peritonitis is accompanied by an increase in the level of triiodothyronine in the blood, a less pronounced decrease in the activity of liver arginase and a weakening of the development of characteristic changes in the content of total cholesterol in the liver,

lipoprotein cholesterol in the blood and prevents the development of secondary dyslipoproteinemia. Depression of liver arginase in conditions of peritonitis aggravates changes in the content of total cholesterol in blood and liver lipoproteins, triiodothyronine in the blood and contributes to the development of secondary dyslipoproteinemia.

**Keywords:** experimental peritonitis, Kupffer cells, liver arginase, cholesterol lipoproteins, iodine-containing hormones.

*Поступила 02.06.2022*

УДК 577.113.083:611.018.5

## ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КРОВИ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ: КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

*Лямцева А. К., Костюк С. А., Жевнеронок И. В., Полюян О. С.,  
Руденкова Т. В., Глинкина Т. В.*

*Государственное учреждение образования  
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Качество ДНК зависит как от качества биологического материала, из которого она была выделена, так и от способа выделения. К настоящему времени разработано большое количество методик экстракции ДНК, и выбор конкретного метода осуществляют на основе таких факторов, как высокий выход нуклеиновой кислоты, быстрота метода, высокая степень чистоты и др. Оптимизация выделения ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени дает возможность повысить репрезентативность и достоверность полученных результатов.

**Ключевые слова:** выделение ДНК, полимеразная цепная реакция, цельная кровь, оптимизация.

**Введение.** ПЦР признана быстрым, чувствительным и специфичным инструментом молекулярной диагностики для анализа нуклеиновых кислот. Однако чувствительность и кинетика ПЦР-анализа может быть значительно снижена с таким биологическим материалом, как кровь, из-за ингибирующих ПЦР компонентов [1].

Выбор подходящего метода для быстрого, безопасного и бюджетного выделения чистой ДНК является необходимым условием для проведения исследований. В связи с этим выбор подходящего биологического материала зависит от многих факторов. Помимо чистоты и выхода, также учитываются инвазивность метода сбора образцов, наличие специализированного оборудования, обученного персонала, а также риск инфекций. Тем не менее цельная кровь остается основным источником ДНК для диагностических целей. К настоящему времени разработано большое количество методик выделения ДНК, основанных на различных принципах, таких как фенол-хлороформная экстракция,

магнитные частицы, хроматографические методы, сорбция на различных носителях [2].

Одним из наиболее распространенных в лабораторной диагностике методов выделения и очистки ДНК является сорбция нуклеиновых кислот на поверхности частиц.

**Цель работы** — поиск оптимального метода выделения ДНК из крови и ее компонентов для использования метода сорбционной экстракции.

**Материалы и методы.** Исследования были проведены на базе научно-исследовательской лаборатории ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования». При оптимизации методики выделения использовали 15 образцов крови волонтеров. В качестве исследуемых объектов использовали: цельную кровь, клеточную массу крови, лейкоцитарную фракцию после центрифугирования цельной крови, лейкоцитарную фракцию после лизирующего буфера цельной крови/клеточной массы крови, мононуклеарные клетки периферической крови.

**Цельная кровь.** Взятие крови в объеме 9 мл производили с антикоагулянтном ЭДТА из локтевой вены (пробирки вакуумные «МиниМед», РФ). Полученную кровь делили на аликвоты по 2 мл для проведения дальнейших исследований.

**Клеточная масса крови.** Для получения клеточной массы крови 1,5 мл цельной крови центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Полученную плазму переносили в сухие чистые пробирки, оставшийся клеточный осадок использовали для дальнейшего исследования.

**Лейкоцитарная фракция после центрифугирования цельной крови.** В чистую сухую пробирку вносили 1,5 мл цельной крови и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин (центрифуга MPW-55, MPW Med. Instruments, Польша). Верхний слой плазмы (500–600 мкл) с лейкоцитами переносили в другую чистую сухую пробирку и повторно центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли, оставляя 300 мкл плазмы над осадком клеток; осадок клеток и оставленную надосадочную жидкость использовали для исследования.

**Лейкоцитарная фракция после добавления лизирующего буфера к цельной крови/клеточной массе крови.** К 100 мкл цельной крови/клеточной массы крови добавляли 300 мкл лизирующего буфера (VersaLyse Lysing Solution, Beckman Coulter), инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Добавляли 1 мл физиологического раствора, перемешивали, центрифугировали 5 мин при 1400 об/мин. После удаления надосадочной жидкости добавляли 1 мл физиологического раствора, перемешивали, центрифугировали 5 мин при 1400 об/мин. Надосадочную жидкость удалили, к осадку, содержащему лейкоцитарную фракцию, добавляли 300 мкл физиологического раствора и использовали для дальнейшего исследования.

**Мононуклеарные клетки периферической крови.** В пробирку вносили раствор фиколлурографина в количестве 1 мл, сверху аккуратно наслаивали 2 мл цельной крови, центрифугировали 30 мин 1500 об/мин при комнатной температуре. На границе раздела фаз отбирали кольцо мононуклеарных клеток и переносили в новую пробирку. Клетки подвергали 3-кратному отмыванию в 1,5 мл физиологического раствора с режимом центрифугирования 1500 об/мин в течение 15 мин. К осадку выделенных клеток добавляли 500 мкл физиологического раствора и использовали для дальнейшего исследования.

В ходе оптимизации метода выделения ДНК из крови и ее компонентов были использованы следующие наборы реагентов: «АртДНК легкий» («АртБиоТех», Беларусь), «Экстракция-100» («ВекторБест», РФ) и «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс», РФ). После выделения ДНК из образцов биологического материала с использованием различных наборов реагентов провели сравнение значений показателя  $A_{260/280}$  (определение чистоты препарата и концентрации ДНК), наличие амплификации гена  $\beta$ -глобина человека (значение  $C_t$ , кривые плавления) и контроля экстракции внутреннего контрольного образца (ВКО). Качественное выявление проводили методом ПЦР в режиме реального времени с применением тест-систем «АртТест» (АртБиоТех, Беларусь). Амплификацию проводили на термоциклере Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия).

В состав реакционной смеси для амплификации участка гена  $\beta$ -глобина человека были включены:

forward-праймер —  
5'-GGCAGGTTGGTATCAAGGTTAC-3',  
reverse-праймер —  
5'-CCTAAGGGTGGGAAAATAGACC-3',  
зонд — 5'-ROX-  
ACTGGGCATGTGGAGACAGA-BHQ2-3'.

Состав смеси: 12,5 мкл «2X премикс для ПЦР-РВ» (Прайтех, Беларусь); 1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров (прямого и обратного); 1,0 мкл интеркалирующего красителя ZUBR Green-1; 7,5 мкл воды и 3 мкл выделенной ДНК. Программа амплификации: 1 цикл: 94 °C — 5 мин; 35 циклов: 94 °C — 30 с, 55 °C — 30 с, 72 °C — 30 с; 1 цикл: 72 °C — 10 мин (Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Corbett Research, Австралия).

Все количественные данные имели непараметрическое распределение (проверка на нормальность проводилась с использованием критерия Колмогорова — Смирнова, показателя ассиметрии и эксцесса,  $W$ -критерия Шапиро — Уилка). Множественные межгрупповые сравнения независимых выборок проводили с помощью критерия Краскела — Уоллиса, парные сравнения независимых выборок по количественным характеристикам проводили с использованием  $U$ -критерия Манна — Уитни.

Для представления полученных данных использовали показатели медианы ( $Me$ ) и процентилей ( $Q_{25}/Q_{75}$ ). Различия считались статистически значимыми при уровне значимости ( $P$ ) менее 0,05.

**Результаты и их обсуждение.** *Цельная кровь.* При сравнительном анализе значений показателя



теля  $A_{260/280}$  с использованием критерия Краскела – Уоллиса выявлены статистически значимые отличия. При попарном сравнении достоверно более высокие значения показателя были

выявлены при использовании набора реагентов «ДНК-сорб-В» (1,67 (1,56 ± 1,67) по сравнению со значениями, полученными при использовании других наборов реагентов (таблица 1).

Таблица 1 — Значения показателей ДНК, выделенной из цельной крови с использованием трех наборов реагентов

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости (P)
	1 «АртДНК легкий» (n = 15)	2 «Экстракция-100» (n = 15)	3 «ДНК-сорб-В» (n = 15)	
$A_{260/280}$	1,47 (1,36 ± 1,49)	1,44 (1,40 ± 1,45)	1,67 (1,56 ± 1,67)	0,03* $P_{1-2} = 0,75$ $P_{1-3} = 0,01\#$ $P_{2-3} = 0,04\#$
ВКО (Ct)	21,41 (20,48 ± 27,09)	16,07 (15,87 ± 16,4)	17,58 (16,82 ± 18,73)	0,08
β-глобин (Ct)	0 (0 ± 28,33)	20,83 (20,46 ± 21,54)	27,13 (25,75 ± 27,78)	0,14

\* Сравнение с помощью критерия Краскела – Уоллиса, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

# Сравнение с помощью критерия Манна – Уитни, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

По показателю амплификации гена β-глобина и ВКО не выявлено статистически значимых различий между полученными значениями для трех наборов реагентов.

*Клеточная масса крови.* При изучении показателей ДНК, выделенной из клеточной массы крови, было установлено статистически значимое увеличение показателя  $A_{260/280}$  с ис-

пользованием набора реагентов «ДНК-сорб-В» (1,80 (1,75 ± 1,86)) в сравнении с аналогичным показателем при использовании набора реагентов «Экстракция-100» (0,76 (0,64 ± 0,97)). Отношение  $A_{260/280}$  при использовании набора «ДНК-сорб-В» близкое к 1,8 и указывает на то, что ДНК обладает высокой чистотой. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Значения показателей ДНК, выделенной из клеточной массы крови с использованием трех наборов реагентов

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости (P)
	1 «АртДНК легкий» (n = 15)	2 «Экстракция-100» (n = 15)	3 «ДНК-сорб-В» (n = 15)	
$A_{260/280}$	1,30 (1,30 ± 1,50)	0,76 (0,64 ± 0,97)	1,80 (1,75 ± 1,86)	0,03* $P_{1-2} = 0,25$ $P_{1-3} = 0,17$ $P_{2-3} = 0,01\#$
ВКО (Ct)	24,20 (20,27 ± 24,84)	0 (0 ± 17,25)	19,91 (19,37 ± 20,79)	0,03* $P_{1-2} = 0,05$ $P_{1-3} = 0,25$ $P_{2-3} = 0,02\#$
β-глобин (Ct)	29,32 (0 ± 30,48)	21,7 (0 ± 22,76)	26,9 (25,21 ± 27,08)	0,11

\* Сравнение с помощью критерия Краскела – Уоллиса, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

# Сравнение с помощью критерия Манна – Уитни, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

При сравнительном анализе значений показателя ВКО установлено достоверное увеличение значений при использовании набора для

выделения «ДНК-сорб-В» — 19,91 (19,37 ± 20,79) по сравнению с набором для выделения «Экстракция-100» (0 (0 ± 17,25),  $P = 0,02$ ).

В ходе проведенных исследований не выявлено достоверных различий между значениями  $St$  для гена  $\beta$ -глобина, полученными при амплификации ДНК, выделенной с использованием трех наборов реагентов.

*Лейкоцитарная фракция после центрифугирования цельной крови.* Значения показателя  $A_{260/280}$  не имели статистически значимых различий для ДНК, выделенной с использованием всех наборов реагентов (таблица 3).

Таблица 3 — Значения показателей ДНК, выделенной из лейкоцитарной фракции после центрифугирования цельной крови с использованием трех наборов реагентов

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости ( $P$ )
	1	2	3	
	«АртДНК легкий» ( $n = 15$ )	«Экстракция-100» ( $n = 15$ )	«ДНК-сорб-В» ( $n = 15$ )	
$A_{260/280}$	1,06 (1,04 $\pm$ 1,21)	1,34 (1,32 $\pm$ 1,34)	1,30 (1,20 $\pm$ 1,85)	0,29
ВКО ( $St$ )	21,97 (21,37 $\pm$ 23,34)	16,08 (15,61 $\pm$ 16,66)	18,06 (17,78 $\pm$ 19,82)	0,002* $P_{1-2} = 0,01\#$ $P_{1-3} = 0,01\#$ $P_{2-3} = 0,01\#$
$\beta$ -глобин ( $St$ )	0 (0 $\pm$ 0)	24,17 (23,27 $\pm$ 26,15)	25,33 (24,54 $\pm$ 27,37)	0,01* $P_{1-2} = 0,01\#$ $P_{1-3} = 0,01\#$ $P_{2-3} = 0,35$

\* Сравнение с помощью критерия Краскела – Уоллиса, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

# Сравнение с помощью критерия Манна – Уитни, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

С применением статистического анализа (критерием Краскела – Уоллиса) были установлены достоверные различия значений показателя ВКО. При попарном сравнении достоверно более низкие значения данного показателя были выявлены при использовании набора реагентов «Экстракция-100» (16,08 (15,61  $\pm$  16,66) по сравнению с остальными наборами.

Анализ результатов, полученных в ходе определения значений показателя гена  $\beta$ -глобина из ДНК, выделенной из лейкоцитарной фракции, позволил установить достоверные различия по критерию Краскела – Уоллиса. При попарном сравнении значений  $St$  гена  $\beta$ -глобина были выявлены достоверные различия между 1–2 и 1–3, тогда как между 2 и 3 группами различия отсутствовали.

*Лейкоцитарная фракция после добавления лизирующего буфера к цельной крови/клеточной массе крови.* Для ДНК, выделенной из лейкоцитарной фракции после добавления лизирующего буфера к цельной крови, по показателю  $A_{260/280}$  достоверных отличий с использованием методов статистического анализа выявлено не было (таблица 4). Образцы ДНК, полученные с использованием наборов реагентов «АртДНК легкий» (1,75 (1,74  $\pm$  1,75)) и «ДНК-сорб-В» (1,82 (1,81  $\pm$  1,82)), имели коэффициенты поглощения  $A_{260/280}$ , наиболее близкие к 1,8, что указывает на то, что они были наименее загрязнены белками и другими ингибиторами. По показателю амплификации гена  $\beta$ -глобина и ВКО также не выявлено статистически значимых различий между полученными значениями для трех наборов реагентов.

Таблица 4 — Значения показателей ДНК, выделенной из лейкоцитарной фракции после добавления лизирующего буфера к цельной крови с использованием трех наборов реагентов

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости ( $P$ )
	1	2	3	
	«АртДНК легкий» ( $n = 15$ )	«Экстракция-100» ( $n = 15$ )	«ДНК-сорб-В» ( $n = 15$ )	
$A_{260/280}$	1,75 (1,74 $\pm$ 1,75)	1,45 (1,44 $\pm$ 1,45)	1,82 (1,81 $\pm$ 1,82)	0,10
ВКО ( $St$ )	15,24 (14,63 $\pm$ 15,84)	15,9 (15,83 $\pm$ 15,98)	17,95 (17,69 $\pm$ 18,22)	0,18

Окончание табл. 4

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости ( <i>P</i> )
	1 «АртДНК легкий» ( <i>n</i> = 15)	2 «Экстракция-100» ( <i>n</i> = 15)	3 «ДНК-сорб-В» ( <i>n</i> = 15)	
β-глобин (Сг)	27,49 (27,35 ± 27,62)	26,72 (26,57 ± 26,87)	27,15 (27,14 ± 27,16)	0,10

Для ДНК, полученной из лейкоцитарной фракции после добавления лизирующего буфера к клеточной массе крови, при сравнении показателя  $A_{260/280}$  достоверных отличий в значениях выявлено не было. Полученные результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 — Значения показателей ДНК, выделенной из лейкоцитарной фракции после добавления лизирующего буфера к клеточной массе крови с использованием трех наборов реагентов

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости ( <i>P</i> )
	1 «АртДНК легкий» ( <i>n</i> = 15)	2 «Экстракция-100» ( <i>n</i> = 15)	3 «ДНК-сорб-В» ( <i>n</i> = 15)	
$A_{260/280}$	1,42 (1,28 ± 1,57)	1,33 (1,27 ± 1,34)	0,94 (0,81 ± 1,12)	0,07
ВКО (Сг)	18,98 (18,73 ± 19,17)	18,47 (18,18 ± 18,73)	20,72 (20,434 ± 20,81)	0,01* $P_{1-2} = 0,08$ $P_{1-3} = 0,02^{\#}$ $P_{2-3} = 0,02^{\#}$
β-глобин (Сг)	28,75 (28,21 ± 28,89)	27,99 (27,87 ± 28,12)	27,75 (26,61 ± 28,48)	0,61

\* Сравнение с помощью критерия Краскела – Уоллиса, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

# Сравнение с помощью критерия Манна – Уитни, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

В ходе анализа данных показателя ВКО установлены статистически значимые различия значений по критерию Краскела – Уоллиса. При попарном сравнении критерием Манна – Уитни установлено достоверное увеличение значений данного показателя для ДНК, выделенной с помощью набора реагентов «ДНК-сорб-В» (20,72 (20,434 ± 20,81)) в сравнении со значениями наборов реагентов «Экстракция-100» (18,47 (18,18 ± 18,73)) и «АртДНК легкий» (18,98 (18,73 ± 19,17)).

Амплификация последовательности гена β-глобина в образцах лейкоцитарной фракции после лизирующего буфера к клеточной массе крови была успешной во всех образцах, статистически значимых различий не выявлено.

Мононуклеарные клетки периферической крови. В отношении мононуклеарных клеток периферической крови не выявлено статистически значимых различий по показателю  $A_{260/280}$  (таблица 6).

Таблица 6 — Значения показателей ДНК, выделенной из мононуклеарных клеток периферической крови с использованием трех наборов реагентов

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости ( <i>P</i> )
	1 «АртДНК легкий» ( <i>n</i> = 15)	2 «Экстракция-100» ( <i>n</i> = 15)	3 «ДНК-сорб-В» ( <i>n</i> = 15)	
$A_{260/280}$	1,43 (1,39 ± 1,49)	0,95 (0,93 ± 2,01)	1,40 (1,37 ± 1,40)	0,68
ВКО (Сг)	18,77 (18,71 ± 19,21)	19,23 (19,19 ± 19,41)	19,93 (19,76 ± 19,99)	0,02* $P_{1-2} = 0,12$ $P_{1-3} = 0,01^{\#}$ $P_{2-3} = 0,12$

Окончание табл. 6

Показатель	Наборы реагентов			Уровень значимости ( <i>P</i> )
	1	2	3	
	«АртДНК легкий» ( <i>n</i> = 15)	«Экстракция-100» ( <i>n</i> = 15)	«ДНК-сорб-В» ( <i>n</i> = 15)	
β-глобин (St)	20,57 (20,45 ± 20,95)	18,27 (18,15 ± 18,32)	19,74 (19,67 ± 20,04)	0,14

\* Сравнение с помощью критерия Краскела – Уоллиса, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

# Сравнение с помощью критерия Манна – Уитни, различия статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

В ходе сравнительного анализа показателя ВКО выявлено достоверное увеличение значений для ДНК, выделенного набором «ДНК-сорб-В» (19,93 (19,76 ± 19,99)) в сравнении со значениями аналогичного показателя для ДНК, выделенного набором реагентов «АртДНК легкий» (18,77 (18,71 ± 19,21)), с уровнем значимости  $P = 0,01$ .

При сравнении показателя амплификации гена β-глобина достоверных отличий в значениях выявлено не было.

**Заключение.** На основании полученных данных для дальнейших экспериментов по выделению ДНК из крови и ее компонентов

в качестве биологического материала предпочтительно использовать лейкоцитарную фракцию после добавления лизирующего буфера к цельной крови с применением наборов реагентов «ДНК-сорб-В» и «АртДНК легкий». Как менее дорогостоящий метод с высоким выходом ДНК целесообразно использование клеточной массы крови с применением набора реагентов «ДНК-сорб-В». Следует отметить, что все исследованные наборы реагентов для выделения ДНК соответствуют своему целевому назначению и позволяют достаточно эффективно проводить экстракцию ДНК.

#### Список цитированных источников

1. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples / P. Redström [et al.] // *Mol. Biotechnol.* — 2004. — Vol. 26, № 2. — P. 133–146. DOI: 10.1385/MB:26:2:133.

2. Evaluating genomic DNA extraction methods from human whole blood using endpoint and real-time PCR assays / L. Koshy [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* — 2017. — Vol. 44, № 1. — P. 97–108. DOI: 10.1007/s11033-016-4085-9.

## Optimization of DNA and its components isolation from blood: quantitative and qualitative characteristics

*Lyamtseva A. K., Kostiuk S. A., Zhevneronok I. V., Poluyan O. S., Rudenkova T. V., Glinkina T. V.*

*State Educational Establishment “Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education”, Minsk, Republic of Belarus*

The quality of DNA depends both on the quality of the biological material from which it was isolated and on the method of isolation. To date, a large number of DNA extraction techniques have been developed, and the choice of a specific method is based on factors such as high nucleic acid yield, method speed, high purity, etc. Optimization of DNA extraction by real-time polymerase chain reaction (PCR) gives the opportunity to increase the representativeness and reliability of the results obtained.

**Keywords:** DNA extraction, polymerase chain reaction, whole blood, optimization.

*Поступила 10.06.2022*



УДК 616-073.96-092-08:681.3

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СОЧЕТАНИЙ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ CYP1A2 И CYP2D6 НА ФОРМИРОВАНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ТИПА ОПУХОЛИ И НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ЛЕГКОГО

Шепетько М. Н., Каранетян Г. М., Косик И. И., Ермаков В. В.,  
Шевчук Т. А., Захарова В. А.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** В статье на примере полиморфизмов генов *CYP1A2* и *CYP2D6* представлены результаты анализа связи генного фактора с различными клиническими (гистологический диагноз, стадия заболевания) и анамнестическими (курение) показателями. Также приводится способ оценки предполагаемой продолжительности жизни пациентов мужчин с раком легкого, основанный на методе интерполяции. Метод интерполяции предполагает нахождение неизвестных значений некоторой функции по имеющемуся дискретному набору ее известных значений. Иначе говоря, выживаемость рассматривается как функция сочетания полиморфизмов. Необходимость применения интерполяции была обусловлена тем, что в исследуемой выборке присутствовали пациенты с широко варьируемыми периодами послеоперационного наблюдения — от 2 до 19 лет.

**Ключевые слова:** рак легкого, выживаемость, клинические и анамнестические показатели, статистические критерии.

**Введение.** Одним из наиболее информативных параметров для прогнозирования вариантов развития различных патологий является генетический полиморфизм. На его основе формируются индивидуальные защитные реакции организма, а также предрасположенность организма к различным патологиям. Гены, полиморфные варианты которых при определенных условиях запускают цепную реакцию, способствующую развитию того или иного заболевания, получили название *генов предрасположенности* [1]. Притом что генетические исследования в области медицинской науки имеют выраженный восходящий тренд [2], знания о генетической предрасположенности к заболеваниям все еще отличаются определенной отрывочностью. Генеалогическая и молекулярно-генетическая природа рака хорошо изучена при злокачественных новообразованиях детского возраста (ретино- и нефробластомы); при недоброкачественных опухолях толстого кишечника; при онкологических поражениях органов женской репродуктивной системы, а также щитовидной железы. Проблема рака легкого (РЛ) с этих позиций до настоящего времени остается недостаточно разработанной. Данная работа является частью исследования, посвященного оценке степени влияния различных сочетаний полиморфизмов

генов, относящихся к определенным группам (васкуло и ангиогенеза, пролиферации, детоксикации, метаболизма и т. д.), на течение рака легкого, а также на вероятность того или иного исхода заболевания.

**Цель работы** — предложить метод прогнозирования вероятной продолжительности жизни пациентов с установленным диагнозом «рак легкого» и проанализировать зависимость гистологического диагноза и стадии заболевания, зафиксированной на момент поступления в клиническое учреждение, от обнаруженных у пациентов сочетаний генетических полиморфизмов.

**Материалы и методы.** В исследовании использовалась база данных, включающая клиническую, анамнестическую и молекулярно-генетическую информацию по 635 пациентам, проходившим лечение в городском клиническом онкологическом диспансере г. Минска. Генетический анализ проводился в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси. Из общей совокупности отобрано 180 пациентов мужчин, которые дополнительно были разделены на группы курящих и некурящих. По данной выборке пациентов с помощью специально написанной программы анализа и обработки молекулярно-генетических показателей были определены сочетания полиморфизмов

генов *CYP1A2* и *CYP2D6*, на которые приходилось максимальное количество неблагоприятных исходов, вне зависимости от периода наблюдения. Периоды наблюдения индивидуальны и составляли от 2 до 19 лет, в зависимости от даты поступления пациента в клиническое учреждение. Выживаемость оценивалась по двум временным интервалам. Первый ограничивался 3,5 годами наблюдения после операции, второй составлял 5 и более лет. Поскольку использованная в исследовании ретроспективная база данных состоит из пациентов, прооперированных в разное время, вводилось понятие прогнозируемой выживаемости. Так как в случаях, когда с момента операции прошло меньше 3,5 года или 5 лет, можно говорить лишь о возможной или ожидаемой продолжительности жизни пациента. Для оценки предполагаемой послеоперационной продолжительности жизни предложен метод интерполяции, основанный на нахождении неизвестных значений некоторой функции, по имеющемуся дискретному набору ее известных значений.

Анализ статистической достоверности различий выборок, составленных из частот встречаемости тех или иных признаков, проводился с помощью  $\chi^2$ -критерия Пирсона при уровне значимости 0,05. Для многопольной таблицы доля ячеек с ожидаемым числом наблюдений менее 5 не должна была превышать 20 %. При малом количестве данных отсутствие статистического различия с заданным уровнем значимости не обязательно означает отсутствие связи между признаками. Тем более между признаками в совокупностях с разным числом

наблюдений, поэтому дополнительно определялась сила связи между признаками. В четырехпольных таблицах такая проверка проводилась с помощью коэффициента сопряженности Чупрова (*C*). Сила связи в многопольных таблицах рассчитывалась с помощью критерия *V* Крамера.

**Результаты и их обсуждение.** В базе данных по генам *CYP1A2* и *CYP2D6* присутствовали следующие варианты генотипов:

для гена *CYP1A2* — C/C; A/A; C/A;  
для гена *CYP2D6* — G/A; G/G; A/A.

При анализе полной выборки выяснилось, что максимальная доля неблагоприятных исходов приходилась на пациентов мужчин, у которых в сочетаниях *CYP1A2* с *CYP2D6* обязательно присутствовал полиморфный вариант *CYP2D6* G/G. Она оказалась равной 70,2 % (таблица 1). Данное сочетание по тексту ниже будем для краткости называть «рисковыми» или «неблагоприятными». В любой другой комбинации генотипов, но без полиморфного варианта G/G гена *CYP2D6*, доля умерших пациентов снижается до 61,8 %. По данным результатам и с учетом фактора курения 180 пациентов были разделены на две группы:

группа 1 (или первая группа) — пациенты с «рисковым» сочетанием — 104 (85 курящих + 19 некурящих);

группа 2 (или вторая группа) — пациенты с прочими сочетаниями генотипов — 76 (58 курящих + 18 некурящих).

Далее были составлены аналогичные таблицы 2 и 3, но с учетом реального времени послеоперационного наблюдения.

Таблица 1 — Данные по всем пациентам независимо от периода наблюдения за ними

Пациенты	Умерли, к + нк = $\Sigma$ (%)	Выжили, к + нк = $\Sigma$ (%)
С рисковым сочетанием	61 + 12 = 73 (70,2)	24 + 7 = 31 (29,8)
С прочими сочетаниями	38 + 9 = 47 (61,8)	20 + 9 = 29 (38,2)

Примечание — к — курящие; нк — некурящие.

Таблица 2 — Данные по пациентам, наблюдавшимся от 2 до 5 лет

Пациенты	Умерли, к + нк = $\Sigma$ (%)	Выжили, к + нк = $\Sigma$ (%)
С рисковым сочетанием	48 + 9 = 57 (54,8)	37 + 10 = 47 (45,2)
С прочими сочетаниями	30 + 7 = 37 (48,7)	28 + 11 = 39 (51,3)

Таблица 3 — Данные по пациентам, прожившим более 5 лет после операции

Пациенты	Умерли, к + нк = $\Sigma$ (%)	Выжили, к + нк = $\Sigma$ (%)
С рисковым сочетанием	13 + 3 = 16 (50,0)	13 + 3 = 16 (50,0)
С прочими сочетаниями	8 + 2 = 10 (50,0)	6 + 4 = 10 (50,0)

Данные таблицы 2 указывают на то, что в течение первых 2–5 лет наблюдения в группе с рискованым сочетанием доли умерших пациентов почти на 10 % превышает долю выживших. В группе пациентов с иными сочетаниями полиморфных вариантов гена *CYP* наблюдается обратная картина — выживших больше, чем умерших. Однако проверка с помощью  $\chi^2$ -критерия показывает, что различие носит случайный характер. Вероятность ошибки принятия альтернативной гипотезы (о неслучайности выявленного различия)  $p > 0,05$ . Значение коэффициента сопряженности Чупрова ( $C = 0,06$ ) также говорит об отсутствии существенной связи между вариантом сочетания генотипов и исходом заболевания. При очевидной разнице такое заключение выглядит странным, поэтому сделаем предположение о существовании какого-то еще фактора, определяющего различие в распределении исходов рака легкого среди пациентов с разными сочетаниями генотипов генов *CYP1A2* и *CYP2D6*. Возможно, на показатель неблагоприятных исходов влияет фактор курения. А может быть, наличие рискованного сочетания оказывает влияние на развитие более тяжело-

го гистотипа рака легкого, вследствие чего возрастает процент летальности. Это необходимо проверить. Также решено было проанализировать зависимость убыли пациентов от распределения стадий заболевания в исследуемых группах.

Следует отметить, что в более долгосрочной перспективе (более 5 лет после операции) проценты летальных исходов в обеих группах выравниваются (см. таблицу 3). Что вполне объяснимо, поскольку в этот период повышается негативное влияние прочих факторов (возраст, сопутствующие заболевания, вредные привычки и т. д.). Таким образом, именно более высокие показатели смертности в первые годы определяют сохраняющуюся разницу по всему периоду наблюдения (см. таблицу 2).

#### 1. Гистологический диагноз

В таблице 4, приведены данные по частоте встречаемости гистологических диагнозов среди пациентов, распределенных по двум группам в зависимости от сочетания генотипов. Дополнительно в скобках заключены данные о количестве некурящих (н/к) и курящих (к) пациентов.

Таблица 4 — Распределение пациентов в двух группах по гистологическим диагнозам

Гистологический диагноз (ГД)	Пациенты с проблемным сочетанием полиморфизмов (нк — к) / % распределение пациентов по ГД	Пациенты с прочими сочетаниями полиморфизмов (нк — к) / % распределение пациентов по ГД	Всего / % от общего по всем пациентам
1. Плоскоклеточный	53 (6–47) / 52,5	50 (8–42) / 70,4	103 / 59,9
2. Аденокарцинома	39 (12–27) / 38,6	19 (8–11) / 26,8	58 / 33,7
3. Мелкоклеточный	7 (1–6) / 6,9	1 (0–1) / 1,4	8 / 4,7
4. Недифференцированный	2 (0–2) / 2,0	1 (0–1) / 1,4	3 / 1,7
Итого пациентов в группе	101	71	172

Проверка на наличие связи между гистологическим диагнозом и сочетанием генотипов генов *CYP1A2* и *CYP2D6* проводилась с применением критерия *V* Крамера. Рассчитанное значение критерия оказалась равным 0,2, что свидетельствует о средней силе связи между гистологическим диагнозом и наличием неблагоприятной комбинации генотипов.

Сопоставим полученный результат с данными таблицы 4. В обеих группах преобладают пациенты с плоскоклеточным раком, ассоциирующимся с курением крепких сигарет [3, 4]. На втором месте пациенты с аденокарциномой, характерной для некурящих либо курящих низкосмолистые сигареты. Учитывая приведенные в таблице 4 соотношения частот

встречаемости двух подвидов немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ): плоскоклеточного рака и аденокарциномы в каждой группе, можно предположить, что во второй группе преобладает численность пациентов, курящих крепкие сигареты. Отсюда значительный показатель плоскоклеточного рака — наиболее опасного [5] гистотипа НМРЛ. И наоборот, в первой группе выше доля некурящих либо курящих сигареты низкосмолистые, с низким содержанием никотина. Вследствие чего чаще встречается менее опасная по показателю летальности аденокарцинома. Но при этом, несмотря на преобладание менее опасного гистотипа рака, частота неблагоприятных исходов среди пациентов с неблагоприятным сочетанием геноти-

пов в первые пять лет наблюдения выше (согласно таблице 2 — 54,8 % против 48,7 %). Таким образом, при прочих равных условиях вероятность неблагоприятного исхода РЛ выше у пациентов носителей неблагоприятных комбинаций генотипов генов *CYP1A2* и *CYP2D6*. Однако курение крепких сигарет повышает у пациентов второй группы риск развития более тяжелых гистотипов немелкоклеточного рака, за счет чего, возможно, нивелируется ожидаемая разница в показателях смертности пациентов обеих групп при более длительном наблюдении (см. таблицу 3).

Из таблицы 4 также следует, что наиболее неблагоприятная с точки зрения выживаемости форма рака легкого — мелкоклеточный рак в первой группе почти в пять раз выше, чем у пациентов второй группы (6,9 % против 1,4 %). Этот вид рака наблюдается преимущественно у курящих и практически никогда не встречается у некурящих. Следовательно высказанное выше предположение об ограниченности влияния курения низкосмолистых сигарет для пациентов из первой группы скорректируем, причем в жесткой форме: людям, имеющим генотип G/G *CYP2D6*, курение категорически противопоказано, вне зависимости от вида сигарет.

Нетрудно заметить, что в обеих группах доля подвидов рака с большим процентом летальности неизменно приходится на курящих пациентов. Для оценки силы связи между данными признаками (курением и утяжелением гистологического диагноза) в первой группе применялся критерий  $V$  Крамера, который оказался равным 0,25, что говорит о средней силе связи. Еще более заметна эта тенденция в группе 2, пациенты из которой более привержены курению крепких сигарет. Критерий  $V = 0,3$ . При этом количество пациентов с наиболее агрессивными типами рака легкого — недифференцированным и мелкоклеточным — в наблюдаемой выборке в целом невелико, но практически все они из группы с проблемным сочетанием полиморфизмов.

## 2. Стадия заболевания

В таблице 5 представлены пациенты с различными сочетаниями генотипов изучаемых генов, распределенные по стадиям рака легкого, которые были диагностированы у них на момент поступления в клиническое учреждение. Дополнительно в скобках приведены данные о количестве некурящих (нк) и курящих (к) пациентов.

Таблица 5 — Распределение пациентов в двух группах по стадиям заболевания

Стадия	Пациенты с проблемным сочетанием полиморфизмов (нк — к) / % распределение пациентов по стадиям	Пациенты с прочими сочетаниями полиморфизмов (нк — к) / % распределение пациентов по стадиям	Всего / % от общего по всем пациентам
1-я	39 (7–32) / 38,6	25 (10–15) / 35,8	64 / 37,4
2-я	16 (3–13) / 15,8	12 (2–10) / 17,1	28 / 16,4
3-я	36 (7–29) / 35,7	29 (5–24) / 41,4	65 / 38,0
4-я	10 (1–9) / 9,9	4 (1–3) / 5,7	14 / 8,2
Итого	101	70	171

Проведенный с применением  $\chi^2$ -критерия анализ данных таблицы 5 показал, что стадии рака легкого по частоте встречаемости распределены среди пациентов обеих групп примерно одинаково, а выявленные небольшие различия имеют случайный характер. Вероятность ошибки данного заключения  $p = 0,71$ . Применение  $V$ -критерия Крамера также указывает на отсутствие влияния изучаемых генов на вероятность развития той или иной стадии заболевания  $V = 0,09$ .

Посмотрим, как отражается наличие рисковой комбинации на показателях летальности. В ходе проверки составлена таблица 6, в

которой приведены данные о количествах умерших и выживших пациентов, имевших ту или иную стадию на момент начала терапии.

Следует особо подчеркнуть, что приведенные в таблице данные не свидетельствуют о прямой зависимости смертности от стадии заболевания, т. е. полученная доля неблагоприятных исходов (65,8 %) среди пациентов с первой стадией не означает такой процент летальности именно для первой стадии. С данной стадией пациент поступил в клиническое учреждение, с высокой степенью вероятности летальный исход наступил на более высокой стадии.



Таблица 6 — Распределение выживших и умерших пациентов по стадиям заболевания

Стадия	Пациенты с рисковым сочетанием полиморфизмов (умерли — живы) / % умерших по стадиям	Пациенты с прочими сочетаниями полиморфизмов (умерли — живы) / % умерших по стадиям
1-я	38 (25–13) / 65,8	25 (16–9) / 64,0
2-я	16 (11–5) / 68,8	12 (9–3) / 75,0
3-я	36 (27–9) / 75,0	28 (20–8) / 71,4
4-я	10 (10–0) / 100,0	3 (2–1) / 66,7
Итого	100	68

На основе данных таблицы 6 построен график, представленный на рисунке. Особенность графиков в том, что на них стадии умышленно выставлены в обратном порядке, поскольку такой порядок больше соответствует реальной динамике убыли пациентов — чем тяжелее стадия, тем больше вероятность неблагоприятного исхода.

Как видно из рисунка, процент смертности в группе с неблагоприятным сочетанием генотипов имеет четкую корреляцию со стадией заболевания пациента на момент его поступления в клиническое учреждение — чем выше стадия пациента на момент старта терапии, тем больше процент смертности. В группе остальных пациентов (у которых не обнаружен генотип G/G CYP2D6) максимальный процент смертности приходится на вторую стадию. График подтверждает полученные выше данные о динамике смертности в обеих группах. Согласно таблице 2 в первые 2–5 лет в первой группе умерло 54,8 % пациентов, во второй — 48,7 %. Процент смертности в группе 1 выше за счет большей доли пациентов с наиболее тяжелой стадией. Преобладание тяжелых стадий может быть связано не только с зафиксированным ранее (см. таблицу 5) в этой группе большим процентом максимального агрессивных гистотипов рака — мелкоклеточного и низкодифференцированного. После пяти лет процентные показатели неблагоприятных исходов в обеих группах выравниваются (см. таблицу 3). Летальность среди пациентов второй группы возрастает, летальность в первой группе, наоборот, падает. Как уже было отмечено при исследовании гистологических диагнозов, вероятнее всего, рост неблагоприятных исходов во второй группе связан с большим количеством пациентов с плоскоклеточным раком, а уменьшение смертности в первой — со значительным числом пациентов с менее агрессивной аденокарциномой.

Естественно, полученная на графике рисунка динамика летальности весьма условна, поскольку в реальности одновременно с пациентами, у которых обнаружены поздние стадии

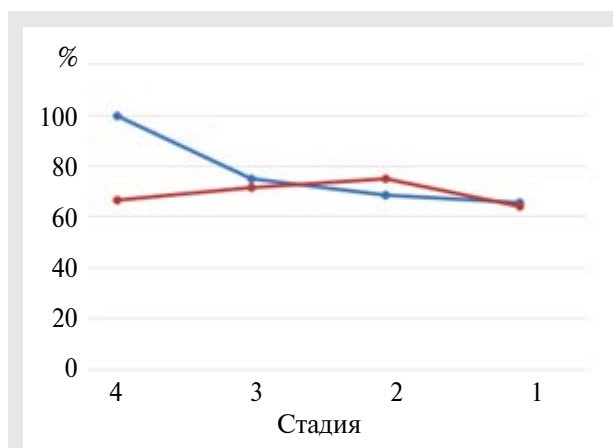


Рисунок — Процентная динамика убыли пациентов по каждой стадии (Синим цветом обозначена динамика в первой («проблемной») группе, красным — во второй.)

заболевания, умирает и часть пациентов с ранними стадиями. Попытаемся, объединив данные таблиц 2, 3, 6, спрогнозировать показатели выживаемости для пациентов, представленных в обеих группах.

Для первой группы зафиксированная доля умерших пациентов в первые 2–5 лет составила 54,8 % (см. таблицу 2). Из-за того, что часть пациентов наблюдается лишь два года, логично усреднить период наблюдения, т. е. вместо 2–5 лет ввести 3,5 года. Таким образом, в этих 54,8 % вместо доли пациентов, умерших за полтора последующих года, будут учтены предполагаемые потери за полтора года среди пациентов, наблюдаемых не более 2 лет. При общей численности в 100 пациентов первой группы (таблица 6) 54,8 % — это 55 человек. Что означает, что к смертям пациентов с 4–2-й стадиями (10 + 27 + 11) добавилось 7 смертей пациентов, поступивших с 1-й стадией. Среди пациентов, наблюдаемых более 5 лет (в нашем случае это 100 — 55 = 45 человек), смертность оказалась равной 50,0 % (см. таблицу 3), т. е. из оставшихся 45 человек предположительно умрет — 23. Очевидно, что это паци-

енты из числа поступивших с 1-й стадией. Полученный результат несколько противоречит данным таблицы 6, в которой среди пациентов с первой стадией зафиксировано всего 25 смертей. По нашей логике, если из 25 вычесть 7 пациентов, умерших в первые 3,5 года, то на период после 5 лет должно остаться 18, а не 23. Разбежка возникает, потому что в общей группе пациентов есть те, кто наблюдается не более 2 лет, т. е. именно они добавляют еще 5 смертей. Итак, предположительно в долговременной перспективе выживут из 100 пациентов «проблемной» группы 22 человека ( $100 - 10 - 27 - 11 - 7 - 23 = 22$ ). Таким образом, прогнозируемый процент долговременной выживаемости (период от 5 до 19 лет) в группе из 100 пациентов с сочетанием CYP1A2 — CYP2D6 G/G составит 22 %. Выживаемость в первые 3,5 года после операции составит 45 %

Применим эту же логику для группы без проблемного сочетания полиморфизмов. За период первых 3,5 лет наблюдения 48,7 % умерших — это 33 % из 68, т. е. все пациенты 4–2-й стадий (2 + 20 + 9) и дополнительно 1 пациент из числа поступивших с 1-й стадией. В более длительной перспективе наблюдаемая смертность составила 50 %, т. е. из оставшихся  $68 - 33 = 35$  человек предположительно умрет 17 человек. Следовательно, из 68 пациентов группы в долговременной перспективе предположительно выживет:  $68 - 33 - 17 = 18$  человека. Таким образом, предположительно умрет сверх данных, указанных в таблице 3, еще 3 пациента, поступивших с разными стадиями. В таком случае, прогнозируемый процент долговременной выживаемости (период от пяти до 19 лет) в группе из 68 пациентов, у которых не обнаружено сочетание CYP1A2 — CYP2D6 G/G, составит 27 %. Выживаемость в первые 3,5 года после операции равна 51 %.

Полученные данные о выживаемости пациентов вполне согласуются с другими опубликованными ранее в научной литературе [6, 7] результатами исследований показателя выживаемости среди прооперированных пациентов с раком легкого.

**Заключение.** Описанное исследование базируется на ранее проведенном анализе генетических факторов, который показал, что при

одинаковых наборах полиморфизмов мужчины от рака легкого умирали значительно чаще женщин. В среднем процент летальных исходов у мужчин наблюдался в 55,5 % случаев, у женщин 35,5 %. При этом выявлены сочетания полиморфизмов, при которых риск неблагоприятных исходов существенно возрастал. Так, среди пациентов мужчин, у которых в сочетаниях CYP1A2 с CYP2D6 обязательно присутствовал вариант CYP2D6 G/G, доля неблагоприятных исходов возросла до 70,2 %. На примере гена CYP по выборке из 180 пациентов исследовалась возможная связь генного фактора с различными клиническими (гистологический диагноз, стадия заболевания) и анамнестическими (курение). В результате обнаружена средней силы связь между наличием сочетания CYP1A2 — CYP2D6 G/G и гистологическим диагнозом. У пациентов с данным сочетанием чаще, чем у пациентов из альтернативной группы обнаруживались наиболее агрессивные формы рака (мелкоклеточный и недифференцированный). Особенно это характерно для курящих пациентов, вне зависимости от крепости потребляемых ими сигарет. Что говорит в пользу необходимости для них полного запрета курения. В группе пациентов без неблагоприятного сочетания генотипов риск неблагоприятного исхода, как и вероятность заболеть раком легкого, увеличивался среди курящих крепкие сигареты с высоким содержанием никотина и смолы.

Поскольку анализируемая совокупность состояла из пациентов с широко варьируемы́ми периодами наблюдения, в проведенном исследовании для оценки предполагаемой продолжительности их жизни использовался метод интерполяции. Метод основан на нахождении неизвестных значений некоторой функции по имеющемуся дискретному набору ее известных значений. В итоге были получены следующие результаты: прогнозируемый процент долговременной выживаемости в группе пациентов с сочетанием CYP1A2 — CYP2D6 G/G составит 22 %. Выживаемость в первые 3,5 года после операции составит 45 %. Те же показатели во второй группе пациентов составили, соответственно, 27 и 51 %.

### Список цитированных источников

1. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины / под ред. В. С. Баранова. — Спб. : Издательство Н-Л., 2009 — 528 с.
2. Collins, F. S. Implications of the Human Genome Project for medical science / F. S. Collins, V. A. McKusick // JAMA. — 2001. — Vol. 285, № 5. — P. 540–544.
3. Статистические закономерности заболеваемости раком легкого в Омской области / В. К. Косенок [и др.] // Сибирский онкологический журнал. — 2016. — Т. 15, № 4. — С. 21–25.

4. Имянитов, Е. Н. Молекулярная онкология: клинические аспекты / Е. Н. Имянитов, К. П. Хансон. — СПб. : Издательский дом СПбМАПО, 2007. — 213 с.
5. Wynder, E. L. Smoking and Lung Cancer: Scientific Challenges and Opportunities / E. L. Wynder, D. Hoffmann // *Cancer Research*. — 1994. — Vol. 54, № 20. — P. 5284–5295.
6. Прогностические и предсказывающие факторы у больных немелкоклеточным раком легкого / К. К. Лактионов [и др.] // *Практическая онкология*. — 2006. — Т. 7, № 3. — С. 145–153.
7. Отдаленные результаты лечения гастроэзофагеального рака / А. В. Прохоров [и др.] // *Новости хирургии*. — 2016. — Т. 24, № 3. — С. 269–274.

## **Evaluation of the influence of combinations of CYP1A2 and CYP2D6 gene polymorphisms on the formation of the histological type of the tumors and on the life expectancy of patients with lung cancer**

*Shapetska M., Karapetsian R., Kosik I., Ermakov V., Shevchuk T., Zaharova V.*

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

Using the example of the CYP gene, the article presents the results of an analysis of the relationship between the gene factor and various clinical (histological diagnosis, stage of the disease) and anamnestic (smoking) indicators. The article also presents an algorithm for estimating the life expectancy of patients with lung cancer. Algorithm based on the interpolation method. The interpolation method involves finding unknown values of a certain function from the available discrete set of its known values. That is, survival is considered as a function of the combination of polymorphisms. Interpolation was used because the studied sample consisted of patients with unequal postoperative periods — from 2 to 19 years.

**Keywords:** lung cancer, survival, clinical and anamnestic indicators, statistical criteria.

*Поступила 17.05.2022*

УДК 616.155:579.842.11

## **ОЦЕНКА РЕЦЕПТОРНОГО АППАРАТА ЛИМФОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ ПРИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ С МИКРООРГАНИЗМАМИ**

*Тонко О. В., Нижегородова Д. Б., Коломиец Н. Д., Ханенко О. Н.*

*Государственное учреждение образования*

*«Белорусская медицинская академия последипломного образования»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** В эксперименте *in vitro* изучено влияние микроорганизмов (*E. coli*) на уровни экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов и моноцитов. Установлено, что наибольшее снижение экспрессии на мембране моноцитов отмечено для TLR2 при сокультивировании в равных концентрациях с *E. coli* в течение 96 ч (на 20 %). Количество экспрессирующих лимфоцитов было наибольшим при соотношении РВМС и *E. coli* 1:10. Культивирование в течение 96 ч продемонстрировало тенденцию к увеличению экспрессии рецепторов на мембране лимфоцитов независимо от концентрации микроорганизмов в культуре.

Сокультивирование РВМС и *E. coli* в равной концентрации приводило к увеличению экспрессии CD-314 на лимфоцитах через 24 и 48 ч и незначительно менялось со снижением концентрации микроорганизмов.

**Ключевые слова:** лимфоциты, моноциты, РВМС, оппортунистические микроорганизмы, точная цитофлуориметрия, TLR2 (CD282), TLR4 (CD284), CD314 (NKG2D).

**Введение.** Выделение штаммов оппортунистических микроорганизмов из пищевых продуктов, объектов внешней среды и биологических материалов пациента не всегда может являться безусловным доказательством их этиологической роли. При возникновении инфекций, обусловленных такими микроорганизмами, верификация этиологии заболеваний также должна базироваться на комплексе достоверных критериев. Феномен оппортунистических и эмерджентных инфекций, который сформировался в самостоятельную медико-биологическую проблему, может быть объяснен модификацией фенотипических и генотипических признаков, в том числе этиологических и патогенетических свойств условно-патогенных микроорганизмов под воздействием качественно и количественно изменяющихся антропогенных факторов [1, 2, 3].

Факт выделения бактерий, например, при острых кишечных инфекциях, не является достаточным основанием для лабораторного подтверждения клинического диагноза или установления роли источника и фактора передачи, поскольку важной составляющей является оценка эпидемиологической значимости выделенных микроорганизмов, основанная, в частности, на характеристике их патогенного потенциала.

Фенотипические признаки бактерий подвержены изменчивости. Необходима разработка новых методов для оценки патогенного потенциала оппортунистических микроорганизмов *in vitro*. Перспективными направлениями изучения патогенетических характеристик как условно-патогенных, так и патогенных микроорганизмов являются иммунологические методы исследования [4].

К таким методам изучения относится метод проточной цитофлуориметрии, основанный на анализе параметров светорассеяния и интенсивности флуоресценции каждой индивидуальной клетки в суспензии. Метод может стать важным инструментом в микробиологии для изучения характеристик таких бактерий, как медленно растущие, труднокультивируемые, находящиеся в ассоциации в больших гетерогенных клеточных популяциях, непатогенные и условно-патогенные и др.

После инфицирования защита на локальном уровне осуществляется в первую очередь воспалительной реакцией, которая направлена на распознавание и уничтожение патогена и его компонентов. В- и Т-лимфоциты, осуществляющие адаптивный иммунный ответ, распознают патогены, используя высокоаффин-

ные рецепторы. Однако развитие адаптивного иммунитета обычно происходит достаточно медленно, так как предполагает активацию, пролиферацию лимфоцитов и синтез ими белков: цитокинов и иммуноглобулинов. Более быстрое развитие иммунных реакций обеспечивается врожденным иммунным ответом, который распознает патогены при помощи специальных рецепторов более широкой специфичности. Эти рецепторы распознают молекулярные структуры, общие для целых групп инфекционных возбудителей, в первую очередь к ним относятся Toll-подобные рецепторы (TLR). TLR взаимодействуют с молекулярными структурами, которые присутствуют на патогенах и активируют клеточный иммунный ответ. Toll-подобные рецепторы играют решающую роль в инициации иммунного ответа на вторжение микроорганизмов. Они экспрессируются многочисленными типами клеток, включая макрофаги и эпителиальные клетки, и активация TLR приводит к иммунной активации, которая включает в себя выработку цитокинов и хемокинов. Хемокины способствуют рекрутированию дополнительных иммунных клеток, включая нейтрофилы, которые впоследствии активируются воспалительной средой в месте локализации инфекции и еще больше усиливают воспалительный ответ. Распознавание патогена считается наиболее важным шагом для индукции адекватного иммунного ответа во время инфекции. К настоящему времени установлена важная роль TLR, особенно поверхностных, из-за их исключительной способности идентифицировать различные молекулярные паттерны вторжения патогенов. Эти рецепторы распознавания образов (PRR) не только действуют как врожденные сенсоры, но также формируют и связывают врожденные и адаптивные иммунные ответы. Кроме того, они также играют ключевую роль в регулировании баланса между Th1 и Th2 типами ответа.

Синтез цитокинов начинается в ответ на повреждение тканей или проникновение инфекции. Продукция цитокинов является частью клеточного ответа, который связан с распознаванием структурных компонентов патогенов, так называемых патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP). К ним относятся структурные компоненты внешней мембраны грамотрицательных бактерий — липополисахариды (LPS), мембранные компоненты грамположительных бактерий, пептидогликаны, вирусные РНК, бактериальные ДНК [5].



Трансмембранные белки экспрессируются на поверхности клетки и в субклеточных компартментах, таких как эндосомы. Локализация TLR связана с типом распознаваемого им лиганда. Так, TLR 1, 2, 4, 5, 6, связывающие структурные бактериальные компоненты, локализируются на поверхности клеток, тогда как TLR 3, 7, 8, 9, распознающие преимущественно вирус-ассоциированные структуры — нуклеиновые кислоты (дцРНК, оцРНК, ДНК), находятся в эндосомах, где взаимодействуют с лигандами после депротенинизации вирионов [6].

Универсальность механизмов, обусловленная как широким представительством данных маркеров на разнообразных клетках организма, так и широким спектром лигандов для них, определяет включение TLR в патогенетические звенья развития многих заболеваний. Экспрессию TLR исследуют с помощью специфических антител. Степень экспрессии TLR зависит от типа клетки и внешних стимулов.

Особой группой лимфоцитов врожденного иммунитета являются NK-клетки (*Natural killer*), или естественные киллеры. Одним из поверхностных маркеров активированных NK-клеток является трансмембранный гликопротеин или естественный рецептор цитотоксичности CD314 (NKG2D), который принадлежит к лектиновым рецепторам С-типа и необходим для проведения сигнала внутрь клетки и повышения функциональной активности киллеров. Помимо NK-клеток, рецептор CD314 определяется на некоторых  $\gamma\delta$ -лимфоцитах и является костимулирующей молекулой для CD8-позитивных Т-лимфоцитов. Связывание CD314 со своими лигандами усиливает распознавание трансформированных или инфицированных клеток [7].

В связи с этим необходимы адекватные и надежные методы оценки влияния микроорганизмов на уровни экспрессии рецепторного аппарата лимфоцитов и моноцитов, которые могут быть воспроизведены в условиях стандартной клинической лаборатории.

**Цель работы** — моделирование *in vitro* влияния патогенного потенциала микроорганизмов на уровни экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов и моноцитов.

**Материалы и методы.** Исследование оценки уровня экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов и моноцитов в ответ на взаимодействие с микроорганизмами проводили на основании изучения функционального состояния мононуклеарных клеток крови (РВМС) при их сокультивировании с суспензиями бактерий.

Модельным микроорганизмом выбрана *E. coli*. Являясь условно-патогенным микроорганизмом, *E. coli*, может вызывать различные заболевания: кишечные инфекции (диареи), поражения мочевыводящих путей, бактериемии, менингиты, гнойные воспаления и др. Более 95 % клеточного материала *E. coli* состоит из макромолекул или полимеров: белков, полисахаридов, липидов, РНК, ДНК. На долю белков приходится 52 %, а на долю нуклеиновых кислот — 19 % массы сухого вещества. Около 3 % сухого вещества клеток составляют низкомолекулярные органические соединения и соли.

В качестве поверхностных маркеров лимфоцитов и моноцитов для исследования были выбраны:

TLR2 (CD282) — рецептор для микробных патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, таких как липопротеины. TLR2 распознает микробные PAMPs и активирует различные внутриклеточные сигнальные молекулы и факторы транскрипции. PAMPs может связываться с рецептором TLR2, что приводит к клеточной активации сигнальных путей;

TLR4 (CD284) — рецептор для распознавания липополисахарида (LPS) и LPS-опосредованных воспалительных реакций. TLR4 вовлечен в события передачи сигнала, вызванные липополисахаридом, обнаруженным у большинства грамотрицательных бактерий;

CD314 (NKG2D) — трансмембранный белок, который распознает белки, появляющиеся на поверхности NK-клеток и субпопуляций Т-клеток. CD314 является основным рецептором распознавания для обнаружения и удаления трансформированных и инфицированных клеток.

Комплекс используемых антител подбирался на основании выбранных поверхностных маркеров: антитела моноклональные мышинные FITC antihuman TLR2 (CD282) Antibody, антитела моноклональные мышинные PE antihuman TLR4 (CD284) Antibody, антитела моноклональные мышинные Anti-APC antihuman CD314 (NKG2D) Antibody.

Выделение РВМС проводилось из цельной венозной крови, полученной от здоровых доноров. Выделенную фракцию крови (25 мл) помещали в одноразовую стерильную вакуумную пробирку и добавляли антикоагулянт — гепарин для сохранения клеточных и внутриклеточных компонентов. Метод выделения РВМС основан на разной плавучести различных форменных элементов крови. Применение градиента определенной плотности позволяет

отделить лимфоциты и моноциты от эритроцитов и гранулоцитов.

При проведении исследований использовались: среда питательная RPMI-1640 с L-глутамином, эмбриональная телячья сыворотка (FBS), добавка антимикробная к культуральной среде — антибиотик-антимикотик (Penicillin-Streptomycin-Neomycin (PSN)).

При моделировании эксперимента осуществлялся подбор концентраций микроорганизма и РВМС для совместного культивирования, а также отрабатывались требования к температурному режиму, оптимальной культуральной среде, уровню pH, осмотическому давлению и др.

Итоговая концентрация выделенных РВМС рассчитывалась опытным путем и составила  $2 \cdot 10^6$  клеток в 1 мл, либо  $2 \cdot 10^5$  в 100 мкл в каждой лунке планшета. Для проведения эксперимента отбирали по 100 мкл исследуемого комплекса клеток, которые в последующем инкубировали с предварительно титрованными количествами меченных антител (на 100 мкл взвеси клеток по 100 мкл коктейля антител), конъюгированными FITC и PE флуорохромами с соответствующими изотипическими контролями в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте.

Подготовка культуры бактерий проводилась в несколько этапов. Колонии бактерий высевались на мясо-пептонный агар и инкубировались в термостате при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 18–24 ч. Затем клетки выросшей культуры *E. coli* переносились в физиологический раствор для приготовления суспензии и

получения необходимых для опыта концентраций.

Комплекс мононуклеаров сокультивировали с различными концентрациями бактериальных суспензий *E. coli* или липополисахаридом в качестве положительного контроля в течение 24, 48 и 96 ч при  $37^\circ\text{C}$  в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе.

Методом проточной цитофлуориметрии (FCM) определяли уровни экспрессии TLR2 и TLR4 на моноцитах и лимфоцитах, CD-314 на лимфоцитах на аппарате CytoFlex (Beckman Coulter, США), оборудованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. В качестве негативного контроля использовали неокрашенные клетки. Разделение фракций клеток осуществляли на основе регистрируемых параметров прямого (FSC) и бокового светорассеяния (SSC) в режиме dot-plot. Анализ интенсивности флуоресценции и процента флуоресцирующих клеток проводили в зеленой области (FITS) FL1 (495 нм) и оранжевой области (PE) FL2 (585 нм).

**Результаты и их обсуждение.** Изучены уровни экспрессии Toll-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 на нестимулированных и стимулированных в ответ на сокультивирование с бактериальным агентом моноцитах.

Границы позитивного сигнала флуоресценции определялись в соответствии с негативным контролем флуоресценции неокрашенных клеток. Показатели отрицательного контроля (моноциты в питательной среде) использовались для сравнения результатов проб с и без суспензий бактерии (рисунок 1).

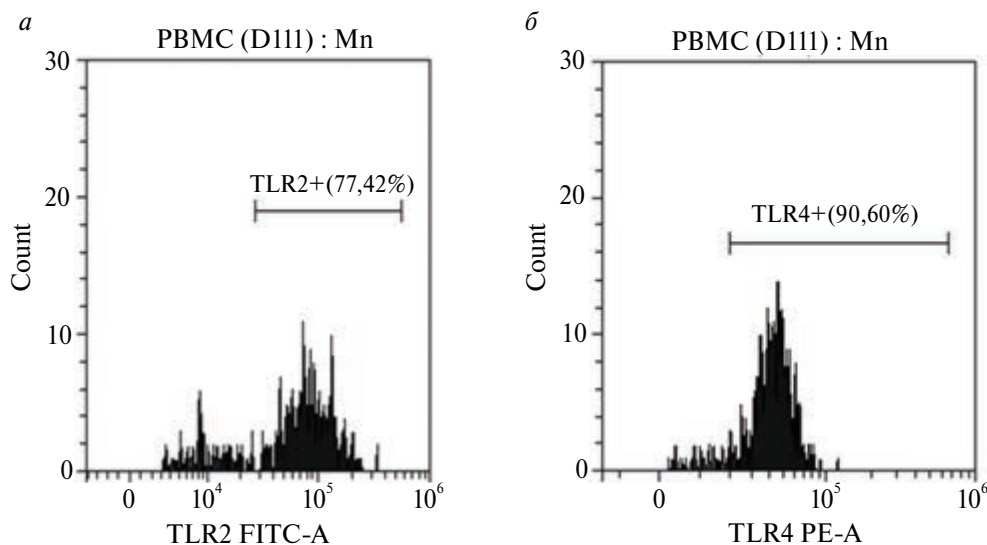


Рисунок 1 — Экспрессия TLR2 (а) и TLR4 (б) на мембране моноцитов (отрицательный контроль)

На гистограмме выделены два пика: негативный и позитивный среди фракции моноцитов. Позитивный пик показывает активность экспрессии TLR2 и TLR4 в процентном соотношении на мембране моноцитов в виде степени флуоресценции. Негативный пик — неокрашенные клетки (аутофлуоресценция).

Экспрессия рецепторов на мембране моноцитарных клеток периферической крови без

стимулирования сокультивированием с бактериальным агентом составила для TLR2 — 77,4 % и для TLR4 — 90,6 % от всей популяции клеток.

Уровни экспрессии TLR2 и TLR4 на мембране моноцитов, полученные при совместном культивировании моноцитов с различными концентрациями бактериальных суспензий *E. coli* в течение 24 ч инкубации, представлены на рисунках 2 и 3.

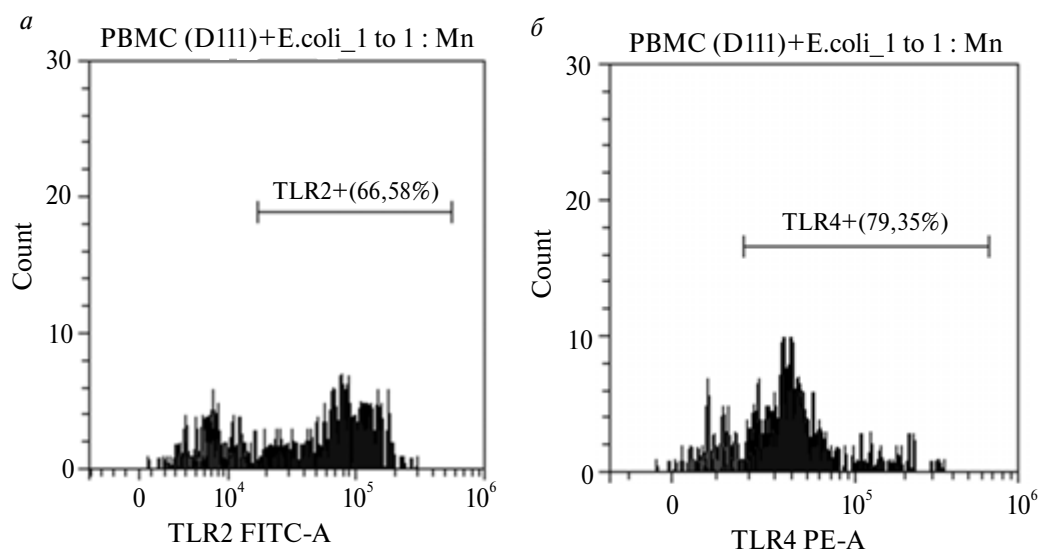


Рисунок 2 — Экспрессия TLR2 (a) и TLR4 (б) на мембране моноцитов при сокультивировании с *E. coli* в течение 24 ч (соотношение PBMC и *E. coli* 1:1)

В стимулированных PBMC суспензией *E. coli* в соотношении 1:1 экспрессия TLR2 и TLR4 на мембране моноцитов снижалась по сравнению с отрицательным контролем и со-

ставляла для TLR2 — 66,6 и 79,4 % для TLR4, что указывает на активное взаимодействие рецепторов моноцитов с патогенными детерминантами *E. coli*.

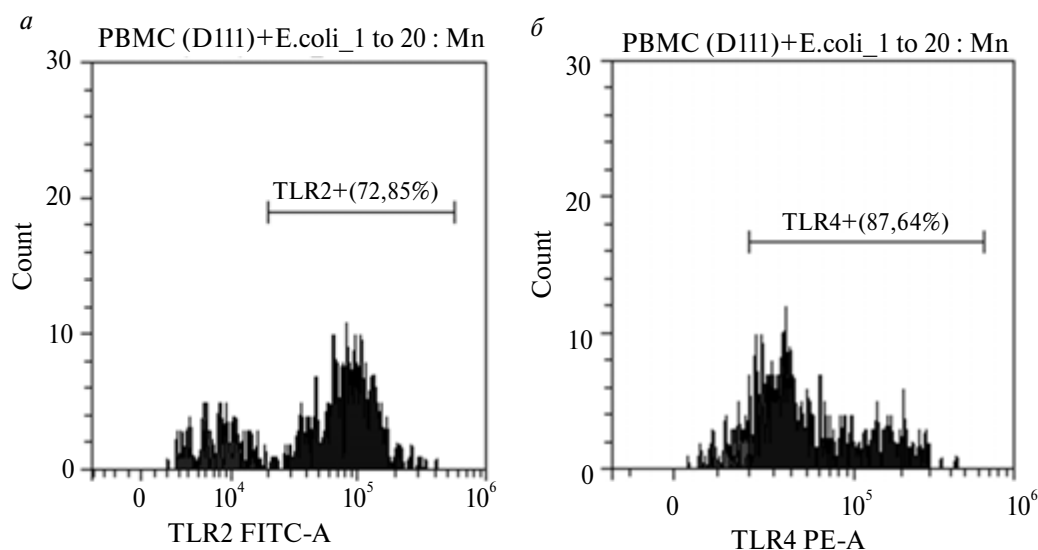


Рисунок 3 — Экспрессия TLR2 и TLR4 на мембране моноцитов при сокультивировании с *E. coli* в течение 24 ч (соотношение PBMC и *E. coli* 1:20)

При соотношении PBMC и *E. coli* 1:20 экспрессия TLR2 и TLR4 на моноцитах снижалась менее значительно по сравнению с отрицательным контролем и соотношением PBMC и *E. coli* 1:1 и составила 72,9 и 87,6 % соответственно.

В таблице 1 отображены уровни экспрессии TLR2 и TLR4 на мембране моноцитов при сокультивировании с *E. coli* в течение 96 ч.

Установлено снижение уровней экспрессии TLR2 и TLR4 на мембране моноцитов при сокультивировании с *E. coli* в течение 96 ч по сравнению с не стимулированными бактериальными антигенами клетками. Наибольшее

снижение отмечено для TLR2 (на 20 % при равных концентрациях PBMC и *E. coli*). При увеличении концентрации *E. coli* в культуре и, соответственно, нагрузки бактериальными антигенами, снижение экспрессии TLR2 и TLR4 нарастало и при соотношении 1:10 составило 62 и 94,4 % соответственно.

Культивирование PBMC с LPS (1мкг/мл) (положительный контроль) в течение 96 ч приводило к значительному подавлению экспрессии рецепторов на мембране моноцитов, что указывает на высокий уровень их стимуляции экзогенным антигеном.

Таблица 1 — Результаты экспрессии TLR2 и TLR4 на мембране моноцитов (96 ч)

Условия культивирования	Экспрессия рецептора, %	
	TLR2	TLR4
Отрицательный контроль (PBMC)	88,33	99,07
PBMC + <i>E. coli</i> (1:1)	68,41	97,40
PBMC + <i>E. coli</i> (1:10)	61,97	94,36
Положительный контроль (PBMC + LPS)	29,17	79,17

Изучены уровни экспрессии Toll-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 на не стимулированных и стимулированных лимфоцитах перифе-

рической крови в ответ на сокультивирование с различными концентрациями *E. coli* в культуре в течение 24 ч (рисунок 4).

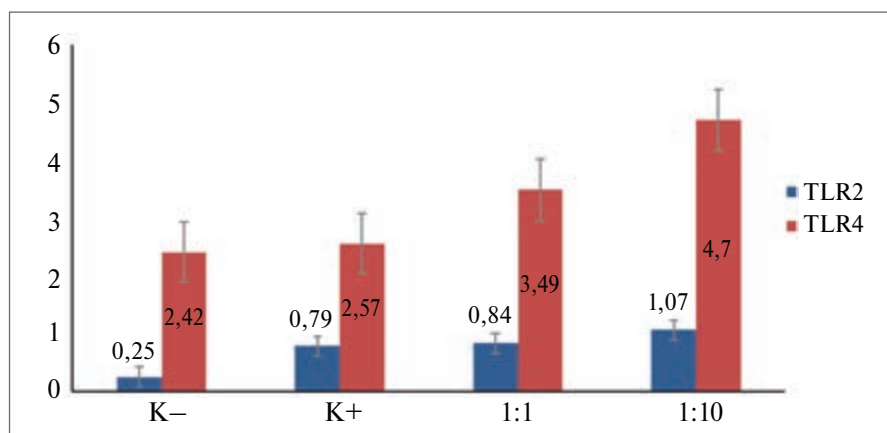


Рисунок 4 — Экспрессия TLR2 и TLR4-рецепторов на мембране лимфоцитов при сокультивировании с *E. coli* в течение 24 ч

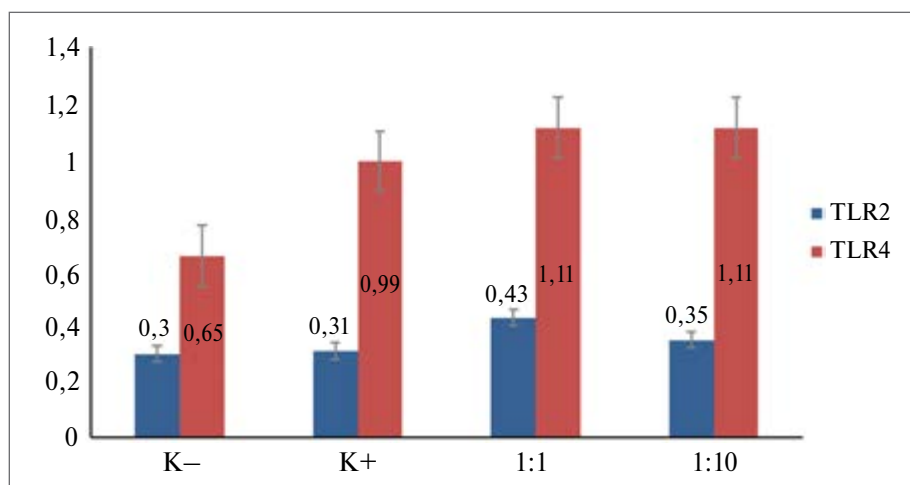
Не стимулированная экспрессия TLR2 и TLR4-рецепторов на мембране лимфоцитов составила 0,25 % и 2,42 %, соответственно. С добавлением культуры *E. coli* количество лимфоцитов, экспрессирующих TLR2 и TLR4-рецепторы, увеличивалось. При соотношении PBMC и *E. coli* 1:10, количество экспрессирующих лимфоцитов было максимальным и составило 1,07 % для TLR2 и 4,7 % для TLR4. При высокой концентрации *E. coli* (в соотношении PBMC и *E. coli* 1:20) экспрессия TLR2 и TLR4-рецепторов на мембране лимфоцитов

снижалась и составила 0,66 % для TLR2 и 2,79 % для TLR4.

Культивирование в течение 96 ч продемонстрировало тенденцию к увеличению экспрессии рецепторов на мембране лимфоцитов независимо от концентрации микроорганизмов в культуре (рисунок 5).

Высокие уровни экспрессии TLR2 и TLR4-рецепторов на мембране лимфоцитов свидетельствуют о высоком уровне ответной реакции данных клеток при длительном взаимодействии с бактериальными агентами.





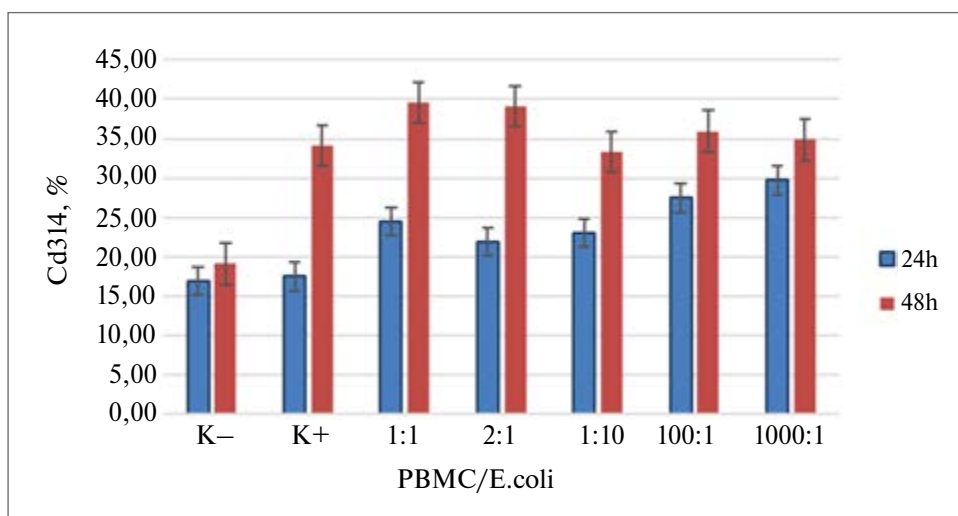
**Рисунок 5 — Экспрессия TLR2 и TLR4-рецепторов на мембране лимфоцитов при сокультивировании с *E. coli* в течение 96 ч**

Для оценки цитотоксичной способности лимфоидных клеток исследована экспрессия киллерного рецептора CD-314. Изучены уровни экспрессии CD-314 на не стимулированных

и стимулированных лимфоцитах периферической крови в ответ на сокультивирование с различными концентрациями *E. coli* в культуре в течение 24 и 48 ч (таблица 2, рисунок 6).

**Таблица 2 — Экспрессия киллерного рецептора CD-314**

Условие культивирования	Экспрессия рецептора, %, через	
	24 ч	48 ч
Отрицательный контроль (PBMC)	16,99	19,13
Положительный контроль (PBMC + LPS)	17,52	34,15
PBMC + <i>E. coli</i> (1:1)	24,45	39,63
PBMC + <i>E. coli</i> (2:1)	21,88	39,07
PBMC + <i>E. coli</i> (10:1)	22,99	33,32
PBMC + <i>E. coli</i> (100:1)	27,46	35,96
PBMC + <i>E. coli</i> (1000:1)	29,72	34,85



**Рисунок 6 — Экспрессия CD-314 лимфоцитами при сокультивировании с *E. coli* в течение 24 и 48 ч**

При не стимулированном культивировании экспрессия CD-314-положительных лимфоцитов составила 16,99 % через 24 ч и 19,13 % через 48 ч. Добавление *E. coli* в равной концентрации к РВМС привело к увеличению экспрессии CD-314 на лимфоцитах до 24,45 и 39,6 % соответственно. Дальнейшее уменьшение концентрации бактерий приводило к снижению экспрессии рецептора, однако снижение было незначительным и при соотношении РВМС и *E. coli* 1000:1 составило 29,72 % через 24 ч и 34,85 % через 48 ч, что так же значительно превышало продукцию рецепторов у не стимулированных сокультивированием лимфоидных клеток.

**Заключение.** Таким образом, при сокультивировании в течение 24 ч моноцитов с суспензией *E. coli* в соотношении 1:1 экспрессия TLR2 и TLR4 на мембране моноцитов снижалась по сравнению с отрицательным контролем на 10,8 % для TLR2 и на 11,2 % для TLR4, при этом значительное увеличение концентрации бактерий (в 20 раз) меньше влияло на уровни экспрессии рецепторов (на 5 и 3 % соответ-

ственно). Наибольшее снижение экспрессии на мембране моноцитов отмечено для TLR2 при сокультивировании в равных концентрациях с *E. coli* в течение 96 ч (на 20 %).

С добавлением культуры *E. coli* количество лимфоцитов, экспрессирующих TLR2 и TLR4-рецепторы, увеличивалось. При соотношении РВМС и *E. coli* 1:10, количество экспрессирующих лимфоцитов было наибольшим и составило 1,07 % для TLR2 и 4,7 % для TLR4 против 0,25 и 2,45 % в контроле. Культивирование в течение 96 ч продемонстрировало тенденцию к увеличению экспрессии рецепторов на мембране лимфоцитов независимо от концентрации микроорганизмов в культуре.

Сокультивирование РВМС и *E. coli* в равной концентрации привело к увеличению экспрессии CD-314 на лимфоцитах на 7,5 % через 24 ч и на 20,6 % через 48 ч по сравнению с не стимулированными лимфоцитами. Уменьшение концентрации бактерий приводило к незначительному снижению экспрессии CD-314-положительных лимфоцитов.

#### Список цитированных источников

1. Miceli, M. H. Emerging opportunistic infections / M. H. Miceli, J. A. Diaz, S. A. Lee // *Lancet Infectious Diseases*. — 2011. — Vol. 11 (2). — P. 142–151.
2. Vouga, M. Emerging bacterial pathogens: the past and beyond / M. Vouga, G. Greub // *Clinical Microbiology and Infection*. — 2016. — Vol. 22, № 1. — P. 12–21. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.10.010.
3. Fournier, P. E. New laboratory tools for emerging bacterial challenges / P. E. Fournier, M. Drancourt, D. Raoul // *Clin. Infectious Diseases*. — 2017. — Vol. 65, № 1. — P. 39–49.
4. Факторы патогенности оппортунистических энтеробактерий и их роль в развитии диареи / А. Р. Мавзютов [и др.] // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. — 2007. — № 1. — С. 89–96.
5. Plasma cell toll-like receptor (TLR) expression differs from that of B cells, and plasma cell TLR triggering enhances immunoglobulin production / M. Dorner [et al.]. // *Immunology*. — 2009. — Vol. 128, № 4. — P. 573–579.
6. El-Zayat, S. R. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview [Electronic resource] / S. R. El-Zayat, H. Sibaii, F. A. Mannaa // *Bulletin of the National Research Centre*. — 2019. — Vol. 43, № 187. — Mode of access: <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>. — Date of access: 03.05.2021.
7. Mukherjee, S. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review / S. Mukherjee, S. Karmakar, S. P. Sinha Babu // *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. — 2016. — Vol. 20, № 2 — P. 193–204.

## Evaluation of lymphocyte and monocyte receptions in co-culturing with microbes

*Tonko O. V., Nizhegorodova D. B., Kolomiets N. D., Hanenko O. N.*

*State Educational Institution “Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education”,  
Minsk, Republic of Belarus*

In an in vitro experiment, the influence of microorganisms (*E. coli*) on the expression levels of surface markers of lymphocytes and monocytes was studied. It was found that the greatest decrease in expression on the monocyte membrane was noted for TLR2 when co-cultivated in equal concentrations with *E. coli*

for 96 hours (by 20 %). The number of expressing lymphocytes was highest at a ratio of PBMC and E. coli 1:10. Cultivation for 96 hours showed a tendency to increase the expression of receptors on the lymphocyte membrane, regardless of the concentration of microorganisms in the culture.

Co-cultivation of PBMC and E. coli at equal concentrations led to an increase in CD-314 expression on lymphocytes after 24 and 48 hours and changed insignificantly with a decrease in the concentration of microorganisms.

**Keywords:** lymphocytes, monocytes, PBMC, opportunistic microorganisms, flow cytometry, TLR2 (CD282), TLR4 (CD284), CD314 (NKG2D).

*Поступила 22.06.2022*

УДК 612.111+ 612.23+577.3

## СОДЕРЖАНИЕ МОНООКСИДА АЗОТА И КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПОКСИИ/РЕОКСИГЕНАЦИИ

*Акулич Н. В.<sup>1</sup>, Походня Ю. Г.<sup>1</sup>, Костин Д. Г.<sup>1</sup>, Сяхович В. Э.<sup>1</sup>, Зинчук В. В.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Учреждение здравоохранения «Национальная антитоксическая лаборатория»,  
аг. Лесной, Республика Беларусь;*

*<sup>2</sup>Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,  
г. Гродно, Республика Беларусь*

**Реферат.** В статье проведен анализ содержания монооксида азота (NO), спектров поглощения и оптико-морфологических характеристик эритроцитов при гипоксии/реоксигенации. Определение внутриклеточного NO проводили с использованием диацетильного производного 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF). Площадь и оптическую плотность эритроцитов измеряли методом морфоденситометрии. Выявлен рост NO в эритроцитах и повышение плотности упаковки гемоглобина при гипоксии/реоксигенации. Обсуждается участие NO-эритроцитов в механизмах поддержания тканевой микроциркуляции при гипоксических состояниях.

**Ключевые слова:** монооксид азота, эритроциты, гипоксия, реоксигенация, проточная цитометрия.

**Введение.** При различных вирусных инфекциях, например коронавирусной, имеются значительные различия в симптоматике: у большинства пациентов заболевание протекает с минимальными проявлениями, у других развивается тяжелая дыхательная недостаточность, осложненная развитием острого респираторного дистресс-синдрома с быстро прогрессирующей гипоксемией [1]. Имея диагностируемые признаки гипоксии, некоторые пациенты с COVID-19 не предъявляют жалоб в отношении функции дыхания [1]. Использование стандартных методов контроля для диагностики повреждений не всегда позволяет выявлять их в ранние сроки заболевания, в связи с чем необходимо углубленное изучение причин и последствий гипоксии. Не вызывает сомнений, что ранняя диагностика гипоксических повреждений органов является пер-

спективным направлением для предупреждения развития опасных последствий гипоксемии.

Эритроциты являются (RBC) терминально дифференцированными клетками, которые, с одной стороны, осуществляют транспорт кислорода, с другой — подвергаются изменениям при воздействии гипоксии [2]. При высоких напряжениях кислорода, преобладающих в ацинусах легких, кровь полностью насыщается кислородом и гемоглобин (Hb) имеет «relaxed» R-состояние. Когда кровь поступает в микроциркуляторное русло, парциальное напряжение кислорода (PO<sub>2</sub>) снижается, способствуя переходу в «tense» T-форму и отщеплению кислорода от гемоглобина. В последнее время в развитии гипоксических состояний активно исследуется роль газотрансмиттера монооксида азота, который проявляет свою активность по-

средством механизмов, отличающихся от других сигнальных молекул.

**Цель работы** — оценка содержания монооксида азота и фракций гемоглобина при моделировании гипоксии/реоксигенации.

**Материалы и методы.** Исследования проводилось на базе УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория». Исследование выполнено на образцах крови добровольцев ( $n = 17$ ) с использованием вакуумных систем с  $K_2$ ЭДТА. Исследование одобрено комитетом по этике УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория».

Оценку спектров суспензии эритроцитов и расчет фракций гемоглобина суспензии эритроцитов и раствора гемоглобина производили по формулам (1–3):

$$[HbO_2] = 29,8 \cdot A577 - 9,8 \cdot A630 - 22,2 \cdot A560; \quad (1)$$

$$[Hb] = -1,6 \cdot A577 + 2,5 \cdot A630 - 0,33 \cdot A560; \quad (2)$$

$$[MetHb] = 0,2 \cdot A577 - 0,4 \cdot A630 + 0,33 \cdot A560, \quad (3)$$

где  $[HbO_2]$ ,  $[Hb]$  и  $[MetHb]$  — окси-, дезокси- и метгемоглобин соответственно;  $A577$ ,  $A630$  и  $A560$  — значения поглощения при соответствующих длинах волн.

Проверку правильности произведенных измерений и подсчетов осуществляли при параллельном измерении спектров поглощения и оценки фракций гемоглобина на газоанализаторе ABL 800 Flex (Radiometer).

Оценка влияния гипоксии/реоксигенации *in vitro* (экспозиция 90 мин) реализована с использованием модуля контроля газов планшетного спектрофлуориметра Synergy H1 (Biotek). В перчаточном боксе, подключенном к генератору азота и баллону с углекислым газом, концентрация  $CO_2$  была постоянной и составляла 4,7–5,3 %, парциальное давление кислорода варьировало в соответствии с условиями эксперимента: 1, 7 и 16 %. Реоксигенация (в течение 30 мин) включала в себя установление 7 % парциального давления кислорода, соответствующее напряжению ( $pO_2$ ) 36–40 мм рт. ст. венозной крови. По окончании реоксигенации в лунку планшета вносили деионизированную воду и получали спектр раствора гемоглобина.

Морфоденситометрический анализ препаратов крови производили с использованием микроскопа Olympus BX-53 (Olympus, Япония). Приготовление и фиксация мазков осуществлялась в гипо- и/или гипероксических условиях. В 1-й серии (*группа Vox*) приготовление, сушка и фиксация метанолом проводилась в

перчаточном боксе в условиях гипоксии ( $n = 17$ ). Во 2-й серии (*группа Hypoxia*) — инкубированная в условиях гипоксии суспензия эритроцитов помещалась в вакутайнер с крышкой, затем в условиях лабораторного помещения вакутайнер вскрывали, готовили мазки, высушивали и фиксировали ( $n = 17$ ). В 3-й группе (*группа Control*) приготовление и фиксация мазков осуществлялась в условиях лабораторного помещения ( $n = 17$ ).

Определение содержания внутриклеточного NO и морфоденситометрических параметров эритроцитов проводили методом проточной цитометрии (FACS ARIA, США) и световой микроскопии. Для гейтирования эритроцитов пробы крови окрашивались моноклональными антителами к линейному маркеру эритроцитов (гликофору A, CD 235 a), для оценки NO использовали 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеин (DAF, 10  $\mu$ M) и его диацетильное производное (DAF DA, 10  $\mu$ M) (все реагенты Molecular Probes). Для подготовки проб при проведении исследований на проточном цитометре использовали фосфатный буфер FACS Flow (BD Bioscience). Анализировали в каждой пробе не менее 40 тыс. клеток. Микрочастицы эритроцитов оценивали по низким значениям прямого светорассеяния и сильной экспрессии на цитоплазматической мембране линейного маркера эритроцитов (CD 235a).

Для возбуждения флуоресцентных красителей использовали лазеры проточного цитометра с длиной волны 488 и 632 нм. Регистрацию флуоресценции производили с использованием узкополосных фильтров. Для анализа применяли логарифмическую шкалу с 4 декадами. В ходе анализа производили настройку флуоресценции проточного цитометра таким образом, чтобы в 1-й декаде флуоресценции двух используемых каналов находились клетки изотипического контроля.

Полученные значения представлены в виде медианы (Me) и 25-й и 75-й процентиля и проанализированы при помощи дисперсионного анализа с применением программы для персонального компьютера Statistica 10.0.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты спектрофотометрических исследований крови здоровых добровольцев при парциальном давлении (напряжении) кислорода 36–40 мм рт. ст. (соответствует  $pO_2$  венозной крови) представлены на рисунке 1. Все представленные на рисунке спектры имеют характерные пики 540 и 576 нм и специфический минимум при 560 нм.



Проведенная оценка спектров поглощения крови показала, что при этом уровне содержания кислорода в атмосфере бокса (7 %) выявлено снижение фракции оксигемоглобина с 37,2 % (32,9; 41,5) до 35,4 % (31,1; 39,7), при этом пропорционально выросла доля дезоксигемоглобина с 52,9 % (47,3; 58,5) до 55,96 % (52,2; 59,7),  $p < 0,05$ . При добавлении в суспензию эритроцитов DAF фракция  $\text{HbO}_2$  выросла до 43,1 % (41,1; 47,4), что свидетельствует об увеличении сродства гемоглобина к кислороду.

Процесс реоксигенации сопровождался значительным ростом фракции оксигемоглобина до 46,7 % (42,3; 50,5), при этом доля  $\text{HHb}$  составляла 44,4 % (41,8; 47,1),  $p < 0,05$ . DAF ослаблял этот эффект и доля оксигемоглобина на фоне введения зонда была 45,1 % (43,3; 46,9),  $p < 0,05$ . Моделирование гипоксии привело к сдвигу вправо максимума поглощения в области полосы  $\text{Soret}$ .

Во 2-й группе инкубация крови в течение 90 мин в условиях 1%-го содержания кислорода в атмосфере привела к снижению фракции оксигемоглобина до 24,2 % (18,2; 29,9) (рисунок 2).

Фракция  $\text{HHb}$  выросла до 65,6 % (61,1; 70,2),  $p < 0,05$ . Как и в случае применения газовой смеси с 7 % кислорода, использование в условиях эксперимента газовой смеси с 1 %  $\text{O}_2$  сопровождалось сдвигом вправо максимума в области полосы  $\text{Soret}$ . Необходимо отметить феномен роста оптической плотности в условиях острой гипоксии во всем исследуемом диапазоне. Реоксигенация сопровождалась резким повышением фракции оксигемоглобина до 51,3 % (46,4; 56,2),  $p < 0,05$  и метгемоглобина ( $\text{MetHb}$ ) до 11,1 % (7,7; 14,4),  $p < 0,05$ , снижением фракции  $\text{HHb}$  до 34,7 % (31,3; 38,2),  $p < 0,05$ .

Поскольку в наших исследованиях при измерениях спектров поглощения использовались суспензии клеток, то в ходе фотометрии возможное изменение оптической плотности пробы могло быть вызвано отражением и рассея-

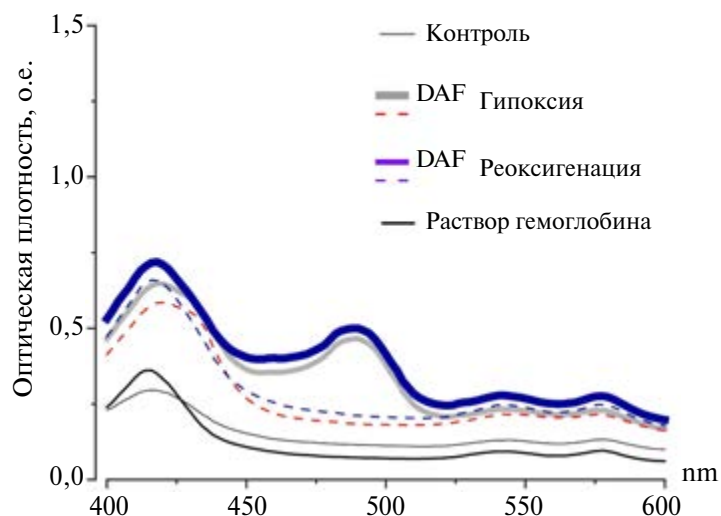


Рисунок 1 — Спектры поглощения эритроцитов крови при 7 % кислорода в модельной смеси

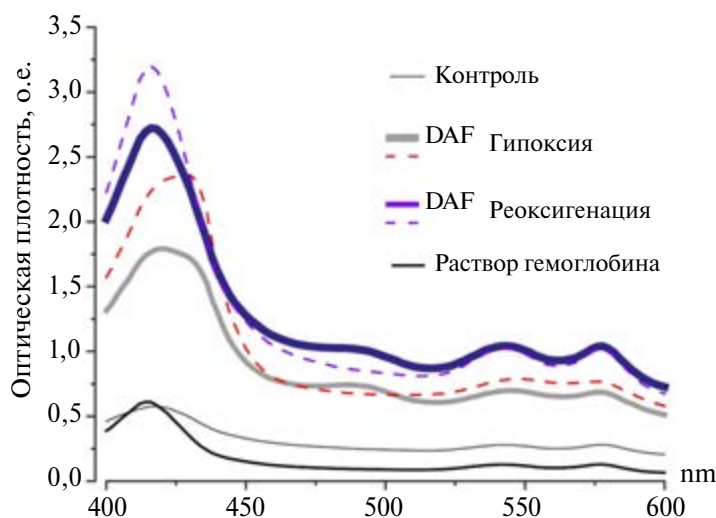
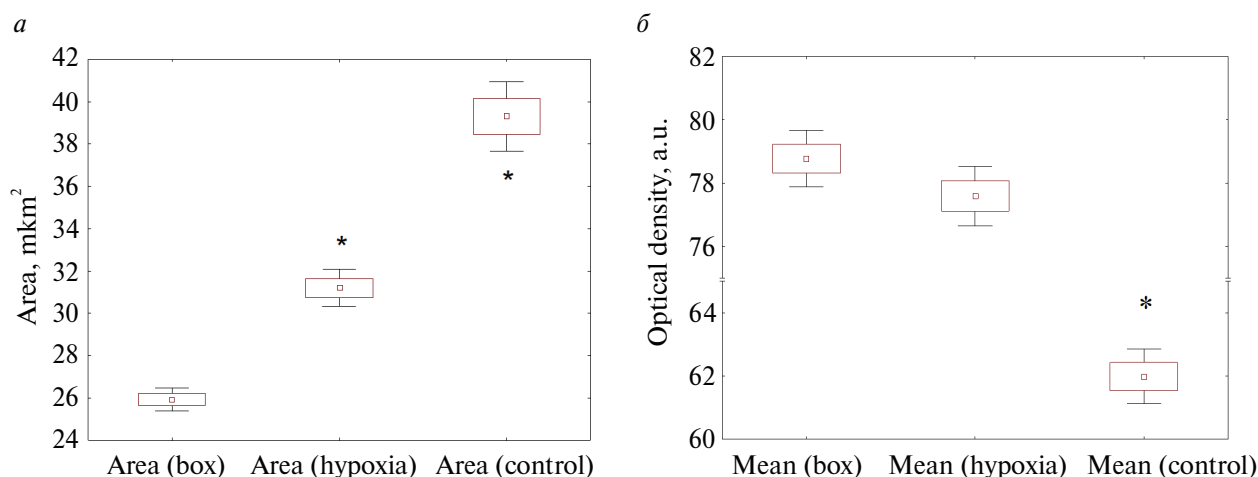


Рисунок 2 — Спектры поглощения эритроцитов крови при 1 % кислорода в модельной смеси

нием света на клетках и в результате эффекта «сита». Следовательно, для оценки этого вклада в изменение светопропускания и светорассеивания в суспензии необходимо оценить морфологические и дифрактометрические характеристики клеток при моделировании гипоксии. Для проверки этого предположения были проведены исследования морфоденситометрических параметров эритроцитов в условиях гипоксии и реоксигенации (рисунок 3, а, б).



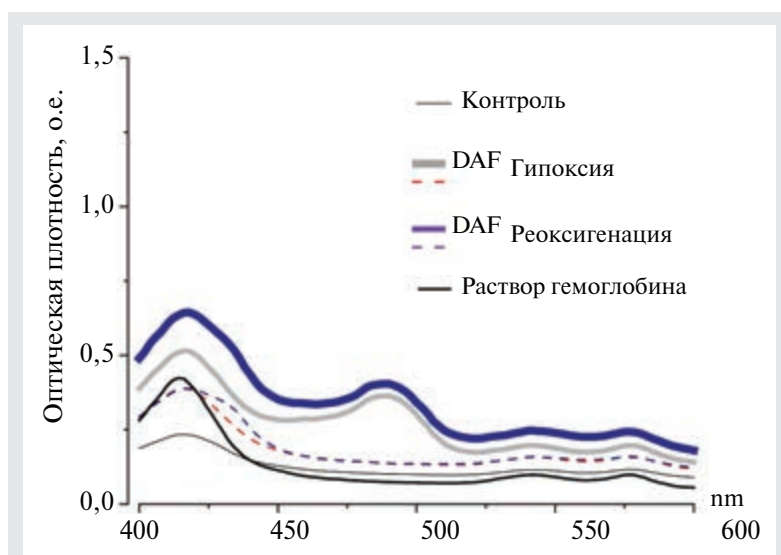
**Рисунок 3 — Оптико-морфологические характеристики эритроцитов крови исследуемых групп: а — гипоксия; б — реоксигенация (\*Достоверные изменения в сравнении с контролем.)**

Наибольшая площадь эритроцитов  $39,3$  ( $26,3$ ;  $47,7$ )  $\mu\text{m}^2$  была зарегистрирована в группе контроля, в группе Нурохиа —  $31,2$  ( $24,1$ ;  $31,9$ )  $\mu\text{m}^2$ , а в группе Вох —  $25,9$  ( $22,5$ ;  $27,7$ )  $\mu\text{m}^2$ . При этом по мере снижения процентного содержания кислорода увеличилась однородность эритроцитов, о чем свидетельствует значение среднеквадратического отклонения (рисунок 3). Среднее значение оптической плотности (Mean) при моделировании гипоксии *in vitro* выросло с  $61,9$  ( $55,5$ ;  $68,2$ ) о.е. до  $78,7$  ( $71,3$ ;  $85,2$ ) о.е.,  $p < 0,05$  в группе Вох.

При инкубации в условиях гипоксии суспензии эритроцитов, а затем при приготовлении и высушивании мазков в условиях лабораторного помещения (Нурохиа) средняя оптическая плотность также достоверно была выше, чем в группе контроля, и составляла  $77,6$  ( $69,1$ ;  $86,2$ ) о.е.,  $p < 0,05$ .

Таким образом, рост среднего значения оптической плотности эритроцитов при гипоксии может являться причиной увеличения оптической плотности при фотометрии суспензии красных кровяных телец. В работе В. В. Ревина и др. [4] методом спектроскопии комбинационного рассеяния показано, что гипоксия сопровождается конформационными изменениями гемопорфирина, приводящими к росту плотности упаковки гемоглобина в эритроците более чем в 1,5 раза.

При максимальной концентрации кислорода (16 %) фракция гемоглобина не снижалась при инкубировании крови, а, напротив, росла (рисунок 4). Так, рост фракции оксигемоглобина был более 6 % ( $p < 0,05$ ) и  $\text{HbO}_2$  составлял 48,3 % ( $45,4$ ;  $51,2$ ). Реоксигенация пробы до 6 %  $\text{O}_2$  характеризовалась значительным снижением фракции  $\text{HbO}_2$  до 36,3 % ( $34,1$ ;  $38,8$ ). При оксигенации и особенно реоксигенации без использования DAF выявлен сдвиг вправо максимума в области полосы Soret.



**Рисунок 4 — Спектры поглощения эритроцитов крови при 16 % кислорода в модельной смеси**

Известно, что ННб в анаэробных условиях восстанавливает нитрит до оксида азота, что подтверждается образованием нитрозогемоглобина (SNO-Hb) и сдвигом полосы Core влево [5]. Согласно нашим данным о положении максимума полосы Core, содержание SNO-Hb при гипоксии снижено, что ука-

зывает, в том числе на преимущественную T-конформацию гемоглобина красных кровяных телец.

На заключительном этапе исследования (рисунок 5) был проведен анализ содержания монооксида азота в суспензии эритроцитов и в отдельных клетках.

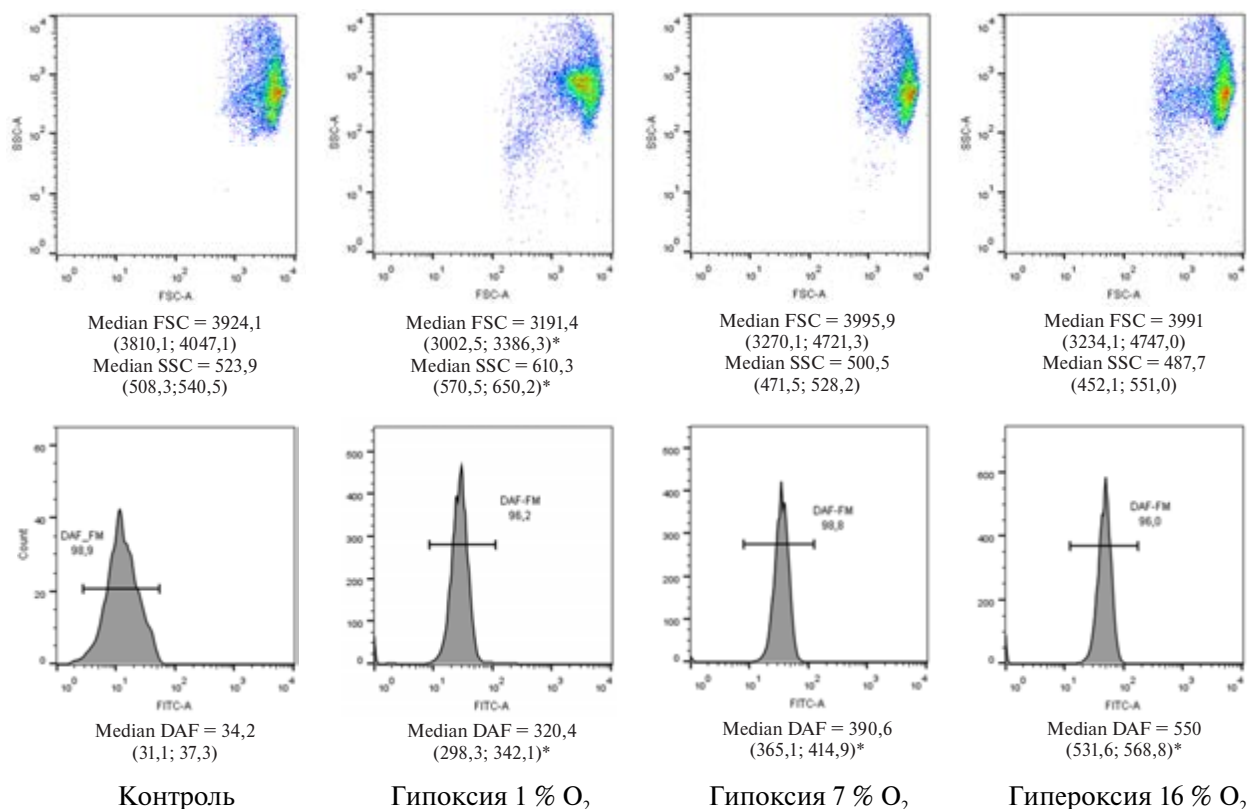


Рисунок 5 — Оценка содержания монооксида азота в суспензии эритроцитов исследуемых групп (\*Достоверные изменения в сравнении с контролем.)

В первом случае (анализ в суспензии) использовали планшетный спектрофлуориметр, а для второго способа (анализ в отдельных клетках: эритроцитах) использовали проточную цитометрию. При этом целевые клетки отделяли от лейко- и тромбоцитов при помощи линейного маркера CD 235a. Затем оценивали субпопуляционный состав по параметрам прямого светорассеяния и интенсивности флуоресценции DAF DA. Его форма в виде диацетата способна проникать через цитоплазматическую мембрану. До вступления в реакцию с NO и его производными DAF DA практически не флуоресцирует, но при взаимодействии с монооксидом азота и производными NO флуоресценция значительно возрастает.

Значение прямого (FSC) и бокового светорассеяния (SSC) в группе контроля и при моделировании гипоксии *in vitro* было сход-

ным, за исключением условий острой гипоксии, характеризующейся 1 % содержанием кислорода. При других экспериментальных условиях отличий в показателях светорассеяния по сравнению с контролем (до помещения крови в экспериментальные условия) выявлено не было.

Проведенная оценка содержания NO показала, что в условиях гипоксии и реоксигенации *in vitro* уровень внутриклеточного NO статистически значимо выше, чем в контроле ( $p < 0,05$ ). Сравнительный анализ продемонстрировал прямо пропорциональную зависимость между содержанием кислорода в модельной смеси и внутриклеточным содержанием NO.

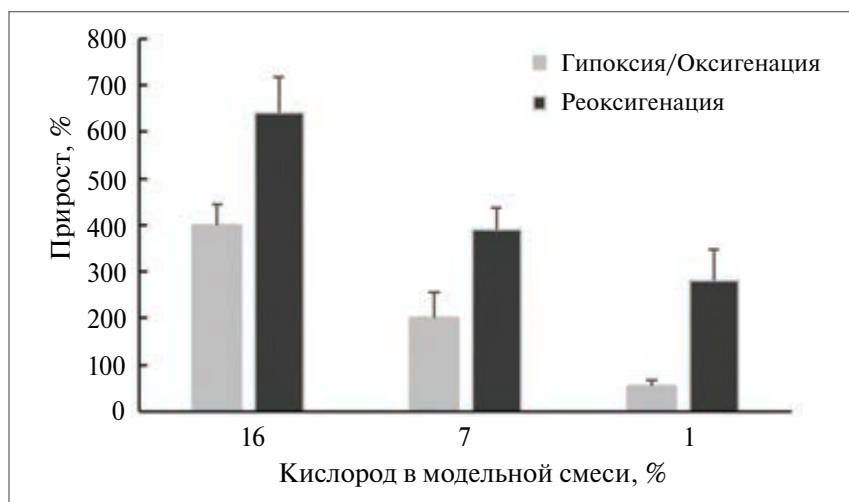
Таким образом, гипоксическое состояние при моделировании гипоксии *in vitro* сопровождается активацией L-аргинин NO-системы

эритроцитов, которая выполняет адаптивную функцию к воздействию гипоксии. Можно предположить, что определенную роль в генерации NO и его производных в экспериментальных условиях играет нитритредуктазная система, особенно при создании нами острой (1 % O<sub>2</sub>) гипоксии.

Для выяснения механизмов изменения кислородтранспортной функции крови при гипоксии важным является оценка влияния газо-

трансммиттеров, в частности монооксида азота. Условия, создаваемые в планшетном спектрофлуориметре, позволяют оценить кинетику содержания внутриклеточного NO при гипоксии/реоксигенации (рисунок 6).

Наибольший прирост монооксида азота (практически в 4 раза) выявлен при 16 % O<sub>2</sub> (90 мин экспозиция) в воздушной смеси. Реоксигенация сопровождалась дальнейшим приростом NO, скорость которого снижалась.



**Рисунок 6 — Процент прироста интенсивности флуоресценции DAF при гипоксии/оксигенации в зависимости от содержаний кислорода**

При применении 7 % O<sub>2</sub> в модельной смеси происходил равномерный рост (в 4 раза) содержания монооксида азота на протяжении всего периода наблюдения. Минимальное содержание кислорода также приводило к росту содержания NO, но темп его прироста был ниже, чем при других экспериментальных условиях. Реоксигенация в течение 30 мин сопровождалась резким приростом содержания монооксида азота, причем 30-минутная инкубация после острой гипоксии привела к большему приросту NO, чем 90-минутная экспозиция крови при 7 % кислорода.

Таким образом, рост содержания монооксида азота при гипоксии можно рассматривать как адаптивную реакцию. В свою очередь рост NO и его производных в эритроцитах может менять кривую диссоциации оксигемоглобина, снижая сродство гемоглобина к кислороду [2]. Подтверждением этого феномена является рост тканевого pO<sub>2</sub> после использования нитроглицерина в модели *in vivo* [6]. Кроме того, гипоксия, запуская механизмы клеточного стресса, активирует NOS эритроцитов, что приводит к высвобождению NO и вазодилатации сосудов

в этих условиях. В совокупности это подтверждает важную роль NO эритроцитов в регуляции местного кровотока при гипоксических состояниях.

**Заключение.** В ходе выполнения исследования уточнены представления о механизмах адаптации к гипоксии с участием L-аргинин-NO системы эритроцитов. Установлено, что гипоксия сопровождается ростом фракции Hb и сдвигом вправо максимума в области полосы Core. Реоксигенация приводит к резкому повышению фракции оксигемоглобина и метгемоглобина, снижению фракции Hb. Выявлен феномен снижения линейных размеров и повышение плотности упаковки гемоглобина в эритроците.

Обнаруженный нами рост содержания NO и его производных в эритроцитах является одним из возможных механизмов поддержания тканевой микроциркуляции, что объясняет отсутствие дыхательного дискомфорта (одышки) у пациентов при гипоксии. Использование данных о содержании монооксида азота и изменении морфооптических характеристик эритроцитов периферической крови



может являться дополнительным диагностическим признаком, определяющим прогноз течения заболеваний, сопровождающихся гипоксией.

*Источник финансирования.* Работа выполнялась в рамках программы ГПНИ 4 «Трансляционная медицина», Подпрограмма 4.1 «Экспериментальная медицина».

#### Список цитированных источников

1. Дони́на, Ж. А. Причины гипоксемии при COVID-19 / Ж. А. Дони́на // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. — 2022. — Т. 108. — № 1. — С. 3–12.
2. Akulich, N. V. Role of the L-Arginine / NO System in Red Blood Cells at Different Values of Oxygen Partial Pressure / N. V. Akulich, V. V. Zinchuk // J. of Evolutionary Biochemistry and Physiology. — 2022. — Т. 58, № 2. — С. 548–557.
3. A broad diversity in oxygen affinity to haemoglobin / B. Balcerек [et al.] // Scientific Reports. — 2020. — Т. 10, № 1. — С. 16920.
4. Сравнительная характеристика липидного состава и морфофункциональных показателей ядерных и безъядерных эритроцитов в условиях гипоксии / В. В. Ревин [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. — 2020. — Т. 106, № 5. — С. 631–653.
5. Glutathione oxidation under the action of sodium nitrite on hemoglobin / I. Stepuro [et al.] // Polish J. Pharmacology. — 1994. — Т. 46, № 6. — С. 601–607.
6. Effects of Nitroglycerin on Erythrocyte Rheology and Oxygen Unloading / J.-P. Bin [et al.] // Circulation. — 2006. — Т. 113, № 21. — С. 2502–2508.

## Nitrogen monoxide content and oxygen-binding properties of erythrocytes during hypoxia/reoxygenation

*Akulich N. V.<sup>1</sup>, Pakhadnia Y. G.<sup>1</sup>, Kostsin D. G.<sup>1</sup>, Syakhovich V. E.<sup>1</sup>, Zinchuk V. V.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup> National Anti-Doping Laboratory, Minsk region Lyasny, Republic of Belarus;*

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

Nitrogen monoxide content, absorption spectra, and optical and morphological characteristics of erythrocytes under hypoxia/reoxygenation were analyzed. Intracellular NO was measured using a diacetyl derivative of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF). The area and optical density of erythrocytes were evaluated by morphodensitometry. It was found increase in NO in erythrocytes and hemoglobin packing density during hypoxia/reoxygenation. The role of erythrocyte NO in the mechanisms of tissue microcirculation maintaining under hypoxic state.

**Keywords:** Nitric oxide, red blood cells, hypoxia, reoxygenation, flow cytometry.

*Поступила 29.06.2022*

УДК 616.155.392.7:612.017.1

## СОДЕРЖАНИЕ СЫВОРОТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ПЛАЗМОКЛЕТОЧНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

*Козич Ж. М.<sup>1</sup>, Мартинков В. Н.<sup>1</sup>, Пугачева Ж. Н.<sup>1</sup>, Кортаева Л. Е.<sup>1</sup>,  
Близин Д. А.<sup>1</sup>, Климкович Н. Н.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр  
радиационной медицины и экологии человека»,  
г. Гомель, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия  
последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** Одним из основных направлений исследований плазмноклеточных новообразований является изучение факторов риска и молекулярных механизмов прогрессии. Моноклональная гаммапатия неуточненного значения (МГНЗ) — доброкачественное заболевание с риском прогрессирования в различные лимфопролиферативные заболевания 1 % в год. Время до прогрессии МГНЗ носит индивидуальный характер и может составлять от года до десятилетий. Четких маркеров прогрессии МГНЗ в настоящее время не выделено. Также недостаточно изучены процессы, лежащие в основе прогрессии солитарной плазмцитомы (СП). Поэтому актуальным является изучение биологии данных заболеваний и поиск дополнительных прогностических маркеров и факторов риска.

Цитокины играют важную роль в формировании и регулировании иммунного ответа, способны стимулировать пролиферацию, дифференцировку и апоптоз опухолевых плазматических клеток (ПК), что определяет перспективу их исследования при прогрессии плазмноклеточных новообразований.

Исследованы уровни цитокинов (IL1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- $\alpha$ ) у 210 первичных пациентов с моноклональной гаммапатией неуточненного значения (МГНЗ,  $n = 90$ ), множественной миеломой (ММ,  $n = 101$ ), солитарной плазмцитомой (СП,  $n = 19$ ) за период с октября 2018 г. по январь 2022 г. Медиана возраста в группах МГНЗ — 61,0 год, ММ — 65,0 лет, СП — 61,0.

У пациентов с прогрессией ММ обнаружено значимое превышение содержания в сыворотке крови IL-2, IL-6 и TNF- $\alpha$ , при МГНЗ — IL-8, IL-1 $\beta$ . Выявлено значимое превышение уровня IL-6 в сыворотке крови у пациентов ММ в стадии ISS II и ISS III и пациентов с уровнем ЛДГ, анемией, гиперкальциемией. Среди пациентов ММ с ненормальным соотношением  $\kappa/\lambda$  установлено значимое превышение уровней IL-1 $\beta$ , IL-2 и TNF- $\alpha$  в сыворотке крови по сравнению с пациентами с нормальными значениями соотношения легких цепей. Высокий уровень IL-8 в сыворотке крови обнаружен у пациентов с ММ с деструктивными поражениями костей и поражением почек, а также у пациентов МГНЗ с прогрессией заболевания. Выявлена значимая корреляция между содержанием СРБ и уровнем IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  в сыворотке крови при ММ, с уровнем IL-6, IL-8 и TNF- $\alpha$  в сыворотке крови при МГНЗ, с уровнем IL-6 в сыворотке крови при СП.

Таким образом установлено, что содержание IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  в сыворотке крови имеет связь с активностью опухолевого процесса при плазмноклеточных новообразованиях и может быть рассмотрено в качестве прогностического маркера.

**Ключевые слова:** множественная миелома, моноклональная гаммапатия неуточненного значения, солитарная плазмцитомы, цитокины, прогрессия.

**Введение.** Плазмноклеточные новообразования — это заболевания с пролиферацией клональных ПК, которые продуцируют парапротеин. Они включают в себя ММ, СП, МГНЗ, макроглобулинемию Вальденстрема (МВ), острый плазмобластный лейкоз и некоторые другие парапротеинемии [1].

Множественная миелома (ММ) является одним из наиболее распространенных гематологических злокачественных новообразований, характеризуется инфильтрацией костного моз-

га клональными ПК, секрецией патологического иммуноглобулина в крови и/или моче и присутствием остеолитических повреждений. В своем развитии ММ в большинстве случаев проходит стадию МГНЗ и/или тлеющей миеломы (ТМ). Редкие варианты плазмноклеточных новообразований, такие как СП и экстрамедуллярная плазмцитомы, также часто могут прогрессировать до ММ. В основе патогенеза и прогрессирования лежат сложные механизмы взаимодействия микроокружения, молеку-

лярно-генетических и внеклеточных факторов, к которым относят цитокины и хемокины.

Известные в настоящее время факторы риска ММ — пол, возраст, раса, наличие в анамнезе плазмноклеточных пролифераций, связь с радиоактивным воздействием или химическими агентами (Cancer.Net, 2021), а также международный прогностический индекс (PI) являются адекватными для оценки прогноза заболевания.

Многие механизмы прогрессии и клональной инфильтрации ПК при ММ достаточно хорошо изучены. Известно, что опухолевые ПК способны индуцировать активацию остеокластов. Ингибируя функцию остеобластов, ПК запускают процессы резорбции. Повышенная резорбция костной ткани приводит к образованию литических костных поражений и к высвобождению цитокинов и факторов роста, которые влияют на апоптоз, пролиферацию, ангиогенез и метаболизм клеток [2]. Важную роль в прогрессии заболевания играют и стромальные клетки костного мозга, которые также участвуют в распространении ПК в костном мозге при ММ. В то же время недостаточно изучены процессы, лежащие в основе прогрессии МГНЗ и СП, также неизвестно, какова при этом роль микроокружения костного мозга и различных цитокинов.

В основном МГНЗ является доброкачественным заболеванием с риском прогрессии в различные злокачественные новообразования лимфоидной природы 1 % в год. Время до прогрессии носит индивидуальный характер: в некоторых случаях оно составляет десятилетия (20–35 лет), но у отдельной категории пациентов прогрессия развивается уже в течение года [3]. Поэтому актуальным является изучение биологии данного заболевания и поиск дополнительных прогностических маркеров и факторов риска, играющих роль в более быстром развитии опухолевого процесса.

СП — менее распространенное заболевание, характеризующееся локальной пролиферацией неопластических моноклональных ПК без признаков системного поражения. Диагноз СП подтверждается гистологически. Некоторые из пациентов СП имеют моноклональный белок в сыворотке и/или моче, а также небольшой процент клональных ПК в костном мозге, что связано с высоким риском прогрессирования и предполагает индивидуальный подход к наблюдению. Четких факторов, оказывающих влияние на прогрессию СП, в настоящее время не выделено.

Одним из основных направлений исследований плазмноклеточных новообразований является изучение факторов риска и молекулярных механизмов прогрессии. Цитокины — это полипептиды, которые в норме регулируют баланс между гуморальным и клеточным иммунным ответом. В большинстве случаев они вырабатываются Т- и В-клетками, естественными киллерами (НК), нейтрофилами и макрофагами. Некоторые цитокины, включая интерлейкины (IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23), фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и интерферон- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), обладают провоспалительным действием. При развитии патологических состояний цитокины и факторы роста могут влиять на пролиферацию опухолевых клеток. При ММ цитокины могут стимулировать пролиферацию, дифференцировку и апоптоз опухолевых ПК. Важную роль в прогрессии отводят IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  [4].

**Цель работы** — исследование уровней цитокинов в сыворотке крови пациентов с плазмноклеточными новообразованиями и изучение их взаимосвязи с другими лабораторными показателями.

**Материалы и методы.** В исследование включено 210 первичных пациентов с плазмноклеточными новообразованиями, проходивших обследование и наблюдавшихся в период с октября 2018 г. по январь 2022 г. в ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ» г. Гомеля.

Выделены три группы исследования: пациенты МГНЗ ( $n = 90$ ), ММ ( $n = 101$ ), СП ( $n = 19$ ). Диагностические критерии для МГНЗ и ММ основаны на конвенции Международной рабочей группы по миеломе. Диагноз СП подтвержден гистологическим методом. В исследование включены пациенты без острой инфекционной патологии на момент постановки диагноза. Пациентами подписано информированное согласие на участие в исследовании. Всем пациентам проведены клинико-лабораторные исследования, включая гемограмму, биохимический анализ крови, исследование белков сыворотки крови, иммуноглобулинов и  $\beta$ 2-микроглобулина. Исследование цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) в сыворотке крови выполнено методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов ИФА-БЕСТ (РФ). Проведена аспирационная биопсия и трепанобиопсия костного мозга для цитологического и гистопатологического исследования, включая иммунофенотипическую и иммуногистохимическую оценку клональности. Визуализирующие методы исследо-

вания включали низкодозовое КТ всего тела и диффузионно-взвешенное МРТ всего тела.

В процессе динамического наблюдения пациенты были обследованы, согласно факторам риска М. V. Mateos с соавт. (2021), через 3, 6 и 12 месяцев с выполнением стандартных лабораторных исследований по протоколу ММ [5]. Прогрессирование заболевания у пациентов МГНЗ и СП диагностировалось при выявлении одного из CRAB-критериев (очагов деструктивного поражения, поражения почек, анемического синдрома или гиперкальциемии), а также при выявлении биохимического рецидива, новых очагов деструкций и плазмцитом и/или инфильтрации костного мозга опухолевыми ПК у пациентов ММ.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.1. При описании количественных признаков указывали медиану (25-й и 75-й перцентили). Различия в уровнях анализируемых показателей между группами определяли с использованием критерия Ман-

на – Уитни. Сравнение частот изучаемых признаков выполняли с применением критерия Хи-квадрат. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Медиана возраста у пациентов с МГНЗ составила 61,0 год (54,0 и 67,0), у пациентов ММ 65,0 лет (58,0 и 70,0), у пациентов СП 61,0 год (54,0 и 68,0). Среди пациентов в группе МГНЗ преобладали лица женского пола ( $p < 0,05$ ). Клинико-лабораторные показатели пациентов в группах исследования представлены в таблице 1.

Уровни цитокинов были определены у пациентов при первичном осмотре. Профиль цитокинов представлен в таблице 2.

На момент постановки диагноза выявлено превышение содержания IL-8 в сыворотке во всех группах исследования.

При сравнении содержания интерлейкинов между группами обнаружен высокий уровень IL-6 в группе ММ по сравнению с МГНЗ ( $p = 0,022$ ) и высокий уровень IL-2 при СП по сравнению с МГНЗ ( $p = 0,044$ ).

Таблица 1 — Клинико-лабораторные показатели пациентов в группах исследования

Параметр	МГНЗ (n = 90)	ММ (n = 101)	СП (n = 19)
Пол:			
мужчины	54 (34,62 %)	53 (47,32 %)	13 (48,15 %)
женщины	102 (65,38 %)	59 (52,68 %)	14 (51,85 %)
Имунохимический тип:			
IgG	45 (50,00 %)	53 (52,48 %)	5 (26,32 %)
IgA	7 (7,78 %)	18 (17,82 %)	2 (10,53 %)
IgM	6 (6,67 %)	3 (2,97 %)	1 (5,26 %)
легкие цепи иммуноглобулинов ( $\kappa/\lambda$ )	22 (24,44 %)	22 (21,78 %)	5 (26,32 %)
несекретирующий	—	4 (3,96 %)	5 (26,32 %)
сочетание двух иммуноглобулинов	10 (11,11 %)	1 (0,99 %)	1 (5,26 %)
M-градиент $\geq 15$ г/л	16 (11,85 %)	59 (60,82 %)	—
$\beta 2$ -микроглобулин $> 3$ мг/л	65 (45,14 %)	81 (72,32 %)	4 (16 %)
Стадия ММ по ISS:			
I	—	32 (31,7 %)	—
II	—	28 (27,7 %)	—
III	—	41 (40,6 %)	—

Таблица 2 — Содержание цитокинов в сыворотке крови пациентов в зависимости от группы исследования

Цитокин	МГНЗ			ММ			СП		
	Медиана	25 %	75 %	Медиана	25 %	75 %	Медиана	25 %	75 %
IL-2, пг/мл	2,7	1,8	4,2	3,2	2,3	5,1	3,9	2,6	20,5
IL-6, пг/мл	3,7	2,5	6,2	5,4	2,9	10,5	3,4	2,2	7,4
IL-8, пг/мл	14,5	9,0	28,6	13,4	9,2	38,2	12,4	9,0	17,5
TNF, пг/мл	6,1	3,8	9,6	5,5	4,0	11,6	5,2	3,8	55,0
IL-1 $\beta$ , пг/мл	4,6	3,3	6,6	5,6	2,9	8,3	4,3	3,2	5,4



Прогрессия МГНЗ до ММ за период наблюдения зафиксирована в 6,67 % (6) случаев, СП до ММ в 47,37 % (9). Прогрессия ММ определена в 24,75 % (25) случаев.

При анализе цитокинового профиля нами установлено, что в группе пациентов с прогрессией МГНЗ и СП до ММ определялись более высокие уровни IL-1 $\beta$  — 6,9 пг/мл (5,4 и

8,5) и 5,1 пг/мл (4 и 8,1) соответственно, в сравнении с пациентами без прогрессии 4,6 пг/мл (3,3 и 6,6) и 3,2 пг/мл (2,3 и 4,6),  $p = 0,046$  и  $p = 0,074$  соответственно (таблица 3). Эти данные позволяют рассматривать IL-1 $\beta$  как возможный прогностический фактор течения заболевания у пациентов с МГНЗ и СП.

Таблица 3 — Содержание цитокинов в сыворотке крови пациентов в зависимости от прогрессии заболевания

Цитокин	Наличие прогрессии		<i>p</i>
	Нет ( <i>n</i> = 84)	Есть ( <i>n</i> = 6)	
Моноклональная гаммапатия неуточненного значения			
IL-2, пг/мл	2,7 (1,8 и 4,1)	3,6 (2,8 и 5,1)	0,177
IL-6, пг/мл	3,7 (2,5 и 6,5)	3,5 (1,3 и 4,2)	0,340
IL-8, пг/мл	15,1 (9,4 и 30,3)	7,5 (5,8 и 9)	<b>0,014*</b>
TNF, пг/мл	6,4 (3,8 и 10,8)	4,9 (4,6 и 6)	0,340
IL-1 $\beta$ , пг/мл	4,6 (3,3 и 6,6)	6,9 (5,4 и 8,5)	<b>0,046*</b>
Множественная миелома			
IL-2, пг/мл	2,9 (2,2 и 3,9)	6,1 (3,2 и 35,1)	<b>0,001*</b>
IL-6, пг/мл	4,3 (2,7 и 8,5)	7,4 (6 и 14)	<b>0,006*</b>
IL-8, пг/мл	12,8 (8,8 и 38,7)	14,2 (9,2 и 37,5)	0,671
TNF, пг/мл	4,9 (3,7 и 7,8)	9,4 (6,9 и 62,1)	<b>0,000*</b>
IL-1 $\beta$ , пг/мл	5,5 (2,8 и 8,3)	6,1 (3,5 и 7,7)	0,694
Солитарная плазмоцитома			
IL-2, пг/мл	3,9 (2,3 и 20,5)	3,8 (2,7 и 4,2)	0,870
IL-6, пг/мл	2,9 (2,1 и 13,8)	3,5 (2,7 и 7)	0,596
IL-8, пг/мл	13,1 (11,2 и 17,5)	9,5 (7,8 и 15,9)	0,391
TNF, пг/мл	6,7 (4,4 и 57,8)	4 (3,8 и 9)	0,142
IL-1 $\beta$ , пг/мл	3,2 (2,3 и 4,6)	5,1 (4 и 8,1)	0,074

\* Различия между группами значимы (критерий Манна – Уитни).

Результаты наших исследований согласуются с подобными, представленными в литературе. Так, в работе М. Portier с соавт. (1991) указано, что опухолевые ПК и опухолевое окружение активно продуцируют IL-1 $\beta$ , IL-6, и TNF- $\alpha$ , которые играют существенную роль в перестройке костной ткани [6]. Также клинические исследования показали, что IL-1 $\beta$  способствует трансформации МГНЗ в тлеющую миелому и в симптоматическую форму ММ. По данным J. A. Lust с соавт. (2016), IL-6 играет существенную роль в развитии и прогрессии ММ, так как способствует стимуляции и пролиферации миеломных клеток и их предшественниц, повышение его уровня может быть связано с присутствием большой опухолевой массы и у пациентов с агрессивным течением [7]. Кроме того, показано, что при миеломе IL-1 $\beta$ , который aberrантно экспрес-

сируется опухолевыми ПК, по-видимому, является одним из основных цитокинов, ответственных за паракринную продукцию IL-6 стромальными клетками костного мозга [7]. В нашей работе уровень IL-6 был также значимо выше у пациентов с прогрессией ММ ( $p = 0,006$ ). В то же время не обнаружено значимых различий в содержании IL-6 в сыворотке крови при прогрессии МГНЗ и СП (таблица 3).

При прогрессировании ММ также были значимо больше уровни IL-2 ( $p = 0,001$ ) и TNF- $\alpha$  ( $p = 0,0001$ ), что не наблюдалось у пациентов с прогрессией МГНЗ и СП. IL-2 участвует не только в пролиферации Т-клеток и дифференцировке В-клеток, но и в развитии злокачественных новообразований из В- и Т-клеток. TNF $\alpha$  играет важную роль во взаимодействии между опухолевыми ПК и клетка-

ми стромы костного мозга и участвует в перестройке костной ткани, что согласуется с результатами нашей работы. В нашем исследовании пациенты с прогрессией ММ и множественными поражениями костей скелета имели значимое превышение уровня TNF- $\alpha$  в сыворотке крови — 5,7 пг/мл (4,18 и 12,07).

Нами было исследовано содержание цитокинов в сыворотке крови у пациентов ММ в зависимости от стадии по классификации ISS. Так, при анализе уровня TNF- $\alpha$  были обнаружены более высокие показатели у пациентов ММ с прогрессией в стадии ISS III (10,5 пг/мл (8,0 и 57,1) в сравнении с пациентами с прогрессией в стадии ISS I/II (16,5 пг/мл (6,9 и 74,3),  $p = 0,002$ ). Также значимо выше был уровень IL-2 у пациентов ММ с прогрессией в стадии ISS III (6,3 пг/мл (3,2 и 43,4) относительно пациентов с прогрессией в стадии ISS I/II (11 пг/мл (3,2 и 32,3),  $p = 0,005$ ). В группе ММ при сравнении сывороточного содержания интерлейкинов в зависимости от стадии ISS у пациентов ISS III выявлено значимое превышение уровней IL-6 ( $p = 0,034$ ), IL-8 ( $p = 0,019$ ) и IL-1 $\beta$  ( $p = 0,033$ ) по отношению к пациентам ISS II. Таким образом, результаты нашего исследования подтверждают, что интерлейкины IL-2, IL-6 и TNF- $\alpha$  являются значимыми факторами, имеющими прогностический потенциал в отношении прогрессии заболевания. Вероятно, этот факт определяет их биологическую роль в пролиферации и стимуляции роста опухолевых клеток при ММ.

Взаимодействие опухолевых ПК и стромальных клеток способствует сверхэкспрессии IL-8. Повышенная продукция IL-8 может приводить к миграции предшественников ПК в область стромы, что сопровождается повышенной секрецией IL-6, и индуцирует активную пролиферацию опухолевых клеток. Мы обнаружили, что содержание IL-8 в сыворотке крови у пациентов с плазмоклеточными новообразованиями во всех изучаемых группах превышало уровень нормы. Однако в нашей работе не была выявлена взаимосвязь уровня IL-8 с прогрессией заболевания при ММ и СП. Более того, у пациентов МГНЗ с прогрессией сывороточное содержание IL-8 было значимо меньше, чем у пациентов без прогрессии, что требует дополнительного изучения.

При использовании ROC-анализа установлено, что уровни сывороточных интерлейкинов были факторами, значимо связанными с прогрессией заболевания. При МГНЗ наиболее значимыми были IL-2 (AUC 0,778;

$p = 0,024$ ), IL-8 (AUC 0,793;  $p = 0,016$ ), IL-1b (AUC 0,748;  $p = 0,045$ ). При ММ наибольшую значимость продемонстрировал IL-6 (AUC 0,703;  $p = 0,018$ ). Для СП в качестве маркера прогрессии может быть рассмотрен IL-1b (AUC 0,796;  $p = 0,064$ ), который был связан с прогрессией на уровне тенденции.

Определяющими факторами, позволяющими отличить симптоматическую миелому от вялотекущей или тлеющей миеломы, является присутствие одного или нескольких CRAB-критериев (анемия, гиперкальциемия, поражение почек, наличие деструктивного синдрома). В данной работе мы проанализировали уровни цитокинов у пациентов ММ в зависимости от выявленных изменений при прогрессии заболевания. Так, у пациентов ММ с анемическим синдромом (Hb < 100 г/л) обнаружено превышение уровня сывороточного IL-6 в 1,8 раза ( $p = 0,006$ ), у пациентов с гиперкальциемией (>3 ммоль/л) содержание IL-6 в сыворотке крови было в 2,4 раза больше ( $p = 0,021$ ) и уровень IL-2 — в 1,9 раза больше ( $p = 0,017$ ), чем у пациентов с нормальными показателями кальция. Наличие деструктивного синдрома у пациентов ММ сопровождалось некоторым превышением уровня IL-8 — 13,78 пг/мл (9,20 и 39,19), в сравнении с пациентами без деструкций — 11,89 пг/мл (8,41 и 38,16), однако различия были не значимыми. Для пациентов ММ поражение почек с развитием почечной недостаточности является частым и неблагоприятным признаком. В нашей работе обнаружено незначимое превышение уровня IL-8 — 15,39 пг/мл (9,21 и 45,40) и TNF- $\alpha$  — 6,38 пг/мл (4,18 и 18,99) у пациентов ММ с почечной недостаточностью при сопоставлении с пациентами без поражения почек — 11,66 пг/мл (8,81 и 37,82) и 4,78 пг/мл (3,62 и 8,28) соответственно. Возможно, в прогрессии данных поражений играют важную роль другие цитокины и хемокины.

К факторам, связанным с прогрессией плазмоклеточных новообразований, относятся высокий уровень ЛДГ, повышение концентрации  $\beta$ 2-микроглобулина и ненормальное соотношение легких цепей иммуноглобулинов. Мы провели исследование уровней цитокинов в зависимости от данных показателей.

В нашей работе у пациентов ММ с высокими значениями ЛДГ (>280 Ед/л) выявлено превышение уровня IL-6 в сыворотке крови в 2,5 раза ( $p = 0,009$ ). У пациентов ММ с концентрацией  $\beta$ 2-микроглобулина более 3 г/л также выявлено увеличение уровня IL-6 в сыворотке крови — в 2,6 раза ( $p < 0,001$ ), что мо-

жет свидетельствовать об участии IL-6 в опухолевой пролиферации. Группа пациентов ММ с ненормальным соотношением легких цепей иммуноглобулинов ( $\kappa/\lambda < 0,1$  и  $> 10$ ) характеризовалась значимым превышением уровней IL-1 $\beta$  в сыворотке крови ( $p = 0,0036$ ), IL-2 ( $p = 0,069$ ) и TNF- $\alpha$  ( $p = 0,043$ ).

При анализе группы пациентов МГНЗ не выявлено значимых различий в уровнях цитокинов в зависимости от наличия изменений концентрации  $\beta$ 2-микроглобулина, содержания ЛДГ, соотношения легких цепей иммуноглобулинов  $\kappa/\lambda$ .

При обследовании пациентов СП выявлены различия уровня IL-6 в сыворотке крови в зависимости от концентрации  $\beta$ 2-микроглобулина у пациентов с прогрессией. При концентрации  $\beta$ 2-микроглобулина более 3 г/л содержание IL-6 в сыворотке крови было значимо больше ( $p = 0,02$ ), что, возможно, отражает активность процесса уже на начальной стадии выявления опухоли.

Также было проведено сопоставление уровней изучаемых цитокинов с показателем воспалительного цитокина — С-реактивного белка (СРБ). СРБ — белок, секретируемый в повышенных количествах гепатоцитами в ответ на продукцию опухолевых цитокинов. Известно, что он участвует в активации опухолевых ПК. В нашем исследовании выявлена значимая прямая корреляция средней силы у пациентов ММ между содержанием СРБ и уровнем в сыворотке крови IL-6 ( $R_s 0,65$ ,  $p < 0,001$ ), IL-1 $\beta$  ( $R_s 0,23$ ,  $p = 0,044$ ) и TNF- $\alpha$  ( $R_s 0,20$ ,  $p = 0,049$ ), у пациентов МГНЗ с уровнем в сыворотке крови IL-6 ( $R_s 0,50$ ,  $p < 0,001$ ), IL-8 ( $R_s 0,27$ ,  $p = 0,010$ ) и TNF- $\alpha$  ( $R_s 0,37$ ,  $p < 0,001$ ), у пациентов СП с уровнем IL-6 в сыворотке крови ( $R_s 0,52$ ,  $p = 0,024$ ). Выявлена положительная корреляция между уровнем СРБ в сыворотке крови и наличием деструктивного синдрома ( $p < 0,001$ ). Следуя этому, можно предположить, что СРБ, как и изучаемые цитокины, может быть связан с опухолевой пролиферацией.

### Список цитированных источников

1. Boccadoro, M. Plasma cell dyscrasias: classification, clinical and laboratory characteristics, and differential diagnosis / M. Boccadoro, A. Pileri // *Baillieres. Clin. Haematol.* — 1995. — Vol. 8, № 4. — P. 705–719.
2. Mansour, A. Emerging Roles of Osteoclasts in the Modulation of Bone Microenvironment and Immune Suppression in Multiple Myeloma / A. Mansour, A. Wakkach, C. Blin-Wakkach // *Front. Immunol.* — 2017. — Vol. 8. — P. 954.
3. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance / R. A. Kyle [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 2006. — Vol. 354, № 13. — P. 1362–1369.
4. Inflammatory markers and development of symptom burden in patients with multiple myeloma during autologous stem cell transplantation / X. S. Wang [et al.] // *Clin. Cancer Res.* — 2014. — Vol. 20, № 5. — P. 1366–1374.

**Заключение.** Наше исследование подтвердило существенную роль цитокинов в качестве прогностических маркеров в прогрессировании плазмоклеточных заболеваний. Мы наблюдали значимое превышение уровней IL-2, IL-6, IL-8 и TNF- $\alpha$  при прогрессии ММ, МГНЗ и СП в сравнении с пациентами без таковой, что может отражать высокую активность опухолевого процесса.

Выявлено значимое превышение уровня IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  у пациентов ММ в стадии ISS III в сравнении с пациентами ISS II. Кроме того, IL-6 был повышен у пациентов с анемическим синдромом, гиперкальциемией и высокими показателями ЛДГ. Из этого следует, что данный цитокин имеет важное значение в прогнозировании развития опухолевого процесса и прогрессии ММ.

Группа пациентов ММ с ненормальным соотношением легких цепей иммуноглобулинов  $\kappa/\lambda$  не отличалась значимым превышением уровней IL-1 $\beta$ , IL-2 и TNF- $\alpha$ .

По результатам нашего исследования определена взаимосвязь IL-8 с литическими поражениями костей и поражением почек у пациентов с ММ, а также с прогрессией заболевания у пациентов МГНЗ.

Выявлена значимая прямая корреляция средней силы у пациентов ММ между содержанием СРБ и уровнем IL-6, IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , у пациентов МГНЗ с уровнем IL-6, IL-8 и TNF- $\alpha$ , у пациентов СП с уровнем IL-6. Выявлена положительная корреляция между уровнем СРБ в сыворотке крови и наличием деструктивного синдрома.

Таким образом, из результатов нашей работы следует, что данные цитокины играют важную роль в патологическом процессе при плазмоклеточных новообразованиях и могут быть использованы как маркеры прогрессии заболевания. Определение уровня IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  в сыворотке крови на этапе первичной диагностики поможет выявить пациентов высокой группы риска для более тщательного наблюдения.

5. Mateos, M. V. High-risk multiple myeloma: how to treat at diagnosis and relapse? / M.-V. Mateos, B. P. Martnez, V. Gonzlez-Calle // Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr. — 2021. — Vol. 2021, № 1. — P. 30–36.
6. In vivo interleukin 6 gene expression in the tumoral environment in multiple myeloma / M. Portier [et al.] // Eur. J. Immunol. — 1991. — Vol. 21, № 7. — P. 1759–1762.
7. Reduction in C-reactive protein indicates successful targeting of the IL-1/IL-6 axis resulting in improved survival in early stage multiple myeloma / J. A. Lust [et al.] // Am. J. Hematol. — 2016. — Vol. 91, № 6. — P. 571–574.

## Serum cytokine levels in plasma cell neoplasms

*Kozich Zh. M.<sup>1</sup>, Martinkov V. N.<sup>1</sup>, Pugacheva J. N.<sup>1</sup>, Korotaeva L. E.<sup>1</sup>,  
Blizin D. A.<sup>1</sup>, Klimkovich N. N.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*State Institution “Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology”,  
Gomel, Republic of Belarus;*

<sup>2</sup>*State Educational Institution “Belarusian Medical Academy for Postgraduate Education”,  
Minsk, Republic of Belarus*

One of the main areas of research of plasma cell dyscrasias is the study of risk factors and molecular progression mechanisms. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) is a benign disease with a risk of progression in various lymphoproliferative diseases 1 % per year. Time to progression of the MGUS is individual and can vary from year to decades. Clear markers of the progression of the MGUS are not currently identified. The processes underlying the progression of solitary plasmacytoma (SP) are also not sufficiently studied. Therefore, the study of the biology of these diseases and the search for additional prognostic markers and risk factors is relevant.

Cytokines play an important role in the formation and regulation of an immune response, are able to stimulate proliferation, differentiation and apoptosis of tumor plasma cells (PC), which determines the prospect of their study in the progression of plasma cell dyscrasias.

The aim of the work was to study the levels of cytokines in blood serum patients with plasma cell dyscrasias and the study of their relationship with other laboratory indicators.

**Materials and Methods:** Cytokines levels were studied in patients with plasma cell dyscrasias (MGUS ( $n = 90$ ), MM ( $n = 101$ ), SP ( $n = 19$ )).

**Results:** We observe a significant excess of the levels of IL2, IL6, TNF- $\alpha$  with progression of MM in comparison MGUS and SP.

A significant excess of the level of IL6 was revealed in MM patients at the stages of ISS II and ISS III and in patients with high levels of LDH, anemic syndrome, hypercalcemia.

An excess of IL8 levels was found in MM patients with bone lesions and kidney damage, as in MGUS with disease progression.

We have revealed a significant excess of the levels of IL1, IL2, TNF- $\alpha$  in MM with  $\kappa/\lambda$ . A significant correlation was revealed in MM patients by levels of IL1, IL6, L8 TNF- $\alpha$ , MGUS — IL6, L8, TNF- $\alpha$ , SP- IL6.

**Conclusion:** Thus, we have shown that these cytokines are associated with the process activity in plasma cell dyscrasias.

**Keywords:** multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, solitary plasmacytoma, cytokines, progression.

*Поступила 27.06.2022*



УДК 611.717

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОСТНОГО ВОЗРАСТА

Багинский В. А., Денисов С. Д.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** В статье представлены результаты оценки степени точности и эффективности клинического применения следующих методов определения костного возраста, наиболее часто применяющихся в клинической практике: Грейлиха — Пайла и различных модификаций метода Таннера — Уайтхауза (TWII (CARPAL), TWII 20 (20 BONE), TWII (RUS), TWIII (RUS)). Авторы заключили, что в сложных клинических случаях целесообразно использовать метод Таннера — Уайтхауза (TWIII (RUS)) в связи с более высокой точностью определения костного возраста, а также возможностью документирования минимальных изменений стадии оссификации костей кисти и дистального отдела предплечья. В рутинной клинической практике для определения костного возраста допустимо использование простого в освоении и наименее трудоемкого метода Грейлиха — Пайла.

**Ключевые слова:** костный возраст, метод Грейлиха — Пайла, метод Таннера — Уайтхауза, созревание скелета, нарушение роста и полового созревания.

**Введение.** Костный возраст является одним из значимых показателей физического и полового развития детей, который объективно отражает процессы роста организма и позволяет оценить уровень полового развития детей и подростков. Определение костного возраста важно для диагностики и лечения заболеваний, сопровождающихся нарушением роста и полового созревания, контроля эффективности лечения эндокринопатий, прогнозирования конечного роста. В ортопедии костный возраст применяется для оценки скорости роста скелета, что имеет значение при определении тактики лечения и времени выполнения оперативных вмешательств у пациентов со сколиозом, кифозом, юношеским эпифизеолизом головки бедра. В судебной медицине костный возраст используется в качестве одного из индикаторов определения хронологического возраста [1, 2].

Для определения костного возраста в клинической практике используются рентгенограммы кисти и лучезапястного сустава в прямой проекции. Костный возраст определяется на основе анализа рентгенограмм с использованием специальных методов. Различные методы определения костного возраста характеризуются разной точностью, сложностью освоения, трудоемкостью [3, 4]. Сложность разработки единой универсальной методики оценки костного возраста обусловлена популяционной изменчивостью формирования центров окостенения, акселерацией, ускорением темпов оссификации скелета у современного поколения детей.

В международной клинической практике для определения костного возраста используются два основных метода: Грейлиха — Пайла (GP, Greulich — Pyle) и Таннера — Уайтхауза (TW, Tanner — Whitehouse).

Метод Грейлиха — Пайла (GP, Greulich, Pyle) основан на сопоставлении рентгенограммы пациента со стандартными снимками из специального атласа. Наиболее часто в международной клинической практике используется второе издание атласа Грейлиха — Пайла (1959 г.). Атлас включает эталонные рентгенограммы детей разного возраста: мужской пол — 31 рентгенограмма, возраст от 3 месяцев до 19 лет, женский пол — 27 рентгенограмм, возраст от 3 месяцев до 18 лет [5].

**Достоинства** метода Грейлиха — Пайла — это простота освоения, малое время анализа рентгенограмм. **Недостатками** данного метода являются: невысокая точность определения костного возраста; высокий уровень вариабельности показателей при оценке разными специалистами; отсутствие модификаций, адаптированных под разные популяции; отсутствие обновлений атласа, которые учитывают особенности развития скелета современного поколения детей.

Метод Таннера — Уайтхауза основан на количественной оценке стадии оссификации 7–20 костей кисти и предплечья в зависимости от модификации. Стадия оссификации определяется путем сопоставления рентгеновского изображения кости с соответствующим описанием, скиаграммой, образцом рентгенограммы

данной кости. Каждой кости присваиваются определенные баллы, которые затем суммируются, итоговый результат сопоставляется с эталонным значением, на основании которого определяется костный возраст.

Метод TWII (CARPAL) внедрен в 1975 г., основан на анализе стадии оссификации семи костей запястья: трапеции, трапециевидной, головчатой, крючковидной, ладьевидной, полулунной, трехгранной.

Метод TWII 20 (20 BONE) внедрен в 1975 г., основан на анализе стадии оссификации семи костей запястья, тринадцати костей предплечья, пясти и пальцев: трапеции, трапециевидной, головчатой, крючковидной, ладьевидной, полулунной, трехгранной, лучевой, локтевой, 1-, 3-, 5-пястных, проксимальных фаланг 1, 3, 5-го пальцев, дистальных фаланг 1, 3, 5-го пальцев, средних фаланг 3-го, 5-го пальцев.

Метод TWII (RUS) внедрен в 1975 г., основан на анализе стадии оссификации тринадцати костей предплечья, пясти и пальцев: лучевой, локтевой, 1-, 3-, 5-пястных, проксимальных фаланг 1, 3, 5-го пальцев, дистальных фаланг 1, 3, 5-го пальцев, средних фаланг 3-го, 5-го пальцев.

Метод TWIII (RUS) внедрен в 2001 г., основан на анализе стадии оссификации тринадцати костей предплечья, пясти и пальцев: лучевой, локтевой, 1-, 3-, 5-пястных, проксимальных фаланг 1, 3, 5-го пальцев, дистальных фаланг 1, 3, 5-го пальцев, средних фаланг 3-го, 5-го пальцев. При расчете костного возраста используется обновленная по сравнению с методом TWII (RUS) шкала, более точно характеризующая темпы оссификации скелета современного поколения детей [6].

*Достоинства* метода Таннера – Уайтхауза заключаются в более высокой точности определения костного возраста и воспроизводимости результатов при проведении исследования разными специалистами. Этот метод сложнее для освоения и требует больше времени для

интерпретации рентгенограммы, чем метод Грейлиха – Пайла.

**Цель работы** — оценка степени точности и эффективности клинического применения метода Грейлиха – Пайла и различных модификаций метода Таннера – Уайтхауза (TWII (CARPAL), TWII 20 (20 BONE), TWII (RUS), TWIII (RUS)) для определения костного возраста детей Республики Беларусь.

**Материалы и методы.** Произведен ретроспективный анализ 305 рентгенограмм кисти и лучезапястного сустава в прямой проекции пациентов Городского клинического центра травматологии и ортопедии УЗ «6-я городская клиническая больница» г. Минска с травматологической патологией, не затрудняющей оценку костного возраста по рентгенограмме.

Костный возраст определялся с использованием метода Грейлиха – Пайла и различных модификаций метода Таннера – Уайтхауза (TWII (CARPAL), TWII 20 (20 BONE), TWII (RUS), TWIII (RUS)).

Разные методы оценки костного возраста имеют различные возрастные ограничения, поэтому некоторые методики применимы только в определенных возрастных диапазонах. Для определения костного возраста с помощью методов Грейлиха – Пайла и модификаций метода Таннера – Уайтхауза (TWII 20 (20 BONE), TWII (RUS)) проанализированы рентгенограммы пациентов мужского пола в возрасте 2–16,9 лет и женского пола в возрасте 2–15,9 лет. Для определения костного возраста с помощью метода Таннера – Уайтхауза TWII (CARPAL) проведен анализ рентгенограмм пациентов мужского пола в возрасте 2–14,9 лет и женского пола в возрасте 2–12,9 лет. Для определения костного возраста с помощью метода Таннера – Уайтхауза TWIII (RUS) проанализированы рентгенограммы пациентов мужского пола в возрасте 2–16 лет и женского пола в возрасте 2–14,9 лет (таблица 1).

Таблица 1 — Распределение пациентов по возрастным группам

Возраст, лет	Мужской пол			Женский пол		
	GP, TWII 20 (20 BONE), TWII (RUS)	TWII (CARPAL)	TWIII (RUS)	GP, TWII 20 (20 BONE), TWII (RUS)	TWII (CARPAL)	TWIII (RUS)
2–2,9	10	5	10	11	11	11
3–3,9	10	10	10	13	13	13
4–4,9	11	11	11	9	9	9
5–5,9	4	4	4	7	7	7
6–6,9	6	6	6	8	8	8

Окончание табл. 1

Возраст, лет	Мужской пол			Женский пол		
	GP, TWII 20 (20 BONE), TWII (RUS)	TWII (CARPAL)	TWIII (RUS)	GP, TWII 20 (20 BONE), TWII (RUS)	TWII (CARPAL)	TWIII (RUS)
7–7,9	8	8	8	8	8	8
8–8,9	6	6	6	6	6	6
9–9,9	11	11	11	9	9	9
10–10,9	17	17	17	11	11	11
11–11,9	12	12	12	17	17	17
12–12,9	20	20	20	9	9	9
13–13,9	15	15	15	11	–	11
14–14,9	11	11	11	21	–	21
15–15,9	7	–	7	10	–	–
16–16,9	7	–	1	–	–	–
Итого	155	136	149	150	108	140

Анализ рентгенограмм проведен с использованием таблиц из руководств Грейлиха – Пайла и Таннера – Уайтхауза.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2016, Statistica 10.0 для Windows (StatSoft Inc., США). Сравнение количественных данных выполняли с применением методов описательной статистики и непараметрических методов. Для определения статистической значимости различий в зависимых выборках использовали критерий Вилкоксона. Статистически значимым считали результат в случае, если вероятность отвергнуть нулевую гипотезу об

отсутствии различий не превышала 5 % ( $p < 0,05$ ).

**Результаты и их обсуждение.** Средний хронологический возраст пациентов мужского пола составил  $9,9 \pm 4,1$  лет; женского пола  $9,5 \pm 4,2$  лет.

В таблицах 2, 3 приведены показатели костного возраста, разности, корреляции между костным и хронологическим возрастом, среднее время анализа одной рентгенограммы, полученные при использовании методов Грейлиха – Пайла (GP) и различных модификаций метода Таннера – Уайтхауза (TWII (CARPAL), TWII 20 (20 BONE), TWII (RUS), TWIII (RUS)) у пациентов мужского и женского пола.

Таблица 2 — Показатели костного и хронологического возраста пациентов мужского пола

Показатель	GP	TWII (CARPAL)	TWII 20 (20 BONE)	TWII (RUS)	TWIII (RUS)
Костный возраст, лет, $m \pm \sigma$	$9,8 \pm 4,5$	$9,3 \pm 4,2$	$9,9 \pm 4,6$	$10,4 \pm 4,7$	$9,8 \pm 4,2$
Разность между костным и хронологическим возрастом, лет, $m \pm \sigma$ , [95% ДИ]	$-0,1 \pm 1$ [-0,3; 0,1]	$-0,5 \pm 1,1$ [-0,7; -0,3]	$0,1 \pm 0,9$ [-0,1; 0,2]	$0,6 \pm 0,8$ [0,5; 0,7]	$-0,1 \pm 0,5$ [-0,1; 0,1]
Размах разности между костным и хронологическим возрастом, лет	-2,8/2,5	-3,6/2	-2,1/3,1	-1,4/3,2	-1,5/1,6
Разность между костным и хронологическим возрастом, стандартная ошибка среднего, лет	0,08	0,09	0,07	0,07	0,04
Коэффициент ранговой корреляции Спирмена между костным и хронологическим возрастом ( $p < 0,001$ )	0,977	0,963	0,982	0,991	0,991
Критерий Вилкоксона, $p$	0,137	<0,001	0,385	<0,001	0,516
Среднее время анализа рентгенограммы, мин	1,5	4	11	7	7

Примечание —  $m$  — среднее арифметическое значение;  $\sigma$  — среднеквадратическое отклонение; 95% ДИ — 95%-й доверительный интервал.

Таблица 3 — Показатели костного и хронологического возраста пациенток женского пола

Показатель	GP	TWII (CARPAL)	TWII 20 (20 BONE)	TWII (RUS)	TWIII (RUS)
Костный возраст, лет, $m \pm \sigma$	$9,7 \pm 4,7$	$8,7 \pm 3,9$	$9,8 \pm 4,7$	$10,3 \pm 4,7$	$9,7 \pm 4,3$
Разность между костным и хронологическим возрастом, лет, $m \pm \sigma$ , [95% ДИ]	$-0,1 \pm 1$ [-0,1; 0,3]	$-0,5 \pm 1$ [-0,7; -0,3]	$0,3 \pm 0,9$ [0,1; 0,4]	$0,8 \pm 0,8$ [0,7; 0,9]	$0,2 \pm 0,6$ [0,1; 0,3]
Размах разности между костным и хронологическим возрастом, лет	-2,9/2,9	-3,5/2,2	-2,4/2,7	-1,1/2,7	-1,7/1,7
Разность между костным и хронологическим возрастом, стандартная ошибка среднего, лет	0,08	0,1	0,07	0,06	0,05
Коэффициент ранговой корреляции Спирмена между костным и хронологическим возрастом ( $p < 0,001$ )	0,981	0,962	0,983	0,985	0,985
Критерий Вилкоксона, $p$	0,261	<0,001	0,001	<0,001	0,002
Среднее время анализа рентгенограммы, мин	1,5	4	11	7	7

Примечание —  $m$  — среднее арифметическое значение;  $\sigma$  — среднеквадратическое отклонение; 95% ДИ — 95%-й доверительный интервал.

Разность между костным возрастом, определенным с помощью методов GP, TWII 20 (20 BONE), TWIII (RUS) и хронологическим возрастом у пациентов мужского пола статистически незначима. У пациенток женского пола разность между костным возрастом, опре-

деленным с помощью методов GP, и хронологическим возрастом статистически незначима.

На рисунках 1–5 показаны диаграммы рассеяния показателей костного возраста, определенного с помощью различных методов, и хронологического возраста.

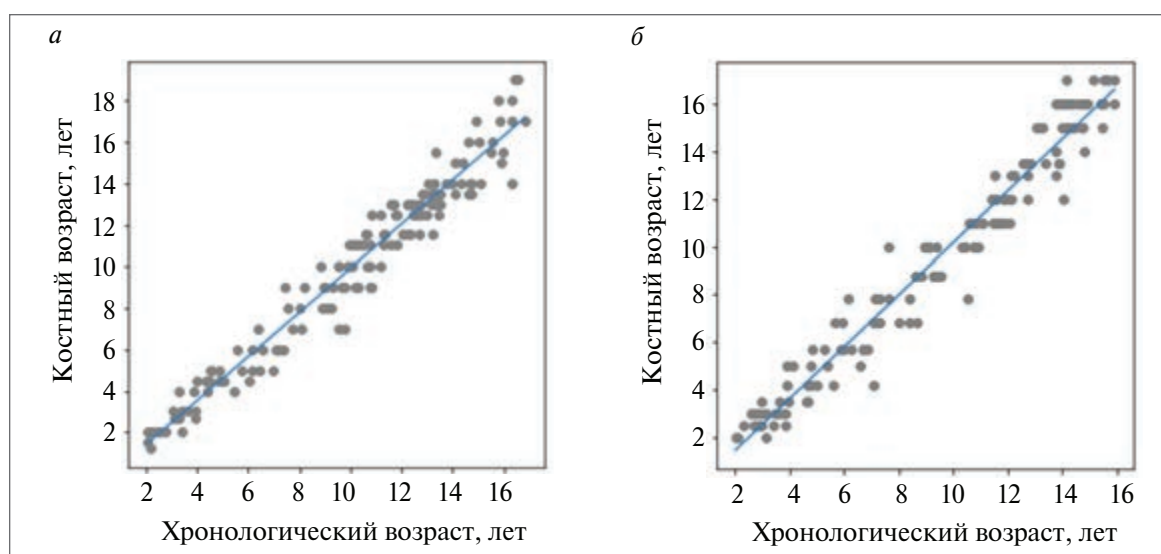
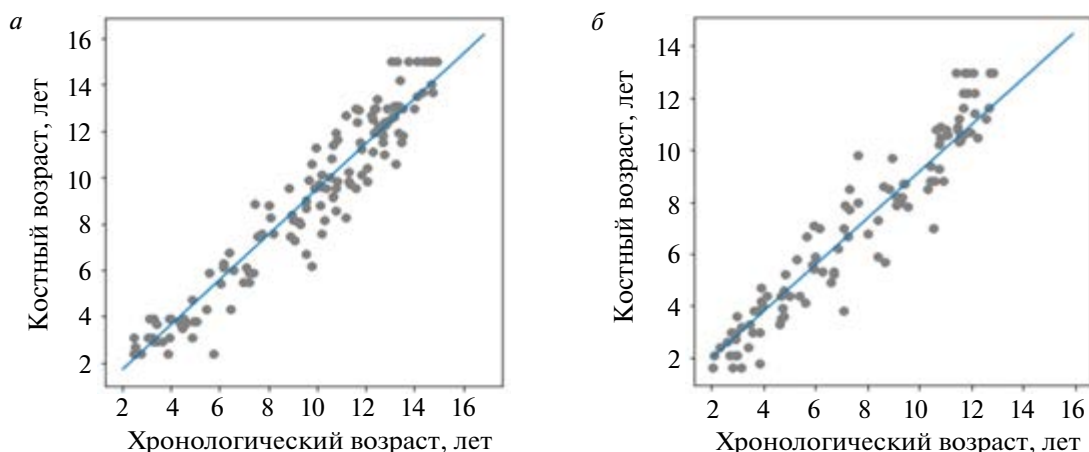


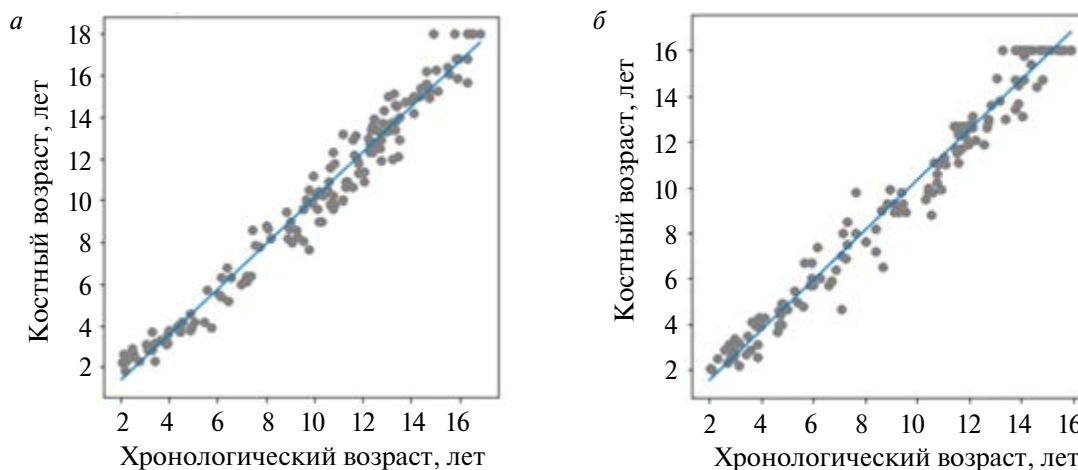
Рисунок 1 — Диаграмма рассеяния показателей костного возраста, определенного методом Грейлиха — Пайла, и хронологического возраста:  
 а — мужской пол GP; б — женский пол GP





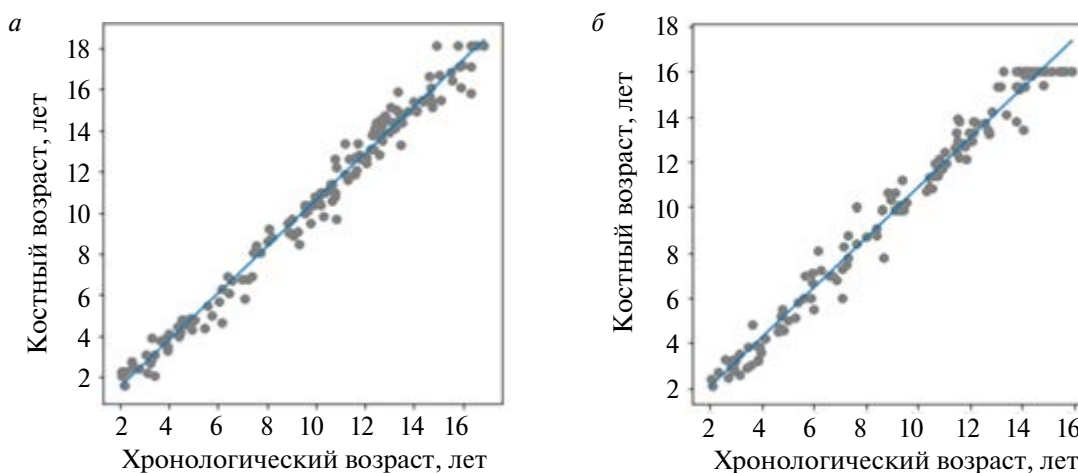
**Рисунок 2 — Диаграмма рассеяния показателей костного возраста, определенного методом TWII (CARPAL), и хронологического возраста:**

*a* — мужской пол; *б* — женский пол



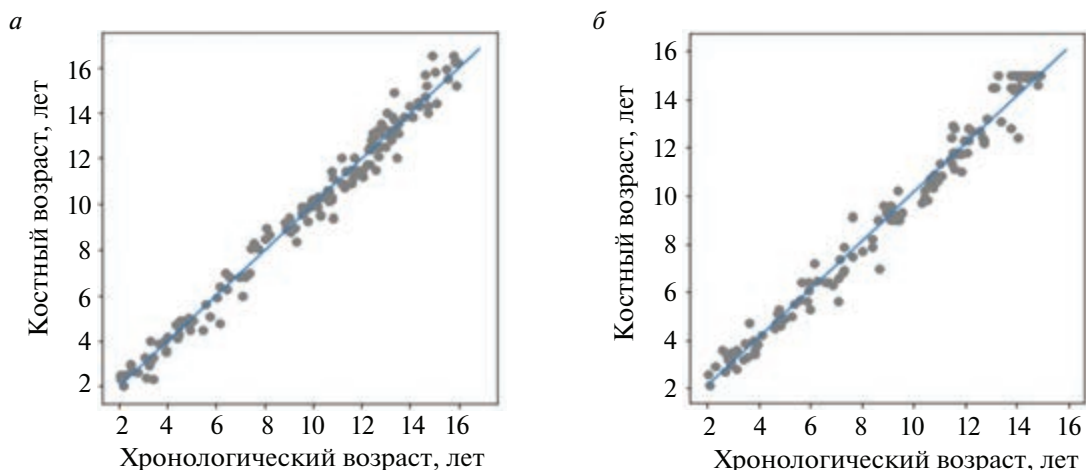
**Рисунок 3 — Диаграмма рассеяния показателей костного возраста, определенного методом TWII 20 (20 BONE), и хронологического возраста:**

*a* — мужской пол; *б* — женский пол

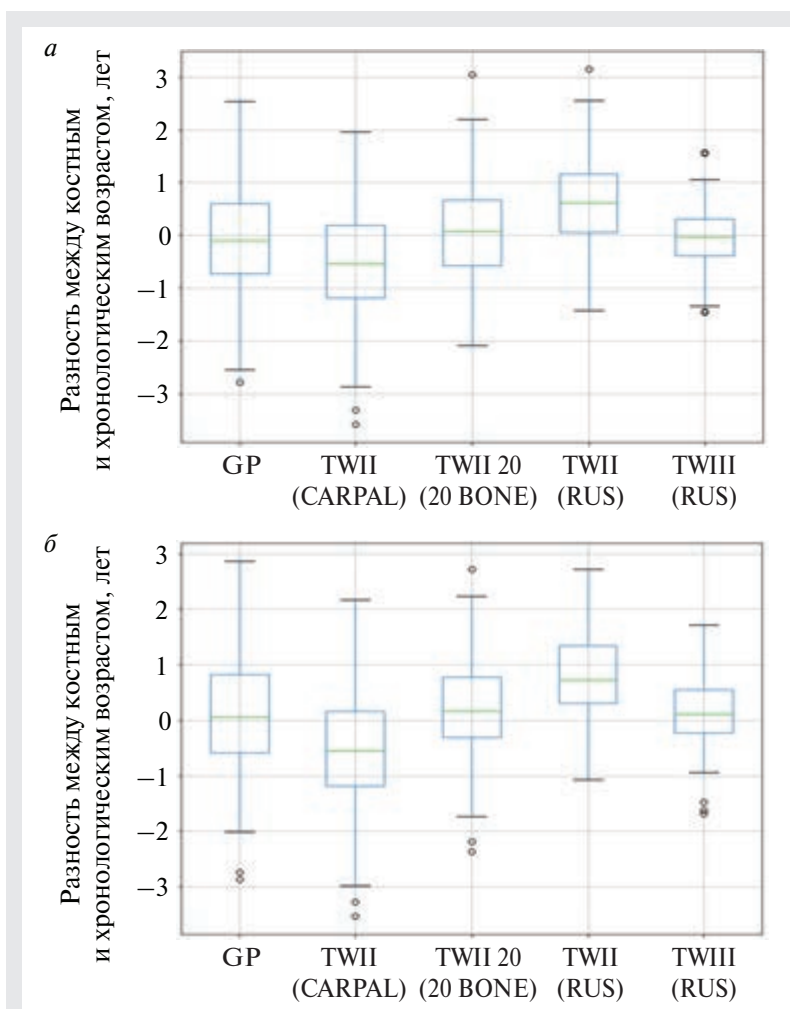


**Рисунок 4 — Диаграмма рассеяния показателей костного возраста, определенного методом TWII (RUS), и хронологического возраста:**

*a* — мужской пол; *б* — женский пол



**Рисунок 5 — Диаграмма рассеяния показателей костного возраста, определенного методом TWIII (RUS), и хронологического возраста:**  
*a* — мужской пол; *б* — женский пол



**Рисунок 6 — Диаграмма размаха показателей разности между костным возрастом, определенным с помощью различных методов, и хронологическим возрастом у пациентов:**  
*a* — мужской пол; *б* — женский пол

На рисунке 6 отображены диаграммы размаха показателей разности между костным возрастом, определенным с помощью различных методов, и хронологическим возрастом у пациентов мужского и женского пола.

Точность определения костного возраста — характеристика качества исследования, отражающая степень совпадения значений костного и хронологического возраста. Скорость оссификации костей отличается у разных популяций, на темпы созревания скелета влияют социально-экономические условия, экологическая обстановка. В норме отклонение костного возраста от хронологического может достигать двух лет в зависимости от возрастной группы, максимальные значения отклонения наблюдаются в пубертатном периоде [7].

Наиболее точным методом определения костного возраста у детей Республики Беларусь является метод Таннера — Уайтхауза (TWIII (RUS)), так как при использовании данной методики наблюдается высокая корреляция, наименьшая стандартная ошибка среднего, а также минимальный размах разности между костным и хронологическим воз-

растом. Преимуществом данного метода является наличие строгих критериев для определения стадии оссификации каждой исследуемой кости, что помогает объективизировать оценку скелетной зрелости. *Недостатком* данного метода является его трудоемкость, поскольку требуется по отдельности анализировать стадию оссификации тринадцати костей. Однако по мере накопления практического опыта скорость интерпретации рентгенограмм возрастает, временные затраты компенсируются более высоким уровнем точности методики.

Метод Таннера — Уайтхауза TWII (RUS)) показал сопоставимую с методом TWIII (RUS) трудоемкость, поскольку количество анализируемых костей и описание стадий оссификации для обоих методик одинаковое. Однако точность определения костного возраста при использовании метода TWII (RUS)) ниже, чем при применении метода TWIII (RUS).

Метод Таннера — Уайтхауза TWII (CARPAL) продемонстрировал наименьшую точность определения костного возраста, что связано с анатомической вариабельностью костей запястья, сложностью интерпретации стадии оссификации данных костей.

Для метода Таннера — Уайтхауза TWII 20 (20 BONE) характерна невысокая точность и наибольшая трудоемкость, так как для оценки костного возраста необходимо проанализировать стадию оссификации двадцати костей (семь костей запястья, а также тринадцать пястных костей и костей пальцев).

Метод Грейлиха — Пайла показал удовлетворительную точность определения костного возраста, а также наименьшую трудоемкость анализа рентгенограмм.

**Заключение.** На основании проведенных исследований и изложенного выше можно сделать следующие выводы:

1. Выявлена высокая достоверная корреляция между хронологическим и костным возрастом, определенным по методам Грейлиха — Пайла и Таннера — Уайтхауза (TWIII (RUS)).

2. Методы Грейлиха — Пайла и Таннера — Уайтхауза (TWIII (RUS)) могут применяться для определения костного возраста у детей, проживающих в Республике Беларусь.

3. Метод Таннера — Уайтхауза (TWIII (RUS)) более сложен в освоении, чем метод Грейлиха — Пайла и требует больше времени на анализ рентгенограмм с целью определения костного возраста.

4. Применение устаревших модификаций метода Таннера — Уайтхауза TWII (CARPAL), TWII 20 (20 BONE), TWII (RUS) в современной клинической практике нецелесообразно в связи с невысокой точностью определения костного возраста.

В рутинной клинической практике допустимо применение метода Грейлиха — Пайла как наиболее простого в освоении и наименее трудоемкого метода определения костного возраста.

В сложных клинических случаях более целесообразно использование метода Таннера — Уайтхауза (TWIII (RUS)) в связи с более высокой точностью определения костного возраста и возможностью документирования минимальных изменений степени оссификации костей.

Для разных методик оценки костного возраста характерна различная точность, поэтому при определении костного возраста целесообразно указывать название применявшегося метода определения костного возраста.

### Список цитированных источников

1. The use of bone age in clinical practice—part 1 / D. D. Martin [et al.] // Hormone research in paediatrics. — 2011. — Т. 76, № 1. — P. 1–9.
2. The use of bone age in clinical practice—part 2 / D. D. Martin [et al.] // Hormone research in paediatrics. — 2011. — Т. 76, № 1. — P. 10–16.
3. Hand X-ray in pediatric endocrinology: Skeletal age assessment and beyond / De V. Sanctis [et al.] // Indian J. of endocrinology and metabolism. — 2014. — Т. 18, № 1. — P. 63.
4. Accuracy of three age determination X-ray methods on the left hand-wrist: a systematic review and meta-analysis / S. Serinelli [et al.] // Legal medicine. — 2011. — Т. 13, № 3. — P. 120–133.
5. Greulich, W. W. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist / W. W. Greulich, S. I. Pyle. — Stanford university press, 1959. — 256 p.
6. Carty, H. Assessment of skeletal maturity and prediction of adult height (TW3 method) : 3 rd. edition / H. Carty // edited by J. M. Tanner, M. J. R. Healy, H. Goldstein, N. Cameron. — London, etc: W. B. Saunders, 2001. — 110 p.
7. Bone age for chronological age determination—statement of the European Society of Paediatric Radiology musculoskeletal task force group / L. S. Ording Myller [et al.] // Pediatric radiology. — 2019. — Т. 49, № 7. — P. 979–982.

## Comparative analysis of methods for bone age determination

*Baginskiy V. A., Denisov S. D.*

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

The article presents the results of the evaluation of the degree of accuracy and clinical effectiveness of the following methods for determining bone age, which are most commonly used in clinical practice: Greulich – Pyle and various modifications of the Tanner – Whitehouse method (TWII (CARPAL), TWII 20 (20 BONE), TWII (RUS), TWIII (RUS)). The authors concluded that the Tanner – Whitehouse method (TWIII (RUS)) is more appropriate in complicated clinical cases due to a higher accuracy of determining bone age, as well as the possibility of documenting minimal changes in the ossification stage of the hand and distal forearm bones. In routine clinical practice, the simple to learn and the least time-consuming Greulich – Pyle method is acceptable for determining bone age.

**Keywords:** bone age, Greulich – Pyle method, Tanner – Whitehouse method, skeletal maturation, impairment of growth and puberty.

*Поступила 16.07.2022*

УДК 611.714

## ТОПОГРАФИЧЕСКАЯ АНАТОМИЯ И МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАРУЖНЫХ И ВНУТРЕННИХ СОСЦЕВИДНЫХ ОТВЕРСТИЙ

*Татур А. А.<sup>1</sup>, Денисов С. Д.<sup>2</sup>, Лёвина Д. И.<sup>3</sup>*

*<sup>1</sup> Государственное учреждение «Республиканский центр медицинской реабилитации и бальнеолечения», г. Минск, Республика Беларусь;*

*<sup>2</sup> Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь;*

*<sup>3</sup> Государственное учреждение «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Сосцевидные отверстия височной кости изучены методом рентгеновской компьютерной томографии. Получены новые данные о частоте обнаружения, форме, размерах, топографии, половых особенностях, симметрии (асимметрии) сосцевидных отверстий и их взаимоотношениях с сигмовидным синусом. Показаны возможности прижизненной предоперационной их оценки анатомических характеристик методом компьютерной томографии в режиме костного окна при помощи программного комплекса 3DSlicer.

**Ключевые слова:** наружное сосцевидное отверстие, внутреннее сосцевидное отверстие, клиническая анатомия, компьютерная томография.

**Введение.** Сосцевидное отверстие (*foramen mastoideum*) впервые описал W. L. Gruber в 1875 г. [1]. Исследователи уделяют внимание только отверстиям на наружной поверхности черепа, какой-либо информации об отверстиях на внутренней поверхности черепа в современной литературе нет. Однако в нашей предыдущей работе [2] было продемонстрировано, что они соединяются между собой четко видимым на КТ-исследовании костным каналом.

В некоторых работах выполнены их линейные измерения, попытка описания топографии предпринята только в одной работе [3], при этом в качестве ориентира использовалась линия, проведенная на цифровых фотографиях от астириона до верхушки сосцевидного отростка без учета естественной кривизны черепа.

Недостаточную изученность сосцевидных отверстий можно объяснить тем, что исследо-



вание таких малых и непостоянных структур классическими анатомическими методами на трупном либо костном материале имеет ряд ограничений. Однако в настоящее время альтернативой исследованиям на трупном материале является использование рентгенологических методов [4].

**Цель работы** — изучение закономерностей строения и топографии сосцевидных отверстий на компьютерных томограммах черепа человека.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 136 случайных томограммах черепа с толщиной среза 1 мм, выполненных на компьютерном томографе Toshiba Aquilion в ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии».

Томограммы для исследования отбирались по следующим критериям: 1) отсутствие артефактов при исследовании, вызванных движениями пациента; 2) отсутствие костных дефектов в зоне сканирования; 3) отсутствие выраженного отека головного мозга, сопровождающегося дислокацией срединных структур; 4) отсутствие объемных процессов различной этиологии в области исследования. По этим критериям из 136 томограмм отобрано 90.

Топография сосцевидных отверстий изучалась в режиме костного окна при помощи программного комплекса 3DSlicer по разработанной нами методике [5].

Суть методики состоит в измерении удаленности наружных (рисунок 1, точка 1) и внутренних (рисунок 1, точка 2) сосцевидных отверстий от двух установленных базовых линий:

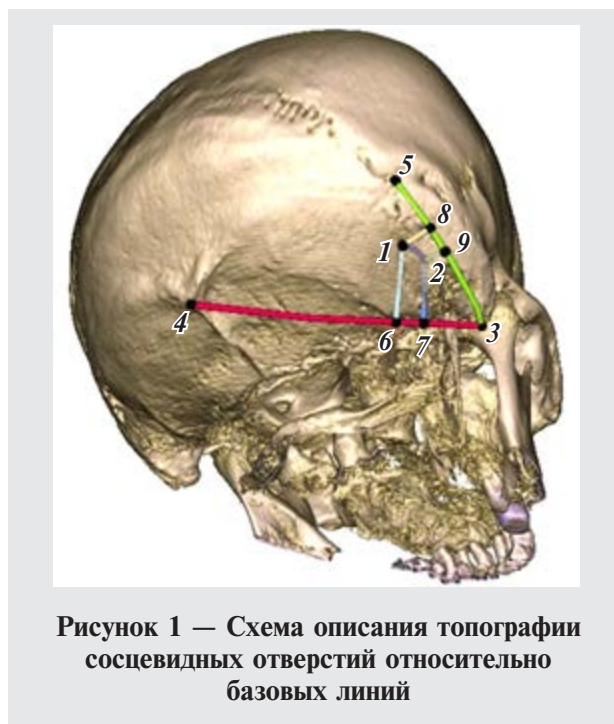
базовая линия 1 (рисунок 1, линия 3–4) — линия, соединяющая верхушку сосцевидного отростка (рисунок 1, точка 3) и инион (рисунок 1, точка 4);

базовая линия 2 (рисунок 1, линия 3–5) — линия, соединяющая верхушку сосцевидного отростка и астирион (рисунок 1, точка 5).

Для описания топографии сосцевидных отверстий взяты именно эти две базовые линии, так как костные ориентиры для их построения легко определяются (пальпируются) у живого человека. Например, перед операцией, зная закономерности топографии сосцевидных отверстий, можно с большой вероятностью прижизненно определить их локализацию у конкретного пациента.

Относительно указанных двух базовых линий проведены измерения 8 параметров:

параметр 1 (рисунок 1, линия 1–6) — перпендикуляр от нижнего края наружного сосцевидного отверстия к базовой линии 1;



**Рисунок 1 — Схема описания топографии сосцевидных отверстий относительно базовых линий**

параметр 2 (рисунок 1, линия 2–7) — перпендикуляр от нижнего края внутреннего сосцевидного отверстия к базовой линии 1;

параметр 3 (рисунок 1, линия 1–8) — перпендикуляр от латерального края наружного сосцевидного отверстия к базовой линии 2;

параметр 4 (рисунок 1, линия 2–9) — перпендикуляр от латерального края внутреннего сосцевидного отверстия к базовой линии 2;

параметр 5 (рисунок 1, линия 3–6) — линия, проведенная от верхушки сосцевидного отростка к месту пересечения базовой линии 1 с перпендикуляром от наружного сосцевидного отверстия;

параметр 6 (рисунок 1, линия 3–7) — линия, проведенная от верхушки сосцевидного отростка к месту пересечения базовой линии 1 с перпендикуляром от внутреннего сосцевидного отверстия;

параметр 7 (рисунок 1, линия 3–8) — линия, проведенная от верхушки сосцевидного отростка к месту пересечения базовой линии 2 с перпендикуляром от наружного сосцевидного отверстия;

параметр 8 (рисунок 1, линия 3–9) — линия, проведенная от верхушки сосцевидного отростка к месту пересечения базовой линии 2 с перпендикуляром от внутреннего сосцевидного отверстия.

Кроме отношения к базовым линиям при описании топографии сосцевидных отверстий, мы исследовали удаленность этих отверстий относительно сигмовидного синуса, проводя

перпендикуляр от латерального края отверстия до края синуса для внутреннего отверстия и до края проекции синуса на поверхность черепа для наружного.

Сосцевидные отверстия обычно имеют овальную (эллипсовидную) форму. Поэтому их размеры оценивались по линейным характеристикам — большому диаметру (размер 1) и малому диаметру (размер 2), а также по площади, вычисляемой по формуле площади эллипса.

Статистический анализ результатов исследования проведен с использованием Statistica 10. Проверка данных на нормальность распределения осуществлялась при помощи критерия Шапиро — Уилка. Данные описательной статистики указаны в виде медианы (Me) и квартилей (процентиль 25% —  $q_1$ , процентиль 75% —  $q_3$ ). Сравнение двух независимых нормально распределенных выборок проводилось при помощи  $t$ -теста, в остальных случаях — при помощи двустороннего теста Манна — Уитни с поправкой Бонферрони. Для сравнения двух зависимых выборок применялся тест Вилкоксона. Для

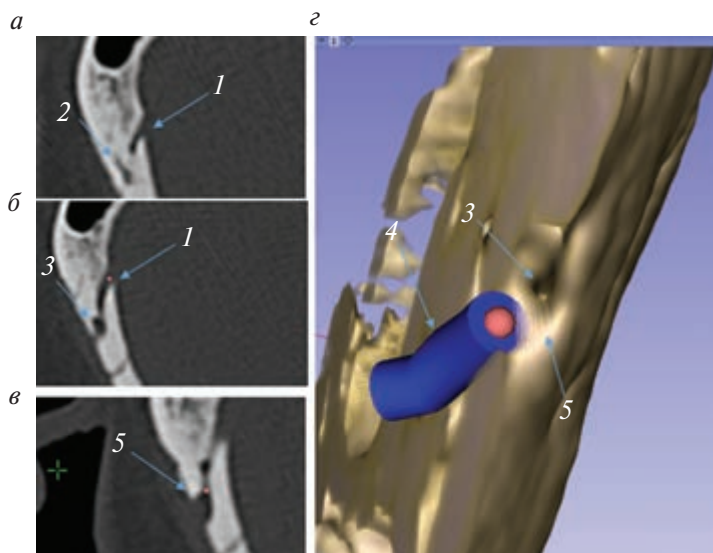
сравнения частот признаков в различных группах применялся критерий Пирсона  $\chi^2$  с поправкой Пирсона. Статистически значимым считали результат в случае, если вероятность того, что нулевая гипотеза об отсутствии различий верна, не превышала 5 % ( $p < 0,05$ ).

**Результаты и их обсуждение.** *Наружные сосцевидные отверстия.* На 90 компьютерных томограммах наружное сосцевидное отверстие выявлено в 84 случаях (93,3 %): с двух сторон в 58 случаях (64,4 %), только слева — в 11 случаях (12,2 %), только справа — в 15 случаях (16,7 %).

Количество наружных сосцевидных отверстий на одной височной кости варьирует от 1 до 4. Чаше выявляются одиночные отверстия — 55,6 %, множественные (2–4) в 44,4 %. Множественные наружные сосцевидные отверстия статистически достоверно ( $\chi^2 = 6,45$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,011$ ) выявляются чаще у мужчин (52,6 %), чем у женщин (38,8 %). Более подробная информация по распределению отверстий в выборке представлена в таблице 1.

Таблица 1 — Количество наружных сосцевидных отверстий в исследованной выборке

Показатель	Вся выборка					Мужчины					Женщины				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Количество отверстий	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Слева	17	41	18	12	2	9	15	8	5	2	8	26	10	7	0
Справа	21	38	21	7	3	12	12	8	5	2	9	26	13	2	1



**Рисунок 2 — Иллюстрация варианта расположения наружного сосцевидного отверстия на поверхности черепа:**  
*а, б, в* — аксиальные срезы КТ-исследования; *г* — компьютерная 3D-реконструкция; *1* — сосцевидный канал; *2* — диплоический канал; *3* — место слияния диплоического и сосцевидного каналов; *4* — сосцевидный канал; *5* — углубление на поверхности черепа

В области наружного сосцевидного отверстия поверхность черепа гладкая (84,2 %) либо имеет углубление (15,8 %), в пределах которого находится наружное сосцевидное отверстие, а также отверстия диплоических каналов (рисунок 2).

*Внутренние сосцевидные отверстия.* Во всех случаях, когда на черепе обнаруживаются наружные сосцевидные отверстия, обнаруживаются и внутренние. Как и наружные сосцевидные отверстия, внутренние могут быть одиночными и множественными, однако их не бывает больше 2. Одиночным это отверстие было в 136 случаях (95,8 %), двойным в 6 случаях (4,2 %).

Более подробная информация по распределению отверстий в выборке представлена в таблице 2.

*Размеры сосцевидных отверстий.* Результаты измерений наружных и внутренних отверстий приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 2 — Количество внутренних сосцевидных отверстий в исследованной выборке

Показатель	Вся выборка			Мужчины			Женщины		
	0	1	2	0	1	2	0	1	2
Количество отверстий	0	1	2	0	1	2	0	1	2
Слева	17	70	3	9	29	1	8	41	2
Справа	21	66	3	11	26	2	10	40	1

Таблица 3 — Линейные размеры наружных сосцевидных отверстий, мм

Показатель	Me ( $q_1, q_3$ )	Min	Max	Статистическая значимость различий
Размер 1				
Слева	1,57 (1,09; 2,14)	0,55	5,45	$t = 0,51; p = 0,61$
Справа	1,54 (1,06; 2,03)	0,57	6,03	
Мужчины (слева)	1,6 (1,18; 2,17)	0,55	4,53	$t = 0,21; p = 0,83$
Женщины (слева)	1,51 (1,08; 2,14)	0,59	5,45	
Мужчины (справа)	1,48 (0,97; 1,96)	0,57	6,03	$t = -0,63; p = 0,53$
Женщины (справа)	1,62 (1,19; 2,1)	0,64	4,3	
Размер 2				
Слева	1,4 (1,05; 1,96)	0,51	4,21	$t = 0,57; p = 0,57$
Справа	1,39 (1,02; 2,05)	0,39	3,96	
Мужчины (слева)	1,38 (1,03; 1,9)	0,52	4,21	$t = -0,25; p = 0,8$
Женщины (слева)	1,41 (1,05; 2,07)	0,51	4,06	
Мужчины (справа)	1,39 (0,99; 1,9)	0,39	3,48	$t = -0,62; p = 0,53$
Женщины (справа)	1,36 (1,05; 2,1)	0,76	3,96	

Таблица 4 — Линейные размеры внутренних сосцевидных отверстий, мм

Показатель	Me ( $q_1, q_3$ )	Min	Max	Статистическая значимость различий
Размер 1				
Слева	1,82 (1,26; 2,69)	0,65	6,73	$t = 0,1; p = 0,92$
Справа	1,89 (1,4; 2,56)	0,55	4,81	
Мужчины (слева)	1,86 (1,24; 3,13)	0,65	6,73	$t = 0,12; p = 0,27$
Женщины (слева)	1,72 (1,28; 2,36)	0,65	3,71	
Мужчины (справа)	1,72 (1,44; 2,24)	0,55	4,24	$t = -1,12; p = 0,26$
Женщины (справа)	1,96 (1,36; 2,81)	0,78	4,81	
Размер 2				
Слева	1,82 (1,16; 2,73)	0,48	5,75	$t = 0,89; p = 0,37$
Справа	1,68 (1,19; 2,47)	0,42	5,98	
Мужчины (слева)	1,93 (1,29; 2,9)	0,48	4,87	$t = 0,62; p = 0,53$
Женщины (слева)	1,74 (1,1; 2,55)	0,61	5,75	
Мужчины (справа)	1,59 (1,17; 2,35)	0,46	3,89	$t = -0,72; p = 0,47$
Женщины (справа)	1,69 (1,32; 2,54)	0,42	5,98	

Как видно из представленных таблиц, линейные размеры как наружных, так и внутренних сосцевидных отверстий не имеют статистически достоверных индивидуальных и половых отличий. Нет существенных отличий и в размерах сосцевидных отверстий на правой и ле-

вой стороне. Однако отмечается значительное превосходство линейных размеров внутренних сосцевидных отверстий над наружными.

На основании линейных размеров сосцевидных отверстий по формуле площади эллипса вычислена их площадь (таблицы 5 и 6).

Таблица 5 — Площадь наружных сосцевидных отверстий, мм<sup>2</sup>

Показатель	Me ( $q_1$ , $q_3$ )	Min	Max	Статистическая значимость различий
Слева	1,78 (0,9; 3,28)	0,32	15,75	$U = 6616,5$ $Z = 0,42$ $p = 0,67$
Справа	1,65 (0,97; 3,11)	0,17	13,7	
Мужчины (слева)	1,78 (0,88; 3,25)	0,32	12,94	$U = 1806,5$ $Z = 0,01$ $p = 0,99$
Женщины (слева)	1,62 (0,9; 3,45)	0,37	15,75	
Мужчины (справа)	1,59 (0,8; 2,97)	0,17	13,7	$U = 1470$ $Z = -0,64$ $p = 0,52$
Женщины (справа)	1,65 (1,06; 3,09)	0,46	12,56	

 Таблица 6 — Площадь внутренних сосцевидных отверстий, мм<sup>2</sup>

Показатель	Me ( $q_1$ , $q_3$ )	Min	Max	Статистическая значимость различий
Слева	2,57 (1,19; 5,74)	0,24	24,04	$U = 2633,5$ $Z = 0,28$ $p = 0,78$
Справа	2,74 (1,42; 4,14)	0,25	16,95	
Мужчины (слева)	3,09 (0,98; 6,86)	0,24	24,04	$U = 639$ $Z = 0,61$ $p = 0,54$
Женщины (слева)	2,42 (1,31; 4,33)	0,31	12,2	
Мужчины (справа)	2,61 (1,56; 4,13)	0,25	9,11	$U = 544$ $Z = -0,91$ $p = 0,36$
Женщины (справа)	2,88 (1,27; 4,38)	0,31	16,95	

Медиана площади наружных сосцевидных отверстий слева и справа составила 1,78 мм<sup>2</sup> и 1,65 мм<sup>2</sup> соответственно, внутренних — 2,57 и 2,74 мм<sup>2</sup> соответственно. Таким образом, размеры (площадь) внутренних сосцевидных отверстий на обеих сторонах статистически достоверно ( $p < 0,05$ ) больше, чем наружных. Однако наружные сосцевидные отверстия примерно в половине случаев имеют множественный характер, поэтому правильнее сравнивать не размеры отдельных взятых отверстий, а медианы сумм площадей всех сосцевидных отверстий (основных и дополнительных) на наружной и внутренней поверхности черепа. Другими словами, сравнивать следует не отдельные сосцевидные отверстия, а сумму площади всех отверстий, составляющих вход в сосцевидный канал или выход из него. При таком сравнении в целом по выборке площадь составила для наружных отверстий — 3,2(1,39; 5,47) мм<sup>2</sup> и для внутренних — 2,85 (1,57; 4,68) мм<sup>2</sup>. Статистический анализ показал отсутствие достоверной разницы этих размеров ( $p > 0,05$ ).

*Топография сосцевидных отверстий.* Сосцевидные отверстия во всех случаях располагаются выше базовой линии 1 — линии, соединяющей верхушку сосцевидного отростка с точкой

инион. Относительно базовой линии 2, соединяющей верхушку сосцевидного отростка с точкой астрион, в большинстве случаев (81,2 %) наружные отверстия расположены ниже, в 42 случаях (17,9 %) выше этой линии, а в 2 случаях (0,9 %) непосредственно в проекции этой линии.

Поскольку не выявлено различий между левой и правой сторонами, мы проводили оценку топографии сосцевидных отверстий путем измерения параметров в целом по выборке по схеме [параметр №: минимум-максимум, медиана; медиана в подгруппе мужчин, в подгруппе женщин, статистическая значимость различий между подгруппами мужчин и женщин]:

параметр 1: 8,12–43,42 мм, 22,42 (17,49; 27,93) мм; 24,47 (20,5; 31,36) мм, 20,84 (16,6; 24,46) мм;  $p = 0,0001$ ,  $t = 3,81$ ;

параметр 2: 9,56–36,11 мм, 20,78 (17,4; 23,67); 22,05 (19,03; 24,98) мм, 19,48(16,52; 22,9) мм;  $p = 0,0009$ ,  $t = 3,37$ ;

параметр 3: –13,24–25,67 мм, 6,65(2,38; 10,54) мм; 6,46 (2,02; 11,0), 6,85 (2,71; 10,48);  $U = 6518$ ,  $Z = -0,49$ ,  $p = 0,62$ ;

параметр 4: 5,05–11,64 мм, 9,3 (8,01; 10,99) мм; 10,33 (8,68; 11,72) мм, 8,72 (7,6; 10,44) мм;  $p = 0,0004$ ,  $U = 1725,5$ ,  $Z = 3,57$ ;



параметр 5: 12,71–43,28 мм, 26,24 (23,16; 29,28) мм; 27,51 (25,01; 30,99) мм, 24,9 (21,5; 28,19) мм;  $p = 0,0000001$ ,  $t = 5,38$ ;

параметр 6: 9,28–32,76 мм, 18,74 (15,8; 21,52) мм; 21,12 (17,44; 23,99) мм, 17,43 (15,17; 19,71) мм;  $p = 0,000009$ ,  $U = 1502$ ,  $Z = 4,44$ ;

параметр 7: 16,17–56,38 мм, 35,82 (31,14; 41,35 мм); 39,8 (34,95; 45,03) мм, 33,47 (30,13; 38,01);  $p = 0,000000001$ ,  $U = 3461,5$ ,  $Z = 6,43$ ;

параметр 8: 15,65 — 47,71 мм, 29,3 (25,38; 33,73) мм; 32,52 (27,77; 35,58), 27,71 (24,27; 31,5);  $p = 0,0000003$ ,  $t = 5,37$ .

Как видно из результатов измерений, значения параметров отличаются значительной разницей, порой достигающей 40 мм, что говорит о большой вариабельности положения отверстий. Также можно отметить гендерные отличия: медианы всех параметров, кроме 3-го, достоверно выше в группе мужчин.

*Взаимоотношение сосцевидных отверстий к сигмовидному синусом.* Внутренние сосцевид-

ные отверстия располагаются либо непосредственно в проекции сигмовидного синуса, либо у его заднего края. Наружные сосцевидные отверстия располагаются не в проекции сигмовидного синуса, а на некотором расстоянии от его заднего края. Таким образом, направление хода сосцевидного канала можно определить как косое по отношению к наружной поверхности черепа: снаружи — внутрь, сзади — наперед. При этом канал имеет примерно горизонтальное положение. Так как почти в половине случаев наружные сосцевидные отверстия бывают множественными (до 4), то в интересах задач интраоперационной навигации, мы изучили удаленность каждого из этих отверстий от края сигмовидного синуса. В зависимости от удаленности отверстий по отношению к краю сигмовидного синуса мы их пронумеровали — 1-е отверстие расположено наиболее близко, 2-е чуть дальше и т. д. (таблица 7).

Таблица 7 — Удаленность наружных сосцевидных отверстий от сигмовидного синуса в зависимости от их количества, мм

Количество наружных отверстий	Me (q1, q3)	Min	Max
Одно	6,1 (4,21; 8,95)	-2,66	17,4
Два:	6,24 (4,22; 8,75)	-1,67	18,9
1-е	4,34 (2,68; 6,3)	-1,67	9,8
2-е	8,2 (6,07; 11,22)	3,1	18,9
Три:	4,68 (1,37; 8,16)	-7,68	14,71
1-е	1,91 (0,49; 3,41)	-7,68	8,0
2-е	4,68 (2,04; 6,96)	-6,39	9,91
3-е	8,42 (5,54; 11,71)	-0,45	14,71
Четыре:	5,4 (1,67; 8,41)	-1,65	14,61
1-е	1,56 (-0,39; 4,68)	-1,65	6,02
2-е	4,27 (-0,12; 7,19)	-0,99	7,56
3-е	6,75 (4,69; 8,63)	4,64	9,87
4-е	10,14 (5,46; 10,86)	5,34	14,61

Как видно из представленной таблицы, удаленность от края синуса сильно варьирует в зависимости от числа отверстий и отмечается закономерность — чем больше наружных сосцевидных отверстий, тем ближе к сигмовидному синусу расположено первое из них.

Таким образом, методом компьютерной томографии в режиме костного окна при помощи программного комплекса 3DSlicer сосцевидные отверстия выявляются на наружной и внутренней поверхности сосцевидного отростка височной кости. Исследуя томограммы, можно достоверно оценить их анатомические характеристики (форму, размеры, отношение к сигмовидному синусу и костным ориентирам

черепа). Содержимое отверстий данным методом не визуализируется.

Наши данные о частоте встречаемости наружных сосцевидных отверстий и их размерах сопоставимы с данными литературы [3] и мало от них отличаются. По нашим данным наружное сосцевидное отверстие встречается в 93,3 %, по данным литературы — в 98 %. Диаметр отверстий по нашим данным — от 0,51 до 6,03 мм, по данным литературы — от 1,1 до 5,6 мм.

Сосцевидные отверстия, и внутреннее и наружное, имеют овальную (эллипсоидную) форму, поэтому линейные размеры сосцевидных отверстий следует оценивать по двум диаметрам — большому и малому, а площадь опре-

делять не по формуле площади круга, а по формуле площади эллипса.

Линейные размеры и площадь сосцевидных отверстий не имеют существенных отличий у мужчин и женщин, на правой и левой сторонах.

Внутреннее сосцевидное отверстие находится в проекции сигмовидного синуса, так как сосцевидная эмиссарная вена впадает в этот синус. Наружные сосцевидные отверстия, сколько бы их ни было, находятся вне проекции сигмовидного синуса, кзади от него в большинстве случаев (91,5 %). Следовательно, при манипуляциях в области наружных сосцевидных отверстий повреждение сигмовидного синуса маловероятно.

На внутренней поверхности черепа в большинстве случаев (95,8 %) сосцевидное отверстие одиночное, а на наружной практически в половине случаев (44,4 %) — множественное (до 4). При этом площадь внутреннего отверстия примерно равна сумме площади наружных отверстий. Таким образом, площадь сечения канала на всем протяжении, от входа до выхода, примерно одинакова. Это позволяет предполагать возможность беспрепятственного движения крови по эмиссарной вене сосцевидного канала в обоих направлениях — как из полости черепа наружу, так и наоборот, снаружи в полость черепа.

Не все отверстия, находящиеся рядом с наружным сосцевидным отверстием, имеют отношение к сосцевидному каналу. Часть из них является отверстиями диплоических каналов, через которые диплоические вены впадают в наружные вены головы.

**Заключение.** На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Методом компьютерной томографии наружные и внутренние сосцевидные отверстия выявляются в 93,3 % случаев.

2. Внутреннее сосцевидное отверстие чаще бывает одиночным (95,8 %), редко двойным (4,2 %).

3. Наружное сосцевидное отверстие примерно одинаково часто бывает одиночным (55,6 %) или множественным — от 2 до 4 отверстий (44,4 %).

4. Площадь (размеры) наружных и внутренних сосцевидных отверстий примерно одинаковы.

5. Множественные наружные сосцевидные отверстия чаще встречаются у мужчин — 52,6 %, чем у женщин — 38,8 % ( $\chi^2 = 6,45$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,011$ ).

6. В 15,8 % случаев рядом с наружным сосцевидным отверстием на наружной поверхности черепа открываются диплоические каналы.

7. Внутреннее сосцевидное отверстие расположено непосредственно над сигмовидным синусом (45,9 %) или у его края (54,1 %).

8. Наружное сосцевидное отверстие чаще (91,5 %) располагается кзади проекции сигмовидного синуса.

9. Чем больше число наружных сосцевидных отверстий, тем ближе к сигмовидному синусу расположено первое из них.

10. Наружное сосцевидное отверстие расположено выше базовой линии 1, соединяющей верхушку сосцевидного отростка с точкой инион. Относительно базовой линии 2, соединяющей верхушку сосцевидного отростка с точкой астрион, наружное сосцевидное отверстие в 81,2 % расположено ниже этой линии, в 18,8 % случаев находится выше или непосредственно на этой линии.

11. По костным ориентирам, которые легко определяются (пальпируются) у живого человека, применяя базовые линии перед операцией можно с большой вероятностью прижизненно определить локализацию сосцевидных отверстий.

### Список цитированных источников

1. Reis, C. The Anatomy of the Mastoid Emissary Vein and the Venous System of the Posterior Neck Region: Neurosurgical Implications / C. Reis, V. Deshmukh, P. Deshmukh // *Skull. Base.* — 2007. — Vol. 61, № 5. — P. 193–200.
2. Татур, А. А. Клиническая анатомия теменных и сосцевидных каналов черепа взрослого человека / А. А. Татур, С. Д. Денисов, Д. И. Лёвина // *Инновации и актуальные проблемы морфологии [Электронный ресурс]: сб. науч. ст., посвящ. 100-летию каф. норм. анатомии УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Респ. Беларусь, окт. 2021 г. / под общ. ред. Н. А. Трушель.* — Минск: БГМУ, 2021. — Вып. 10. — С. 309–312. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
3. Clinical anatomy of the mastoid and occipital emissary veins in a large series / R Louis [et al.] // *Surg. Radiol. Anat.* — 2009. — Vol. 31. — P. 139–144.
4. Three-dimensional imaging and osteometry of adult human skulls using helical computed tomography / M. Nagashima [et al.] // *Surg. Radiol. Anat.* — 1998. — Vol. 20, № 4. — P. 291–297.

5. Татур, А. А. Применение метода компьютерной томографии для изучения топографии теменных и сосцевидных отверстий на наружной поверхности черепа взрослого человека / А. А. Татур, С. Д. Денисов, Д. И. Лёвина // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: рецензир. сб. науч. трудов. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Бел. гос. мед. ун-т; редкол.: С. П. Рубникович, В. Я. Хрыщанович. — Минск : БГМУ, 2020. — Вып. 10. — С. 403–410.

## Topographic anatomy and morphometric characteristics of the external and internal mastoid foramens

*Tatur A.<sup>1</sup>, Denisov S.<sup>2</sup>, Levina D.<sup>3</sup>*

*<sup>1</sup> State Institution “Republican Center for Medical Rehabilitation and Balneotherapy”, Minsk, Republic of Belarus;*

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

*<sup>3</sup> State Institution “Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology”, Minsk, Republic of Belarus*

The mastoid foramen of the temporal bone was studied by X-ray computed tomography. New data on the frequency of detection, shape, size, topography, gender, symmetry (asymmetry) of the mastoid foramina and their relationship with the sigmoid sinus have been obtained. The perspectives of intravital preoperative assessment of their anatomical characteristics by computed tomography in the bone window mode using the 3DSlicer software package are shown.

**Keywords:** external mastoid opening, internal mastoid opening, clinical anatomy, computed tomography.

*Поступила 28.06.2022*

УДК 618.3/.5-06:616-053.13-007.61]-084-037

## ТРЕХЭТАПНАЯ МОДЕЛЬ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ФЕТАЛЬНОЙ МАКРОСОМИИ

*Виктор С. А.<sup>1</sup>, Курлович И. В.<sup>1</sup>, Вацилина Т. П.<sup>1</sup>, Прилуцкая В. А.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup> Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», г. Минск, Республика Беларусь;*

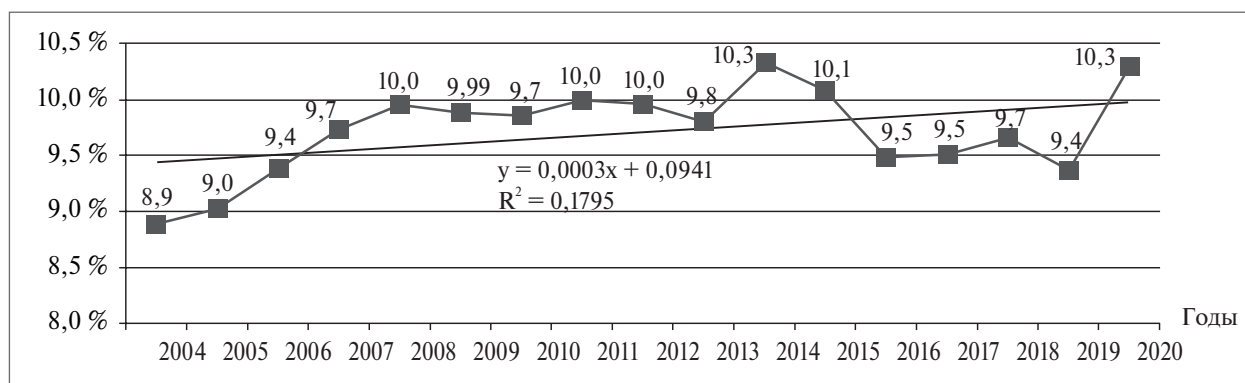
*<sup>2</sup> Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** В статье представлена разработанная трехэтапная модель многофакторного прогнозирования фетальной макросомии с алгоритмом выбора акушерской и перинатальной тактики в зависимости от результатов прогнозирования. Сочетание 10 предикторов избыточного роста плода с пороговыми значениями ультразвуковой фетометрии, определенными с помощью ROC-анализа (окружность головы 344 мм и более, AUC 0,78 (0,72–0,84),  $p < 0,001$ ; окружность живота 358 мм и более, AUC 0,91 (0,87–0,95),  $p < 0,001$ ; длина бедра 76 мм и более, AUC 0,75 (0,68–0,81),  $p < 0,001$ ) позволяет с высокой чувствительностью (88,0 %) и специфичностью (99,5 %) прогнозировать рождение ребенка с массой тела 4000 г и более.

**Ключевые слова:** фетальная макросомия, математическая модель, этапное прогнозирование, новорожденный.

**Введение.** Актуальность проблемы фетальной макросомии обусловлена высокой частотой встречаемости данного осложнения: в Республике Беларусь каждый десятый ребенок рождается с массой тела 4000 г и более и высоким риском акушерских и перинатальных осложнений при родоразрешении крупным плодом (рисунок 1) [1]. Кроме того, все большее внимание уделяется связи фетальной ма-

кросомии с долгосрочными последствиями для новорожденного (фетальное программирование ожирения и неинфекционных заболеваний) [2]. По данным немецкого систематического обзора и метаанализа, в который вошли более 640 тыс. участников, был сделан вывод, что масса тела при рождении более 4 кг связана с повышенным риском избыточной массы тела в будущем (OR 1,66 (1,55–1,77)) [3].



**Рисунок 1 — Динамика удельного веса макросомных новорожденных в Республике Беларусь за 2004–2020 гг.**

Факторы, ассоциированные с развитием фетальной макросомии, принято делить на модифицируемые и немодифицируемые. К немодифицируемым факторам риска относятся генетическая предрасположенность, расовая и этническая принадлежность, рост родителей, повторные роды, мужской пол плода, наличие крупного плода в анамнезе. Модифицируемые факторы риска включают в себя избыток массы тела или ожирение до беременности, избыточную гестационную прибавку массы тела, прегестационный или гестационный сахарный диабет, высокоуглеводную диету, низкую физическую активность во время беременности [4, 5]. Поэтому своевременное проведение профилактических мероприятий, направленных на коррекцию модифицируемых факторов риска, зависит от правильного определения группы материнского риска по развитию избыточного роста плода и осведомленности женщины этой группы о необходимости снижения массы тела и нормализации углеводного обмена при планировании беременности, чтобы снизить вероятность рождения ребенка с массой тела 4000 г и более [6].

**Цель работы** — разработка модели прогнозирования фетальной макросомии, основанной на анамнестических, клинических и ультразвуковых предикторах избыточного роста плода.

**Материалы и методы.** Проведен ретроспективный анализ историй родов (форма № 096/у) всех женщин, родивших макросомных новорожденных (297 новорожденных с массой тела 4000 г и более) в ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» за 2019 г. Из них в основную группу (группа 1) вошли 243 родильницы и их новорожденные дети (4000 г и более) в соответствии с критериями: самостоятельно наступившая одноплодная беременность, родоразрешение в сроке 37/0 недель гестации и более; отсутствие хромосомных аномалий и врожденных пороков развития плода, гемолитической болезни и неиммунной водянки плода, отсутствие соматических заболеваний у матери в стадии декомпенсации. Группу сравнения (группа 2) составили 245 родильниц и их новорожденные дети с массой тела 2500–3999 г в соответствии с перечисленными выше критериями.

С целью определения факторов, ассоциированных с развитием фетальной макросомии, были проанализированы социальные, анамнестические факторы, антропометрические показатели матери и отца макросомных и нормосомных новорожденных детей, а также показатели ультразвуковой фетометрии (бипариетальный диаметр (БПД), окружность головы (ОГ), окружность живота (ОЖ), длина бедра (ДБ), предполагаемая масса плода (ПМП)), выпол-



ненной в III триместре беременности и за 0–3 дня до родоразрешения.

Оценка гестационной прибавки массы тела осуществлялась согласно рекомендациям Американского института здоровья (Institute of Medicine, 2009) в зависимости от индекса массы тела (ИМТ) до беременности: при прегравидарном ИМТ менее 18,5 (дефицит массы

тела) рекомендуемая прибавка массы тела за беременность составила 12,5–18,0 кг; при ИМТ 18,5–24,9 (нормальная масса тела) — 11,5–16,0 кг; при ИМТ 25,0–29,9 (избыточная масса тела) — 7,0–11,5 кг; при ИМТ 30,0 и более (ожирение) — 5,0–9,0 кг.

В таблице 1 представлена характеристика исследуемых групп.

Таблица 1 — Характеристика показателей родителей макросомных и нормосомных новорожденных детей, Me (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>) или абс. число (%)

Показатель	Группа 1 (n = 243)	Группа 2 (n = 245)	Статистическая значимость различий
<b>Материнские характеристики</b>			
Возраст, лет	31 (27–35)	30 (27–33)	$U = 27203,5$ , $p = 0,100$
Образование матери:			
среднее	29 (12,1 %)	10 (4,1)	$\chi^2 = 16,18$ , $p < 0,001$
среднее специальное	53 (22,2)	38 (15,5)	
высшее	157 (65,7)	197 (80,4)	
Рост, см	168 (164–172)	167 (163–171)	$U = 26382,0$ , $p = 0,030$
Распределение по росту:			
160 см и менее	25 (10,3)	43 (17,6)	$\chi^2 = 6,70$ , $p = 0,035$
161–165 см	62 (25,5)	68 (27,8)	
166 см и более	156 (64,2)	134 (54,7)	
Масса тела до беременности, кг	70 (62–80)	61 (55–69)	$U = 18355,5$ , $p < 0,001$
ИМТ до беременности, кг/м <sup>2</sup>	24,6 (21,8–28,4)	21,9 (19,7–24,7)	$U = 19491,0$ , $p < 0,001$
Распределение по ИМТ:			
дефицит массы тела (до 18,5 кг/м <sup>2</sup> )	2 (0,82 %)	25 (10,2 %)	$\chi^2 = 44,64$ , $p < 0,001$
норма (18,5–24,9 кг/м <sup>2</sup> )	128 (52,7 %)	165 (67,4 %)	
избыток массы тела (25,0–29,9 кг/м <sup>2</sup> )	64 (26,3 %)	34 (13,9 %)	
ожирение (30,0 кг/м <sup>2</sup> и более)	49 (20,2 %)	21 (8,6 %)	
Беременность по счету:			
1–2	142 (58,4)	172 (70,2)	$\chi^2 = 8,44$ , $p = 0,015$
3–4	81 (33,3)	63 (25,7)	
5 и более	20 (8,2)	10 (4,1)	
Крупный плод в анамнезе	58 (23,9)	11 (4,5)	$\chi^2 = 37,74$ , $p < 0,001$
Гестационная прибавка массы тела, кг	15 (11–18)	13 (10–16)	$U = 25743,5$ , $p = 0,026$
Распределение по гестационной прибавке массы тела:			
менее рекомендуемых норм	33 (13,7 %)	66 (27,2 %)	$\chi^2 = 20,83$ , $p < 0,001$
соответствует рекомендуемым нормам	89 (37,1 %)	101 (41,5 %)	
более рекомендуемых норм	118 (49,2 %)	76 (31,3 %)	
Масса тела при рождении, г	3500 (3200–3900)	3375 (3050–3650)	$U = 6816,0$ , $p < 0,001$
Масса при рождении 4000 г и более	n = 87 21 (24,1)	n = 210 25 (11,9)	$\chi^2 = 7,03$ , $p = 0,008$

Окончание табл. 1

Показатель	Группа 1 ( $n = 243$ )	Группа 2 ( $n = 245$ )	Статистическая значимость различий
Сахарный диабет (прегестационный или гестационный)	58 (23,9)	20 (8,2)	$\chi^2 = 22,41$ , $p < 0,001$
<b>Отцовские характеристики</b>			
Возраст, лет	33 (29–36)	32 (29–36)	$U = 57432,5$ , $p = 0,506$
Масса тела при рождении, г	3775 (3450–4150)	3500 (3200–3800)	$U = 5460,5$ , $p < 0,001$
Масса при рождении 4000 г и более	$n = 82$ 26 (31,7)	$n = 190$ 28 (14,7)	$\chi^2 = 10,37$ , $p = 0,001$

Статистическую обработку материала выполнили с использованием статистической программы Statistica 10. Учитывая распределение некоторых признаков в группах исследования отличное от нормального (с учетом критериев Шапиро — Уилка, Колмогорова — Смирнова), использовали непараметрические методы статистики. Количественные показатели представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха ( $Q_1 - Q_3$ ). Для сравнения двух независимых выборок использовали непараметрический критерий Манна — Уитни (U). Качественные показатели представлены в виде абсолютного значения и доли ( $n$  (%)); для сравнения качественных показателей в группах и подгруппах использовали критерий  $\chi^2$  Пирсона. Для оценки прогностической значимости выявленных предикторов фетальной макросомии рассчитывали отношение шансов (ОШ) и 95,5%-й доверительный интервал (ДИ), чувствительность (Se, %) и специфичность (Sp, %). Для определения диагностического порога проводили ROC-анализ, данные представляли в виде AUC (площадь под кривой), ее 9 % ДИ. Для оценки эффективности разработанной модели прогнозирования фетальной макросомии рассчитывали Se, Sp, точность диагностического теста, диагностическую ценность положительного и отрицательного результатов, отношения правдоподобия положительного и отрицательного результатов теста (LR+ и LR-). Статистически значимыми принимали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** По данным таблицы 1 анализируемые группы были сопоставимы по возрасту матери ( $p = 0,100$ ) и отца ( $p = 0,506$ ) макросомных и нормосомных новорожденных детей. Уровень образования матерей макросомных новорожденных был ниже: среднее и среднее специальное образование в

группе 1 диагностировалось в 3,0 и 1,4 раза соответственно чаще по сравнению с группой 2 ( $\chi^2 = 16,18$ ,  $p < 0,001$ ).

Антропометрические показатели матерей (рост, масса тела и ИМТ до беременности) в группе 1 были статистически значимо выше по сравнению с группой 2. В группе 1 до беременности в 1,9 раза чаще диагностировался избыток массы тела и в 2,3 раза чаще ожирение; в группе 2 в 12,8 раза чаще диагностировался дефицит массы тела ( $\chi^2 = 44,64$ ,  $p < 0,001$ ). Прибавка массы тела за беременность также была выше в группе 1 по сравнению с группой 2 (15 (11–18) кг и 13 (10–16) кг соответственно,  $U = 25743,5$ ,  $p = 0,026$ ), а патологическая прибавка массы тела в группе 1 диагностировалась в 1,6 раза чаще ( $\chi^2 = 20,83$ ,  $p < 0,001$ ).

Масса тела матери и отца ребенка при рождении была больше в группе 1 (3500 (3200–3900) г и 3775 (3450–4150) г соответственно) по сравнению с группой 2 (3375 (3050–3650) г и 3500 (3200–3800) г соответственно,  $p < 0,001$ ), при этом в группе 1 удельный вес матерей с массой тела при рождении более 4000 г был в 2,0 раза выше ( $\chi^2 = 7,03$ ,  $p = 0,008$ ), а удельный вес отцов, родившихся макросомными, был в 2,2 раза выше ( $\chi^2 = 10,37$ ,  $p = 0,001$ ) по сравнению с группой 2.

При анализе количества беременностей было выявлено, что в группе 1 беременность в 1,3 раза чаще была третья или четвертая, в 2,0 раза чаще — пятая и более ( $\chi^2 = 8,44$ ,  $p = 0,015$ ). Не было выявлено статистически значимых различий по удельному весу искусственного или самопроизвольного прерывания беременности. В группе 1 удельный вес крупного плода в анамнезе (в предыдущие беременности) был в 5,3 раза выше по сравнению с группой 2 ( $\chi^2 = 37,74$ ,  $p < 0,001$ ).

При анализе соматических и гинекологических заболеваний у матерей групп исследования статистически значимые различия между группами были выявлены только по удельному весу сахарного диабета (прегестационного и гестационного): в группе 1 сахарный диабет диагностировался в 2,9 раза чаще по сравнению с группой 2 ( $\chi^2 = 22,41, p < 0,001$ ).

Для определения ультразвуковых маркеров фетальной макросомии был проведен анализ данных ультразвуковых исследований (УЗИ), выполненных в III триместре беременности (32/0–35/0 недель). Была проведена центильная оценка показателей простой фетометрии и ПМП относительно срока гестации. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Характеристика ультразвуковых показателей в III триместре беременности у женщин групп исследования, абс. число (%) или Ме ( $Q_1$ – $Q_3$ )

Показатель	Группа 1	Группа 2	Статистическая значимость различий
БПД более 90 центиля	24/210 (11,4)	8/205 (3,9)	$\chi^2 = 7,23, p = 0,007$
ОГ более 90 центиля	85/203 (41,9)	38/202 (18,8)	$\chi^2 = 25,46, p < 0,001$
ОЖ более 90 центиля	123/207 (59,4)	39/204 (19,1)	$\chi^2 = 69,89, p < 0,001$
ДБ более 90 центиля	144/208 (69,2)	99/201 (49,3)	$\chi^2 = 16,92, p < 0,001$
Центильная оценка ПМП к сроку гестации	91,8 (80,7–96,7)	76,4 (59,4–89,5)	$U = 9327,0, p < 0,001$
Предполагаемая масса плода более 90 центиля	112/205 (54,6)	46/202 (22,8)	$\chi^2 = 43,49, p < 0,001$

По данным ультразвукового исследования в III триместре был выявлен более высокий удельный вес беременных женщин с показателями фетометрии более 90 центиля относительно срока гестации в группе 1 по сравнению с группой 2: БПД более 90 центиля в группе 1 диагностировался в 2,9 раза чаще, ОГ — в 2,2 раза чаще, ОЖ — в 3,1 раза чаще, ДБ — в 1,4 раза.

Перед родоразрешением был проведен анализ показателей ультразвукового исследования плода, выполненных не более чем за 3 дня до родов: в группе 1 данному условию соответствовали 110 случаев, в группе 2 — 90 наблюдений. Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Характеристика ультразвуковых показателей у беременных женщин групп исследования за 0–3 дня до родоразрешения, Ме ( $Q_1$ – $Q_3$ )

Показатель	Группа 1 (n = 110)	Группа 2 (n = 90)	Статистическая значимость результатов
БПД, мм	96 (94–98)	94 (91–95)	$U = 2950,5, p < 0,001$
ОГ, мм	346 (339–353)	336 (329–341)	$U = 2173,5, p < 0,001$
ОЖ, мм	375 (364–385)	344 (338–352)	$U = 866,0, p < 0,001$
ДБ, мм	77 (75–79)	75 (73–76,9)	$U = 2511,5, p < 0,001$
ОГ/ОЖ	0,92 (0,90–0,96)	0,97 (0,95–0,99)	$U = 2076,5, p < 0,001$
ДБ/ОЖ	0,21 (0,20–0,21)	0,22 (0,21–0,22)	$U = 2494,0, p < 0,001$
Центильная оценка ПМП к сроку гестации	99,8 (95,4–99,6)	72,8 (60,8–89,2)	$U = 929,5, p < 0,001$

По данным ультразвуковой фетометрии все показатели (БПД, ОГ, ОЖ и ДБ) были статистически значимо выше в группе 1 по сравнению с группой 2,  $p < 0,001$ ; также в группе 1 отмечалось снижение производных показателей (ОГ/ОЖ и ДБ/ОЖ) за счет более значимого увеличения ОЖ у макросомных плодов,  $p < 0,001$ . Центильная оценка ПМП к сроку

гестации была статистически значимо выше в группе 1 (99,8 (95,4–99,6) центиля) по сравнению с группой 2 (72,8 (60,8–89,2) центиля,  $U = 929,5, p < 0,001$ ), при этом оценка ПМП, соответствующая 90 центиллю и более, в группе 1 была зафиксирована в 91 (82,7 %) случае. Однако диагноз крупный плод в группе 1 по данным УЗИ был выставлен только в 73 (66,4 %)

случаях, в группе 2 завышение предполагаемой массы плода с выставлением диагноза крупный плод наблюдалось в 6 (6,7 %) случаях. С помощью ROC-анализа были рассчитаны поро-

говые значения показателей ультразвуковой фетометрии для прогнозирования фетальной макросомии (более 90 центиля). Данные представлены в таблице 4.

Таблица 4 — Данные ROC-анализа для прогнозирования фетальной макросомии

Показатель	Диагностический порог	AUC (95% ДИ), $p$	Чувствительность, %/ специфичность, %
БПД	96 мм и более	0,70 (0,63–0,77), $p < 0,001$	52,7/76,7
ОГ	344 мм и более	0,78 (0,72–0,84), $p < 0,001$	61,8/85,6
ОЖ	358 мм и более	0,91 (0,87–0,95), $p < 0,001$	84,5/85,6
ДБ	76 мм и более	0,75 (0,68–0,81), $p < 0,001$	71,8/66,7

Наибольшей чувствительностью и специфичностью в прогнозировании фетальной макросомии и крупновесного к сроку гестации плода обладает ОЖ: при ее значении 358 мм и более (AUC 0,91 (0,87–0,95),  $p < 0,001$ ) с чувствительностью 84,5 % и специфичностью 85,6 % можно прогнозировать рождение новорожденного с массой тела более 4000 г.

Срок родоразрешения в группе 1 был статистически значимо выше, по сравнению с группой 2 (в группе 1 — 279 (272–284) дней, в группе 2 — 275 (271–280) дней,  $U = 24530,0$ ,  $p < 0,001$ ); в сроке 40/0 недель беременности и более в группе 1 было родоразрешено в 1,6 раз больше пациенток по сравнению с группой 2 (112 (46,1 %) матерей в группе 1 и 71 (29,0 %) матерей в группе 2,  $\chi^2 = 15,24$   $p < 0,001$ ).

В группе 1 новорожденных мужского пола (163 (67,1 %) случаев) было в 2 раза больше, чем женского пола (80 (32,9 %) случаев), в группе 2 родилось практически одинаковое количество как мальчиков (126 (51,4 %) случаев), так и девочек (119 (48,6 %) случаев,  $\chi^2 = 12,37$ ,  $p < 0,001$ ).

По результатам проведенного анализа были выделены статистически значимые предикторы фетальной макросомии, определена степень их влияния на формирование фетальной макросомии и проведена оценка эффективности каждого предиктора (расчет чувствительности и специфичности) в прогнозировании фетальной макросомии (таблица 5).

Таблица 5 — Прогностическая значимость и оценка эффективности факторов, ассоциированных с фетальной макросомией

Предиктор	ОШ (95% ДИ)	Чувствительность, %/ специфичность, %
Образование матери среднее/среднее специальное	2,14 (1,42–3,24)	34,3/80,4
Рост матери 166 см и более	1,49 (1,03–2,14)	64,2/45,3
Избыток массы тела/ожирение матери до беременности	3,00 (2,03–4,44)	46,5/77,6
Гестационная прибавка массы тела более рекомендуемых норм	2,13 (1,47–3,08)	49,2/68,7
Масса матери при рождении 4000 г и более	2,35 (1,24–4,49)	24,1/88,1
Масса отца при рождении 4000 г и более	2,69 (1,45–4,96)	31,7/85,3
Количество беременностей: 3 и более	1,68 (1,15–2,44)	41,6/70,2
Масса ребенка 4000 г и более в анамнезе	6,67 (3,40–13,07)	23,9/95,6
Прегестационный или гестационный СД	3,53 (2,05–6,08)	23,9/91,8
УЗИ в III триместре беременности (32/0–35/0 неделя):		
БПД более 90 центиля	3,18 (1,39–7,25)	11,4/96,1
ОГ более 90 центиля	3,11 (1,98–4,87)	41,9/81,2
ОЖ более 90 центиля	6,20 (3,97–9,68)	59,4/80,9
ДБ более 90 центиля	2,32 (1,55–3,47)	69,2/50,7
ПМП более 90 центиля	4,08 (2,66–6,27)	54,6/77,2



Окончание табл. 5

Предиктор	ОШ (95% ДИ)	Чувствительность, %/ специфичность, %
УЗИ перед родоразрешением:		
БПД 96 мм и более	3,66 (1,98–6,78)	52,7/76,7
ОГ 344 мм и более	9,59 (4,75–19,36)	61,8/85,6
ОЖ 358 мм и более	32,40 (14,81–70,88)	84,5/85,6
ДБ 76 мм и более	5,10 (2,79–9,32)	71,8/66,7
Срок беременности: 40 недель и более	2,10 (1,44–3,05)	46,1/71,0
Пол новорожденного: мужской	1,92 (1,33–2,78)	67,1/48,6

Исходя из данных, представленных в таблице 5, выявленные предикторы фетальной макросомии были разделены на 3 группы (3 этапа прогнозирования фетальной макросомии):

1) для прогнозирования избыточного роста плода на этапе прегравидарной подготовки и в I триместре беременности;

2) в III триместре беременности после проведения скринингового ультразвукового исследования (в 32/0–35/0 недель);

3) перед родоразрешением.

Были рассчитаны диагностические коэффициенты для каждого фактора, при суммировании которых на каждом этапе был рассчитан суммарный диагностический коэффициент. С помощью ROC-анализа были определены пороговые значения суммарных диагностических коэффициентов для каждого этапа прогнозирования фетальной макросомии, определены показатели эффективности использования разработанного метода прогнозирования фетальной макросомии. Данные представлены в таблице 6.

Таблица 6 — Диагностические коэффициенты для прогнозирования фетальной макросомии на этапе прегравидарной подготовки / I триместра беременности, в III триместре беременности и перед родоразрешением

Предиктор	Диагностический коэффициент		
	прегравидарная подготовка / I триместр беременности	III триместр	перед родоразрешением
Образование матери:			
среднее	+3	+3	+3
среднее специальное	+2	+2	+2
высшее	–1	–1	–1
Рост матери:			
160 см и менее	–2	–2	–2
161–165 см	0	0	0
166 см и более	+1	+1	+1
ИМТ до беременности:			
до 18,5 кг/м <sup>2</sup> (дефицит массы тела)	–10	–10	–10
18,5–24,9 кг/м <sup>2</sup> (норма)	0	0	0
25,0–29,9 кг/м <sup>2</sup> (избыток массы тела)	+4	+4	+4
30,0 кг/м <sup>2</sup> и более (ожирение)	+5	+5	+5
Масса матери при рождении 4000 г и более			
Масса отца при рождении 4000 г и более	+4	+4	+4
Беременность по счету:			
1–2	+4	+4	+4
3–4	–1	–1	–1
5 и более	+1	+1	+1
Масса ребенка 4000 г и более в анамнезе	+3	+3	+3
Масса ребенка 4000 г и более в анамнезе	+8	+8	+8

Окончание табл. 1

Предиктор	Диагностический коэффициент		
	прегравидарная подготовка / I триместр беременности	III триместр	перед родоразрешением
Прегестационный или гестационный СД	+5	+5	+5
УЗ-фетометрия в III триместре беременности:			
ОЖ более 90 центиля	—	+8	—
ПМП более 90 центиля	—	+6	—
Пол плода:			
мужской	—	+1	+1
женский	—	-2	-2
Гестационная прибавка массы тела:			
менее рекомендуемых норм	—	—	-2
соответствует рекомендуемым нормам	—	—	0
более рекомендуемых норм	—	—	+3
Срок беременности 280 дней и более	—	—	+3
УЗ-фетометрия перед родоразрешением:			
ОГ 344 мм и более	—	—	+10
ОЖ 358 мм и более	—	—	+15
ДБ 76 мм и более	—	—	+7
Пороговое значение суммарного диагностического коэффициента	3 балла и более	17 баллов и более	24 балла и более
AUC (95% ДИ), <i>p</i>	0,77 (0,69–0,83), <i>p</i> < 0,001	0,82 (0,76–0,89), <i>p</i> < 0,001	0,93 (0,85–1,00), <i>p</i> < 0,001
Чувствительность/специфичность	81,5 %/64,2 %	57,1 %/93,3 %	88,0 %/99,5 %
Точность диагностического теста	69,4 %	82,5 %	93,5 %
Прогностическая ценность положительного/отрицательного результатов	49,3 %/89,1 %	78,3 %/83,7 %	88,0 %/95,5 %
LR+/LR-	2,28/0,29	8,51/0,46	19,65/0,13

Показатель отношения правдоподобия положительного результата теста (LR+) на всех трех этапах прогнозирования был более 2, а отрицательного результата теста (LR-) — менее 0,5, что характеризует клиническую значимость разработанной модели прогнозирования как полезную и обуславливает возможность ее использования в качестве диагностического теста для прогнозирования фетальной макросомии.

На основе трехэтапной модели прогнозирования фетальной макросомии разработан Калькулятор определения вероятности развития фетальной макросомии, которым можно воспользоваться на сайте государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (<https://www.medcenter.by/> в разделе Деятельность/Калькуляторы по ссылке URL: <https://medcenter.by/o-tsentre/deyatelnost/kalkulyatory>).

Интерпретация полученных результатов и практические рекомендации при высокой вероятности развития фетальной макросомии:

1. При проведении прегравидарной подготовки и в I триместре беременности в женской консультации для стратификации риска развития избыточного роста плода проводится оценка анамнестических и клинических предикторов фетальной макросомии с использованием Калькулятора определения вероятности развития фетальной макросомии. При высокой вероятности развития крупного плода на данном этапе рекомендована коррекция модифицируемых факторов риска (нарушений жирового и углеводного обмена): диетотерапия, физическая активность, рекомендации по гестационной прибавке массы тела; мониторинг прегестационного сахарного диабета; проведение перорального теста толерантности к глюкозе во II триместре беременности; в III три-

местре беременности проведение скринингового ультразвукового исследования с центильной оценкой показателей фетометрии относительно срока гестации.

2. В III триместре беременности после проведения ультразвукового скрининга (в 32/0–35/0 недель беременности) проводится перерасчет риска развития фетальной макросомии с учетом центильной оценки показателей ультразвуковой фетометрии. При высокой вероятности развития крупного плода рекомендована дородовая госпитализация в 38–39 недель беременности для определения акушерской тактики.

3. В акушерском стационаре в 38–39 недель беременности после проведения ультразвукового исследования при высокой вероятности развития крупного плода рекомендовано проведение врачебного консилиума для решения вопроса о дополнительном обследовании (магнитно-резонансная пельвиометрия для исключения плодово-тазовой диспропорции) и выработке рационального плана ведения родов, что будет способствовать снижению акушерских и перинатальных осложнений, ассоциированных с избыточным ростом плода.

**Заключение.** На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Разработана трехэтапная модель многофакторного прогнозирования фетальной макросомии с алгоритмом выбора акушерской и перинатальной тактики в зависимости от результатов прогнозирования.

2. Сочетание 10 предикторов избыточного роста плода с пороговыми значениями ультразвуковой фетометрии, определенными с помощью ROC-анализа (окружность головы 344 мм и более, AUC 0,78 (0,72–0,84),  $p < 0,001$ ; окружность живота 358 мм и более, AUC 0,91 (0,87–0,95),  $p < 0,001$ ; длина бедра 76 мм и более, AUC 0,75 (0,68–0,81),  $p < 0,001$ ) позволяет с высокой чувствительностью (88,0 %) и специфичностью (99,5 %) прогнозировать рождение ребенка с массой тела 4000 г и более.

3. Разработанная трехэтапная модель многофакторного прогнозирования фетальной макросомии, учитывая доступность предложенных предикторов избыточного роста плода, может быть рекомендована к использованию в организациях здравоохранения всех технологических уровней оказания акушерско-гинекологической и перинатальной помощи в Республике Беларусь.

#### Список цитированных источников

1. Maternal and neonatal complications of fetal macrosomia: systematic review and meta-analysis / J. Beta [et al.] // *Ultrasound Obstet Gynecol.* — 2019. — Vol. 54, № 3. — P. 308–318.
2. The Association Between High Birth Weight and Long-Term Outcomes—Implications for Assisted Reproductive Technologies: A Systematic Review and Meta-Analysis / E. Magnusson [et al.] // *Front. Pediatr.* — 2021. — Vol. 9. — P. 675775. DOI: 10.3389/fped.2021.675775.
3. Birth weight and long-term overweight risk: systematic review and a meta-analysis including 643,902 persons from 66 studies and 26 countries globally / K. Schellong [et al.] // *P. LoS. One.* — 2012. — Vol. 10. — P. e47776. DOI: 10.1371/journal.pone.0047776.
4. Fetal macrosomia: risk factors, maternal, and perinatal outcome. / A. Mohammadbeigi [et al.] // *Ann. Med. Health. Sci. Res.* — 2013. — Vol. 3, № 4. — P. 546–550.
5. Campbell, S. Fetal macrosomia: a problem in need of a policy / S. Campbell // *Ultrasound Obstet Gynecol.* — 2014. — Vol. 43, № 1. — P. 3–10. Doi: 10.1002/uog.13268.
6. Walsh, J. M. Prediction and prevention of the macrosomic fetus / J. M. Walsh, F. M. McAuliffe // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 2012 — Vol. 162, № 2. — P. 125–130. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2012.03.005.

## Three-stage model for prediction of fetal macrosomia

*Viktor S.<sup>1</sup>, Kurlovich I.<sup>1</sup>, Vashchilina T.<sup>1</sup>, Prylutsкая V.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Republican Scientific and Practical Center “Mother and Child”, Minsk, Republic of Belarus;*

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

The article presents the developed three-stage model of multifactorial prediction of fetal macrosomia with algorithms for choosing obstetric and perinatal tactics depending on the prediction results. Combination of 10 predictors of fetal overgrowth with ultrasound fetometry thresholds determined using ROC analysis (head circumference 344 mm or more, AUC 0.78 (0.72–0.84),  $p < 0.001$ ; abdominal

circumference 358 mm or more, AUC 0.91 (0.87–0.95),  $p < 0.001$ ; femur length 76 mm or more, AUC 0.75 (0.68–0.81),  $p < 0.001$ ) allows for high sensitivity (88.0 %) and specificity (99.5 %) to predict the birth of a child weighing 4000 g or more.

**Keywords:** fetal macrosomia, mathematical model, stage prediction, newborn.

Поступила 01.06.2022

УДК 616-006.6-08:56.995.15

## УРОВЕНЬ РЕЦЕПТОРОВ ЛЕЙКОЦИТОВ И ИХ ЛИГАНДОВ В ДИАГНОСТИКЕ АДЕНОКАРЦИНОМЫ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

*Мурашко Д. И., Таганович А. Д., Ковганко Н. Н.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Существует потребность в поиске информативных биомаркеров аденокарциномы (АК) и плоскоклеточного рака легкого (ПКРЛ), позволяющих судить о распространенности опухоли. В настоящем исследовании обоснована целесообразность определения интенсивности флуоресценции (MFI) CXCR1 в гранулоцитах, доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, и концентрации гиалуроновой кислоты (ГК) при АК и ПКРЛ. Для АК I–II стадии диагностическая эффективность измерения концентрации ГК в крови, доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, и MFI CXCR1 в гранулоцитах составляет 73,5, 85,0, 80,9 %, при III–IV стадиях — 80, 85,8, 75,5 % соответственно. Диагностическая эффективность этих же показателей при I–II стадиях ПКРЛ составила 89,6, 86,6, 77,8 %, а при III–IV стадиях — 81,6, 81,7 и 87,5 % соответственно. Обнаружено существенное увеличение концентрации ГК, доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, MFI CXCR1 в гранулоцитах крови пациентов при II стадии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) в сравнении с I стадией. Диагностическая чувствительность определения этих показателей в качестве дополнительных критериев, отличающих I стадию от II стадии, составляет при АК 86,2, 77,8, 72,4 %, а при ПКРЛ — 84,1, 70,3, 88,6 % соответственно.

**Ключевые слова:** немелкоклеточный рак легкого, гиалуроновая кислота, CXCR1, CXCR2.

**Введение.** Рак легкого занимает второе место в структуре онкологической заболеваемости в мире. Большую часть его (85 %) составляет немелкоклеточный рак (НМРЛ), который в свою очередь включает основные гистологические типы: аденокарциному (АК) и плоскоклеточный рак (ПКРЛ). Имеется ряд существенных различий в морфологии, особенностях течения и закономерностях опухолевого метаболизма при этих формах заболевания [1]. Имеются существенные различия в прогнозе НМРЛ в зависимости от распространенности опухолевого процесса. Пятилетняя выживаемость пациентов с IA стадией (классификация TNM/pTNM) этих НМРЛ составляет около 90 %, а при IV стадии пятилетняя выживаемость не превышает 5 % [1]. Различия в течении морфологических типов и влияние степени распространенности опухолевого процесса

на выживаемость пациентов указывают на необходимость ранней и дифференцированной оценки АК и ПКРЛ.

В настоящее время в качестве дополнительных диагностических тестов при выявлении АК и ПКРЛ в крови пациентов определяется концентрация классических опухолеассоциированных антигенов — CYFRA 21-1 и SCC. Однако данные диагностической ценности измерения концентрации этих белков в крови неоднозначны. По результатам различных исследований, диагностическая чувствительность определения содержания CYFRA 21-1 в крови пациентов с НМРЛ варьирует от 54 до 77 % [2]. Число исследований, посвященных измерению его концентрации в крови при I–II стадиях НМРЛ, крайне невелико.

Определение уровня антигена плоскоклеточной карциномы (SCC) может служить



дополнительным критерием постановки диагноза при ПКРЛ. Однако диагностическая чувствительность его измерения в крови пациентов с этим гистологическим подтипом НМРЛ не превышает 52,7 % [3]. Вместе с тем в литературе отсутствуют данные о диагностической эффективности определения концентрации этих опухолеассоциированных антигенов при ранних (I–II) стадиях АК и ПКРЛ.

Одним из перспективных направлений научных исследований является поиск потенциальных биомаркеров злокачественных новообразований среди компонентов опухолеассоциированного воспаления. Опухолевые клетки продуцируют провоспалительные хемокины, в частности CXCL5 и CXCL8. Взаимодействуя с рецепторами CXCR1 и CXCR2 на поверхности лейкоцитов, клеток паренхимы и стромы опухоли, эти хемокины запускают сигнальные пути, способствующие усилению пролиферации, инвазии и метастазирования злокачественного новообразования [4].

Интенсивная пролиферация опухолевых клеток приводит к гипоксии в опухолевой ткани и усилению синтеза фактора, индуцируемого гипоксией — HIF-1 $\alpha$ . Последний в свою очередь активирует транскрипцию генов, ответственных за жизнеобеспечение опухоли в условиях недостатка кислорода. Одним из продуктов таких генов является рецептор CD44v6. Взаимодействуя со своим основным лигандом (гиалуриновой кислотой), он способствует дальнейшему усилению пролиферации клеток и опухолевой инвазии [5].

Результаты проведенных ранее исследований свидетельствуют, что увеличенная кон-

центрация CXCL5 и CXCL8, их рецепторов CXCR1 и CXCR2 и компонентов сигнального пути HIF-1 $\alpha$ /CD44v6/гиалуриновая кислота (ГК) в опухолевой ткани ассоциирована со степенью распространенности опухолевого процесса, метастазированием и плохим прогнозом заболевания [4, 5]. Результаты определения уровня этих соединений в крови пациентов АК и ПКРЛ немногочисленны. Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о существенном росте их концентрации в крови пациентов с НМРЛ безотносительно их гистологического подтипа [6, 7]. Однако детальной оценки их концентрации в зависимости от степени распространенности морфологических типов НМРЛ не проводилось.

**Цель работы** — оценка диагностической информативности измерения концентрации CXCL5, CXCR2, CXCL8, CXCR1,2, HIF-1 $\alpha$ , CD44v6, ГК в крови пациентов с АК и ПКРЛ для определения показаний к углубленному обследованию (КТ/МРТ) с целью уточнения степени распространенности опухолевого процесса.

**Материалы и методы.** Обследовано 213 пациентов с НМРЛ (52 женщины и 153 мужчины), находившихся на лечении их в ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова» с 2019 по 2022 г. (таблица 1).

Группа контроля состояла из 42 человек в возрасте  $43 \pm 10$  лет. В нашем исследовании наблюдаемая и контрольная группы были сопоставимы по полу, возрасту и сопутствующим заболеваниям.

Таблица 1 — Характеристика пациентов с НМРЛ

Показатель	АК	ПКРЛ
	Количество пациентов	
Стадия НМРЛ:		
I	27	24
II	29	44
III	30	35
IV	12	12
Размер опухоли (T):		
T1	27	26
T2	54	52
T3	17	17
T4	—	20
Метастазы в регионарные лимфоузлы (N):		
N0	46	95
N1	18	10
N2	25	15
N3	9	5

Окончание табл. 1

Показатель	АК	ПКРЛ
	Количество пациентов	
Отдаленные метастазы:		
M0	86	103
M1	12	12
Степень дифференцировки опухоли (Grade):		
G1	6	46
G2	48	38
G3	21	18

Концентрация CXCL8, CXCL5, HIF-1 $\alpha$ , ГК (лиганда рецептора CD44v6) и SCC в сыворотке крови пациентов и здоровых людей определялись методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием ИФА-наборов Fine Test (КНР) на автоматическом анализаторе Brio (Seac, Италия) и планшетном фотометре Sirio (Seac, Италия). Концентрация CYFRA 21-1 в сыворотке крови определялась методом иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА) на ИХЛА-анализаторе Cobas e411 (Roche Diagnostics, США).

Долю гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов, снабженных рецепторами CXCR1, CXCR2, CD44v6, и плотность расположения рецептора в них (MFI) определяли методом проточной цитометрии с использованием цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США).

Для статистического анализа использовался программный пакет IBM SPSS Statistics 23 (IBM, США). Так как распределение значений уровня показателей ни в одной из выборок не подчинялось нормальному распределению по критерию Колмогорова – Смирнова, использовались методы непараметрической статистики. Рассчитывались медиана (Me) и интерквартильный размах (25–75 %). Для оценки различий уровня определяемых показателей в нескольких независимых группах применяли *H*-критерий Краскела – Уоллиса. Критический уровень статистической значимости критерия принимали равным 5 % ( $p = 0,05$ ). Последующие сравнения в анализируемых группах осуществлялись с применением *U*-критерия Манна – Уитни с поправкой Холма – Бонферрони на множественные сравнения. Силу взаимосвязи между уровнем показателей и степенью распространенности опухолевого процесса оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (*R*).

Оценку диагностической информативности биохимических тестов проводили с помощью характеристических кривых (ROC-анализ). О диагностической ценности анализируе-

мых показателей судили на основании расчета диагностической чувствительности (ДЧ), специфичности (ДС) и эффективности теста (ДЭ). Пороговое значение диагностического теста определяли как величину оптимального сочетания чувствительности и специфичности теста при построении ROC-кривых.

**Результаты и их обсуждение.** При НМРЛ от II до IV стадии уровень CXCL8 более чем в два раза превышал показатель у лиц без злокачественного новообразования ( $p < 0,008$ ; таблица 2). У пациентов с I стадией АК концентрация CXCL8 в крови значительно превышала концентрацию в группе контроля. При I стадии ПКРЛ уровень этого хемокина не отличается от группы контроля. Уровень другого определяемого хемокина (CXCL5) в крови пациентов с НМРЛ вне зависимости от степени распространения опухолевого процесса не отличалась от содержания в контрольной группе.

При I стадии АК доля гранулоцитов, снабженных CXCR1, не отличалась от таковой в контрольной группе. При II стадии этого гистологического подтипа НМРЛ этот показатель был выше в сравнении со здоровыми людьми. У пациентов с III–IV стадиями АК доля гранулоцитов, снабженных CXCR1, была максимальна и превышала таковую у пациентов с I стадией заболевания ( $p < 0,008$ ). Для пациентов с ПКРЛ при любой степени распространения опухоли доля гранулоцитов, снабженных CXCR1, была выше, чем у лиц без злокачественных новообразований ( $p < 0,008$ ).

Показатель, характеризующий плотность расположения рецептора CXCR1 в мембране клеток лейкоцитарного ряда (MFI), в нашем исследовании увеличивался в лимфоцитах пациентов с НМРЛ в сравнении с группой контроля ( $p < 0,008$ ). MFI CXCR1 в гранулоцитах более чем в 1,5 раза выше в сравнении со здоровыми людьми уже на I стадии НМРЛ ( $p < 0,008$ ). Доля лимфоцитов, снабженных CXCR1, демонстрировала сходные изменения. При этом существенных отличий уровня этих

показателей в лимфоцитах крови пациентов в зависимости от распространенности опухолевого процесса не наблюдалось. Вместе с тем MFI CXCR1 в гранулоцитах был более чем в 1,5 раза выше в сравнении со здоровыми людьми уже при I стадии НМРЛ ( $p < 0,008$ ). При II стадии заболевания ее уровень возрастал еще сильнее в сравнении с пациентами с I стадией ( $p < 0,008$ ), а при III–IV стадиях достигал максимальных значений.

Исследование концентрации другого рецептора (CXCR2) показало следующие результаты: доля гранулоцитов и моноцитов с рецептором CXCR2 и MFI CXCR2 в гранулоцитах пациентов с НМРЛ не отличались от группы контроля. Доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, напротив, была в 1,5 раза выше в сравнении с группой контроля уже при I стадии НМРЛ ( $p < 0,008$ ). При II стадии опухолевого процесса этот показатель возрастал еще сильнее. При III–IV стадиях НМРЛ относительное количество лимфоцитов, снабженных CXCR2, в крови пациентов достигло максимума и в 1,2–1,6 раза превышало их количество при II стадии заболевания ( $p < 0,008$ ). MFI CXCR2 в моноцитах пациентов с НМРЛ при всех стадиях была выше, чем у здоровых людей ( $p < 0,008$ ).

Концентрация HIF-1 $\alpha$  в крови пациентов с НМРЛ не отличалась от группы контроля (таблица 2). MFI CD44v6 в гранулоцитах и лимфоцитах пациентов со II–IV стадиями НМРЛ увеличивалась в сравнении с контрольной группой ( $p < 0,008$ ). Доля гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов, снабженных CD44v6, у пациентов с I стадией АК была выше, чем в контрольной группе ( $p < 0,008$ ). MFI CD44v6 в моноцитах пациентов с АК увеличена в сравнении с группой здоровых людей только при III и IV стадиях заболевания ( $p < 0,008$ ). При III–IV стадиях ПКРЛ доля гранулоцитов и моноцитов, снабженных CD44v6, была выше, чем в группе контроля ( $p < 0,008$ ). MFI CD44v6 в моноцитах пациентов с ПКРЛ II стадии была на 20 % выше контрольного уровня. При III–IV стадиях ПКРЛ наблюдалась тенденция к снижению этого показателя в моноцитах.

При I стадии НМРЛ уровень ГК (основного лиганда рецептора CD44v6) в крови пациентов в 1,6 раза больше в сравнении с контрольной группой ( $p < 0,008$ ). При II стадии заболевания концентрация ГК значительно выше, чем у пациентов с I стадией ( $p < 0,008$ ). При стадиях III и IV уровень ГК в крови демонстрировало дальнейший рост и более чем в 3,5 раза превышало ее уровень в контрольной группе.

Концентрация классического опухолеассоциированного антигена CYFRA 21-1 столь же существенно возрастала в крови пациентов с I стадией НМРЛ в сравнении с группой контроля ( $p < 0,008$ ). При II стадии НМРЛ его уровень демонстрировал тенденцию к увеличению, однако не отличался от I стадии (с уровнем статистической значимости  $p > 0,008$ ). При III–IV стадиях НМРЛ концентрация CYFRA 21-1 возрастала и была значительно выше, чем при I и II стадиях (таблица 2).

Концентрация другого опухолеассоциированного антигена SCC у пациентов с АК отличалась от контрольной группы при II стадии заболевания ( $p < 0,008$ ). При III–IV стадиях его уровень в крови пациентов снижался. У пациентов с ПКРЛ концентрация SCC была выше в сравнении с группой контроля как при I–II, так и при III–IV стадиях заболевания. Значительных изменений содержания этого антигена в зависимости от распространенности опухолевого процесса не прослеживалось.

Таким образом, среди всех анализируемых показателей только MFI CXCR1 в гранулоцитах, доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, концентрация ГК и CYFRA 21-1 в крови пациентов в значительной степени изменялись в зависимости от распространения опухолевого процесса как при АК, так и при ПКРЛ. Для определения зависимости концентрации указанных выше показателей от степени распространенности опухолевого процесса в соответствии с TNM/pTNM (7 ed) проведен корреляционный анализ. Коэффициент корреляции ГК и CYFRA 21-1 в сыворотке крови, доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, MFI CXCR1 в гранулоцитах со стадиями АК составил 0,692, 0,477, 0,661 и 0,565. Для ПКРЛ – 0,681, 0,415, 0,610 и 0,578 соответственно.

MFI CXCR1 в гранулоцитах крови возрастала у пациентов с НМРЛ и размером опухоли менее 3 см (T1) в сравнении с группой контроля ( $p < 0,008$ ; таблица 3). Еще больше уровень этого показателя увеличивался у пациентов с размером опухоли 3–5 см (T2). В группах пациентов с НМРЛ и размером опухоли 5–7 см (T3) не наблюдалось увеличения MFI CXCR1 в гранулоцитах в сравнении с T2. У пациентов с ПКРЛ и T4 MFI CXCR1 в гранулоцитах возрастает в сравнении с группами T1-3 ( $p < 0,008$ ).

Доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, также возрастала в крови пациентов с НМРЛ при T1 в сравнении с группой контроля ( $p < 0,008$ ). Она была еще при T2–T3. У пациентов с ПКРЛ при T4 этот показатель был в 1,2 раза выше в сравнении с T2, однако не отличался от пациентов с T3.

Таблица 2 – Концентрация CXCL8, CXCL5, CXCR1, CXCR2, HIF-1 $\alpha$ , ГК в крови пациентов с АК и ПКРЛ в зависимости от распространенности опухоли

Показатель	Контроль	АК			ПКРЛ		
		Стадия I	Стадия II	Стадия III–IV	Стадия I	Стадия II	Стадия III–IV
CXCL8, пг/мл	88,7 [47,7;168,2]	198,9 <sup>1</sup> [139,0;443,0]	199,2 <sup>1</sup> [90,3;328,7]	240,6 <sup>1</sup> [148,5;521,9]	115,1 [55,6; 135,0]	183,9 <sup>1</sup> [91,2; 283,3]	201,6 <sup>1,2</sup> [133,9; 404,4]
CXCR1, гранулоциты, %	93,9 [91,9;94,6]	93,9 [90,0; 96,1]	95,0 <sup>1</sup> [94,5; 95,8]	96,8 <sup>1,2</sup> [95,2; 98,0]	96,0 <sup>1</sup> [93,9; 97,0]	95,4 <sup>1</sup> [94,6; 96,5]	95,3 <sup>1</sup> [92,6; 97,5]
MFI CXCR1, гранулоциты	20,1 [9,9; 27,6]	32,1 <sup>1</sup> [23,9; 44,2]	47,2 <sup>1,2</sup> [37,3; 65,1]	54,4 <sup>1,2,3</sup> [47,8; 63,9]	32,7 <sup>1</sup> [18,4; 47,2]	47,1 <sup>1,2</sup> [34,9; 48,4]	59,8 <sup>1,2,3</sup> [57,3; 86,5]
CXCR1, лимфоциты, %	4,6 [2,2; 8,3]	13,1 <sup>1</sup> [5,3;21,3]	11,5 <sup>1</sup> [7,3; 13,4]	15,4 <sup>1</sup> [8,9; 20,6]	10,2 <sup>1</sup> [5,8; 17,7]	12,1 <sup>1</sup> [10,1; 15,4]	14,3 <sup>1</sup> [4,3; 19,5]
MFI CXCR1, лимфоциты	1,8 [1,6; 2,2]	3,0 <sup>1</sup> [2,4; 13,2]	3,5 <sup>1</sup> [2,8; 17,4]	3,5 <sup>1</sup> [2,6; 6,3]	3,8 <sup>1</sup> [3,1; 14,8]	3,8 <sup>1</sup> [3,0; 12,3]	3,5 <sup>1</sup> [2,2; 15,2]
CXCR1, моноциты, %	91,9 [89,5; 95,5]	92,1 [88,8; 95,0]	93,3 [85,2; 95,8]	93,8 [80,6; 96,5]	89,0 [86,5; 92,2]	91,4 [76,1; 95,4]	92,3 [38,2; 93,1]
MFI CXCR1, моноциты	2,2 [2,0; 2,7]	2,7 <sup>1</sup> [2,6; 3,3]	2,8 <sup>1</sup> [2,5;3,3]	4,2 <sup>1</sup> [2,5;6,5]	2,5 [1,2; 4,8]	2,5 [1,6; 8,0]	3,3 <sup>1</sup> [2,2; 10,1]
CXCL5, нг/мл	1,1 [0,5; 1,9]	1,3 [1,0; 1,6]	1,6 [1,2; 3,2]	1,3 [0,8; 2,1]	1,2 [0,8; 1,7]	1,1 [0,9; 2,2]	1,5 [0,7; 1,9]
CXCR2, гранулоциты, %	93,0 [90,3; 95,3]	93,8 [86,7; 95,6]	94,8 [93,1; 96,7]	95,9 <sup>2</sup> [88,9; 96,5]	95,2 [91,9; 96,5]	95,3 [91,8; 97,9]	95,8 [89,4; 97,2]
MFI CXCR2, гранулоциты	93,1 [79,3; 97,1]	97,4 [88,6; 130,4]	107,1 [85,8; 146,3]	112,1 <sup>1</sup> [94,7; 116,9]	100,6 [74,6; 120,3]	97,8 [73,1; 145,9]	93,8 [79,3; 110,0]
CXCR2, лимфоциты, %	9,5 [6,6; 12,6]	16,5 <sup>1</sup> [10,3; 19,1]	20,9 <sup>1,2</sup> [20,0; 34,3]	32,5 <sup>1,2,3</sup> [30,7; 34,3]	18,1 <sup>1</sup> [15,0; 18,9]	25,6 <sup>1,2</sup> [17,1; 27,5]	29,8 <sup>1,2,3</sup> [27,7; 34,0]
MFI CXCR2, лимфоциты	12,2 [7,2; 17,2]	16,4 [12,0; 21,4]	18,2 [12,9; 19,4]	18,9 <sup>1</sup> [13,1; 19,5]	16,0 [12,6; 18,7]	18,1 <sup>1</sup> [12,6; 19,4]	18,6 <sup>1</sup> [11,8; 19,2]
CXCR2, моноциты, %	94,2 [93,4; 95,7]	95,2 [82,0; 97,8]	95,2 [17,1; 97,5]	95,6 <sup>1</sup> [94,9; 98,2]	95,5 <sup>1</sup> [89,2; 97,8]	95,8 [91,8; 99,1]	97,5 [87,9; 97,9]
MFI CXCR2, моноциты	13,4 [12,3; 17,1]	23,4 <sup>1</sup> [15,0; 32,2]	26,5 <sup>1</sup> [18,0; 39,7]	26,8 <sup>1</sup> [19,9; 32,0]	23,7 <sup>1</sup> [21,6; 55,4]	24,3 <sup>1</sup> [22,5; 39,3]	27,8 <sup>1</sup> [23,1; 32,2]



CD44v6, гранулоциты, %	3,2 [1,2; 4,1]	3,5 <sup>1</sup> [2,5; 7,6]	5,0 <sup>1</sup> [4,0; 5,6]	5,1 <sup>1</sup> [2,6; 7,5]	3,7 [1,1; 2,7]	3,7 [2,4; 4,2]	4,0 <sup>1</sup> [2,8; 6,6]
MFI CD44v6, гранулоциты	1,5 [1,1; 2,5]	1,9 [1,4; 3,6]	2,5 <sup>1</sup> [2,3; 3,4]	2,8 <sup>1</sup> [1,8; 3,6]	2,5 [1,1; 2,7]	2,6 <sup>1</sup> [2,2; 2,7]	2,5 <sup>1</sup> [2,0; 2,6]
CD44v6, лимфоциты, %	1,0 [0,4; 1,9]	1,1 [0,6; 2,1]	1,2 [0,9; 1,3]	1,9 <sup>12</sup> [1,1; 2,0]	1,6 [0,6; 4,3]	1,5 <sup>1</sup> [1,2; 1,6]	1,4 [1,1; 1,8]
MFI CD44v6, лимфоциты	2,6 [2,3; 2,8]	2,9 [1,9; 4,7]	2,9 <sup>1</sup> [2,6; 4,5]	3,9 <sup>12</sup> [1,9; 4,6]	2,9 [1,6; 5,3]	3,2 <sup>12</sup> [2,9; 4,1]	3,9 <sup>1</sup> [1,9; 5,1]
CD44v6, моноциты, %	1,9 [1,6; 2,3]	2,9 <sup>1</sup> [1,8; 8,5]	3,3 <sup>1</sup> [1,9; 4,1]	3,9 <sup>1</sup> [1,4; 9,1]	2,4 [1,6; 9,9]	3,2 <sup>1</sup> [2,0; 3,7]	4,2 <sup>1</sup> [2,2; 9,9]
MFI CD44v6, моноциты	5,1 [4,5; 5,8]	5,6 [3,7; 7,8]	6,0 [3,2; 7,2]	6,8 <sup>1</sup> [4,8; 7,4]	6,1 [2,1; 20,5]	6,2 <sup>12</sup> [5,6; 7,5]	4,6 <sup>3</sup> [1,9; 6,7]
HIF-1α, нг/мл	2,9 [2,5; 3,9]	2,9 [2,2; 3,6]	3,4 [2,9; 3,5]	3,6 <sup>3</sup> [2,7; 3,9]	2,9 [2,2; 3,4]	3,1 [2,4; 4,2]	3,9 [2,6; 4,4]
ГК, нг/мл	9,0 [7,7; 18,0]	22,4 <sup>1</sup> [15,1; 24,6]	27,9 <sup>12</sup> [23,8; 28,7]	30,2 <sup>1234</sup> [27,1; 33,2]	14,5 <sup>1</sup> [12,2; 16,9]	27,3 <sup>123</sup> [21,7; 32,9]	36,3 <sup>123</sup> [31,5; 47,2]
CYFRA 21-1, нг/мл	1,4 [1,3; 2,0]	2,7 <sup>1</sup> [2,0; 3,7]	2,9 <sup>1</sup> [2,2; 4,1]	4,4 <sup>1234</sup> [3,5; 7,3]	3,0 <sup>1</sup> [2,0; 4,4]	3,4 <sup>12</sup> [2,2; 5,6]	5,4 <sup>123</sup> [3,2; 10,1]
SCC, нг/мл	1,5 [1,2; 1,9]	1,2 [1,0; 1,8]	2,1 <sup>12</sup> [1,5; 2,2]	1,6 [1,1; 2,1]	1,8 <sup>1</sup> [1,6; 2,7]	2,0 <sup>1</sup> [1,5; 3,2]	2,0 <sup>1</sup> [1,5; 4,5]

Примечание — <sup>1</sup> — достоверные отличия уровня показателей в крови пациентов с НМРЛ по сравнению с группой контроля; <sup>2</sup> — достоверные отличия уровня показателей в крови пациентов со II и III–IV стадиями НМРЛ по сравнению с I стадией; <sup>3</sup> — достоверные отличия уровня показателей в крови пациентов с III–IV стадиями НМРЛ по сравнению со II стадией.

Уровень ГК в сыворотке крови пациентов с НМРЛ и размером опухоли до 3 см была значительно выше в сравнении с группой контроля. При T2–T4 концентрация этого показателя возрастала еще сильнее и была выше, чем у пациентов с T1. Нами прослеживалась тенденция к увеличению содержания ГК в крови по мере роста первичной опухоли, однако статистически значимых различий ее концентрации в группах пациентов с T2, T3 и T4 не наблюдалось.

Концентрация опухолеассоциированного антигена CYFRA 21-1 возрастала в зависимости от размера опухоли только при АК. Так, в крови пациентов с T2 уровень CYFRA 21-1 демонстрировало тенденцию к увеличению по сравнению с T1, а при T3 — достигало максимальных значений и значительно превышало такое при T1 ( $p < 0,008$ ).

Доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, и концентрация ГК в крови пациентов с НМРЛ изменялись не только в зависимости от размера первичной опухоли, но и при распространении ее метастазов в регионарные лимфоузлы. У пациентов с АК и N1–N3 уровень этих показателей было значительно выше в сравнении с контрольной группой и пациентами без метастазов в регионарные лимфоузлы ( $p < 0,008$ ). Доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, в крови пациентов с ПКРЛ также возрастала в крови пациентов с N1–N2 в сравнении с N0, однако при дальнейшем распространении метастазов опухоли (N3), напротив, демонстрировала тенденцию к снижению. Концентрация ГК в крови пациентов с N1 при ПКРЛ не отличалась от

таковой при N0. Наряду с этим отмечался значительный рост содержания этого показателя в крови пациентов в более поздний период ПКРЛ (N2–N3) в сравнении с пациентами без метастазов ( $p < 0,008$ ).

MFI CXCR1 в гранулоцитах и концентрация CYFRA 21-1 в крови пациентов изменялись в зависимости от метастазирования опухоли лишь при АК. MFI CXCR1 в гранулоцитах при N2 превышает таковой при N0 ( $p < 0,008$ ), однако у пациентов с N3 вновь снижается. Концентрация CYFRA 21-1 не отличалась у пациентов без метастазов АК по сравнению с N1, однако при N2-3 она возрастала и была в 1,5 раза выше по сравнению с пациентами без метастазов в регионарные лимфоузлы.

У пациентов с отдаленными метастазами (M1) АК доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, и MFI CXCR1 в гранулоцитах в 1,3–1,5 раз выше, чем при M0 ( $p < 0,017$ ). Уровень ГК в сыворотке крови возрастает при наличии отдаленных метастазов НМРЛ в сравнении с пациентами без метастазов ( $p < 0,008$ ).

Значительный рост ГК и CYFRA 21-1 наблюдается у пациентов с отдаленными метастазами НМРЛ (IV стадия заболевания;  $p < 0,008$ ). Доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, и MFI CXCR1 в гранулоцитах возрастали в крови пациентов с отдаленными метастазами АК ( $p < 0,017$ ). Концентрация CXCL8 и доля моноцитов, снабженных CXCR1, в крови при IV стадии ПКРЛ была выше по сравнению с пациентами без отдаленных метастазов (таблицы 3, 4).

Таблица 3 – Концентрация CXCL8, CXCR1, CXCR2, ГК в крови пациентов с АК в зависимости от дескрипторов опухоли

Показатель	Размер опухоли			Коэффициент корреляции Спирмена R	
	T1	T2	T3		
CXCR1, гранулоциты, MFI	32,1 <sup>1</sup> [23,9; 44,2]	50,9 <sup>1,2</sup> [42,7; 64,7]	50,3 <sup>1,2</sup> [43,9; 60,9]	0,430	
CXCR2, лимфоциты, %	16,5 <sup>1</sup> [10,3; 19,1]	26,8 <sup>1,2</sup> [20,9; 34,3]	32,5 <sup>1,2</sup> [31,8; 41,3]	0,613	
ГК, нг/мл	22,4 <sup>1</sup> [15,1; 24,6]	28,7 <sup>1,2</sup> [26,0; 30,2]	33,1 <sup>1,2</sup> [27,0; 46,6]	0,657	
CYFRA 21-1	2,7 <sup>1</sup> [2,0; 3,7]	3,8 <sup>1</sup> [2,6; 6,4]	3,9 <sup>1,2</sup> [3,2; 5,8]	0,311	
Метастазы в регионарные лимфоузлы					
CXCR1, гранулоциты, MFI	N0	N1	N2	N3	0,451
	37,3 <sup>1</sup> [28,4; 50,7]	47,2 <sup>1</sup> [41,8; 56,9]	55,2 <sup>1,3</sup> [49,9; 54,4]	53,2 <sup>1</sup> [46,4; 60,7]	
CXCR2, лимфоциты, %	16,8 <sup>1</sup> [14,6; 21,4]	24,9 <sup>1,3</sup> [20,2; 34,2]	32,5 <sup>1,3</sup> [32,3; 34,3]	32,5 <sup>1,3</sup> [29,2; 32,5]	0,587
	ГК, нг/мл	23,8 <sup>1</sup> [21,4; 26,0]	28,7 <sup>1,3</sup> [26,7; 30,2]	30,2 <sup>1,3</sup> [30,1; 33,3]	
CYFRA 21-1 нг/мл	2,7 <sup>1</sup> [2,1; 3,3]	4,1 <sup>1</sup> [2,6; 7,4]	4,4 <sup>1,3</sup> [3,3; 7,4]	4,1 <sup>1,3</sup> [3,2; 5,8]	0,478

Окончание табл. 3

Показатель	Отдаленные метастазы	
	M0	M1
CXCR1, гранулоциты, MFI	47,2 <sup>1</sup> [32,9; 56,9]	62,5 <sup>1,4</sup> [51,0; 67,3]
CXCR2, лимфоциты, %	21,5 <sup>1</sup> [16,5; 32,5]	32,5 <sup>1,4</sup> [32,1; 33,9]
CYFRA 21-1, нг/мл	3,1 <sup>1</sup> [2,4; 4,5]	5,5 <sup>1,4</sup> [3,6; 9,8]
ГК, нг/мл	26,2 <sup>1</sup> [23,8; 30,2]	30,2 <sup>1,4</sup> [27,9; 31,6]

*Примечание* – <sup>1</sup> – достоверные отличия по сравнению со здоровыми людьми; <sup>2</sup> – достоверные отличия по сравнению с T1; <sup>3</sup> – достоверные отличия по сравнению с N0; <sup>4</sup> – достоверные отличия по сравнению с M0.

Таблица 4 – Концентрация CXCL8, CXCR1, CXCR2, ГК в крови пациентов с ПКРЛ в зависимости от дескрипторов опухоли

Показатель	Размер опухоли				Коэффициент корреляции Спирмена R
	T1	T2	T3	T4	
CXCR1, гранулоциты, MFI	32,7 <sup>1</sup> [18,5; 47,2]	47,4 <sup>1,2</sup> [36,4; 58,9]	57,9 <sup>1,2</sup> [47,3; 59,8]	82,4 <sup>1,2,3,4</sup> [57,6; 136,3]	0,549
CXCR2, лимфоциты, %	18,1 <sup>1</sup> [15,0; 18,8]	25,9 <sup>1,2</sup> [19,0; 29,5]	30,0 <sup>1,2</sup> [25,1; 36,5]	31,8 <sup>1,2,3</sup> [27,7; 36,7]	0,654
ГК, нг/мл	15,1 <sup>1</sup> [12,3; 21,9]	28,2 <sup>1,2</sup> [22,6; 39,6]	34,7 <sup>1,2</sup> [31,0; 47,5]	37,9 <sup>1,2</sup> [31,3; 46,4]	0,618
Метастазы в регионарные лимфоузлы					
CXCR2, лимфоциты, %	N0	N1	N2	N3	0,359
	25,1 <sup>1</sup> [17,6; 28,9]	30,3 <sup>1,5</sup> [29,7; 34,2]	29,6 <sup>1,5</sup> [24,4; 31,8]	27,8 <sup>1</sup> [20,7; 38,0]	
ГК, нг/мл	26,5 <sup>1</sup> [16,4; 35,5]	31,7 <sup>1</sup> [26,5; 35,3]	41,7 <sup>1,5</sup> [31,2; 52,7]	50,6 <sup>1,5</sup> [34,7; 53,5]	0,400
Отдаленные метастазы					
CYFRA 21-1, нг/мл	M0		M1		
	3,6 <sup>1</sup> [2,2; 5,8]		8,6 <sup>1,6</sup> [4,7; 17,4]		
ГК, нг/мл	28,2 <sup>1</sup> [20,3; 37,1]		46,7 <sup>1,6</sup> [32,1; 53,8]		
CXCR1, моноциты, %	2,5 <sup>1</sup> [1,6; 8,0]		3,3 <sup>1,6</sup> [2,2; 10,1]		
CXCL8, пг/мл	178,4 <sup>1</sup> [91,2; 295,0]		393,3 <sup>1,6</sup> [181,3; 691,6]		

*Примечание* – <sup>1</sup> – достоверные отличия по сравнению со здоровыми людьми; <sup>2</sup> – достоверные отличия по сравнению с T1; <sup>3</sup> – достоверные отличия по сравнению с T2; <sup>4</sup> – достоверные отличия по сравнению с T3; <sup>5</sup> – достоверные отличия по сравнению с N0; <sup>6</sup> – достоверные отличия по сравнению с M0.

Результаты ROC-анализа свидетельствуют, что 98,2 % пациентов с концентрацией ГК в крови выше 13,6 нг/мл имеют I–II стадии АК (специфичность — 71,1 %). У 77,8 % пациентов с ранними стадиями АК MFI CXCR1 в гранулоцитах превышает пороговое значение (30,5, специфичность — 97,6 %). У 76,9 % пациентов с I–II стадиями АК доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, в крови превышает пороговое значение (14,4 %, специфичность — 85,7 %).

У 89,7 % пациентов концентрация ГК в крови превышает пороговое значение (13,6 нг/мл), а у 71,1 % пациентов с уровнем этого показателя меньше ПКРЛ отсутствует. Диагно-

стические параметры определения MFI CXCR1 в гранулоцитах пациентов с I–II стадиями ПКРЛ превышают таковые при АК (диагностическая чувствительность — 78,5 %, специфичность — 97,6 % для порогового значения 30,0). Диагностическая чувствительность измерения относительного количества лимфоцитов, снабженных CXCR2, у пациентов с I–II стадиями ПКРЛ составила 77,6 %, а специфичность этого теста — 92,9 %, что значительно больше, чем при выявлении ранних стадий АК.

Эти же показатели возрастают в крови пациентов при III–IV стадиях НМРЛ и потому

могут использоваться с целью дифференцирования ранних и поздних стадий заболевания. Так, в крови 88,1 % пациентов с поздними стадиями АК концентрация ГК выше, чем 26,7 нг/мл (специфичность — 73,2 %). Определение MFI CXCR1 в гранулоцитах с этой целью обладает меньшей чувствительностью (77,5 %), но специфичность этого теста, напротив, выше (74,1 %, при пороговом значении 47,5). 95,0 % пациентов с поздними стадиями АК имеют уровень доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, выше порогового значения 22,8 % (специфичность — 78,8 %).

В крови 80,4 % пациентов с III и IV стадиями ПКРЛ концентрация ГК выше порогового значения 31,2 нг/мл (специфичность — 77,9 %), что превышает соответствующие параметры этого теста при АК. Определение MFI CXCR1 в гранулоцитах с целью дифференцирования ранних и поздних стадий ПКРЛ обладает более высокой диагностической эффективностью в сравнении с АК. Так, в гранулоцитах 91,5 % пациентов с III и IV стадиями ПКРЛ этот показатель выше порогового значения 54,4 (специфичность — 83,1 %). Диагностическая чувствительность измерения относительного количества лимфоцитов, снабженных CXCR2, у пациентов с поздними стадиями ПКРЛ уступает таковой при АК и составляет 78,3 %, однако и специфичность этого теста выше (84,5 % при пороговом значении 27,4 %).

Поскольку уровень всех упомянутых показателей существенно отличается в крови пациентов со II стадией в сравнении с I как при АК, так и при ПКРЛ, была предпринята попытка использовать их в качестве дополнительных критериев дифференцирования этих стадий. Так, MFI CXCR1 в гранулоцитах 86,2 % пациентов со II стадией АК превышает пороговое значение 36,6 (специфичность — 72,0 %). Диагностическая чувствительность и специфичность определения этого показателя с той же целью у пациентов со II стадией ПКРЛ ниже (84,1 и 66,7 %, соответственно при пороговом значении 32,9).

Диагностическая чувствительность определения доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, у пациентов со II стадией АК (77,8 %) превышает таковую при II стадии ПКРЛ (70,3 %) при сопоставимой диагностической специфичности (76,0 и 76,2 % соответственно; пороговые значения — 18,4 и 18,6 % соответственно).

У 72,4 % пациентов с уровнем ГК в крови выше 25,6 нг/мл диагностирована II стадия АК. При ПКРЛ диагностическая чувствительность

этого теста на 14 % выше (88,6 %, пороговое значение — 18,6 нг/мл), однако специфичность снижена в сравнении с таковой при АК (92,6 и 79,2 % соответственно).

Концентрация в крови антигена CYFRA 21-1 существенно возростала в крови пациентов безотносительно гистологического подтипа НМРЛ уже при I–II стадии заболевания. У 88,9 % пациентов с ранними стадиями АК и 85,2 % пациентов с ранними стадиями ПКРЛ его уровень превышало пороговые значения (1,6 и 1,7 нг/мл, специфичность — 66,7 %). При выявлении III–IV стадий АК чувствительность и специфичность определения концентрации CYFRA 21-1 в крови оказались выше, чем при ПКРЛ. Так, доля пациентов с III–IV стадиями АК и уровнем CYFRA 21-1 в сыворотке крови >3,1 нг/мл, составляет 87,2 %. У пациентов с III–IV стадиями ПКРЛ диагностическая чувствительность определения этого маркера составила 67,5 % при пороговом значении 3,8 нг/мл. Специфичность этого теста при поздних стадиях АК составила 70,4 %, а при ПКРЛ — 64,8 %.

Таким образом, концентрация ГК в крови, MFI CXCR1 в гранулоцитах и доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, возрастали в крови пациентов с АК и ПКРЛ уже при I стадии опухолевого процесса ( $p < 0,008$ ). Отмечен значительный рост содержания этих показателей в крови пациентов со II стадией АК и ПКРЛ в сравнении с I стадией и еще более существенное их увеличение при III–IV стадиях. Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о взаимосвязи средней силы между MFI CXCR1 в гранулоцитах, долей лимфоцитов, снабженных CXCR2, концентрацией ГК в крови и стадиями АК ( $R = 0,565, 0,661, 0,692$  соответственно) и ПКРЛ ( $R = 0,578, 0,610$  и  $0,681$  соответственно). Данные литературы, посвященные определению содержания этих показателей в крови пациентов со злокачественными новообразованиями, немногочисленны. Тем не менее, можно встретить указания на значительное увеличение концентрации ГК в крови пациентов с НМРЛ безотносительно гистологического подтипа опухоли, что согласуется с полученными нами результатами [8]. Сведения об определении уровня рецепторов CXCR1 и CXCR2 в клетках крови пациентов с НМРЛ в литературе отсутствуют, хотя ранее сообщалось о заметном увеличении их концентрации в опухолевой ткани при этом заболевании [4].

Согласно результатам ROC-анализа чувствительность и специфичность определения



доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, у пациентов с I и II стадиями ПКРЛ составили 77,6 и 92,9 % соответственно, что значительно выше, чем при АК (76,9 и 85,7 % соответственно). Диагностические параметры определения уровня ГК в крови при ранних стадиях АК, напротив, выше, чем при ПКРЛ. Диагностическая чувствительность определения MFI CXCR1 в гранулоцитах пациентов с ранними стадиями АК и ПКРЛ сопоставима (77,8 и 78,5 % соответственно), однако специфичность этого теста при ПКРЛ (92,9 %) больше, чем при АК (85,7 %). Диагностическая чувствительность измерения концентрации CYFRA 21-1 при выявлении ранних стадий АК составляет 88,9 %, а специфичность — 66,7 %. При I–II стадиях ПКРЛ соответствующие параметры составили 85,2 и 66,7 %. Диагностические параметры измерения концентрации ГК в крови пациентов с целью выявления III и IV стадий АК существенно не отличаются от таковой при ПКРЛ. Определение MFI CXCR1 в гранулоцитах пациентов с III–IV стадиями ПКРЛ, напротив, обладает большей эффективностью при ПКРЛ в сравнении с АК. Измерение относительного количества лимфоцитов, снабженных CXCR2, позволяет выявить III и IV стадии АК с вероятностью истинно положительного результата, существенно превосходящей таковую при ПКРЛ (95,0 и 78,3 %), однако специфичность этого теста при АК ниже, чем при ПКРЛ (78,8 и 84,5 % соответственно).

Концентрация классического опухолеассоциированного антигена CYFRA 21-1 в крови пациентов с АК и ПКРЛ возрастает в сравнении с контрольной группой уже при I–II стадиях опухолевого процесса и еще более значительно увеличивается в поздний период заболевания. Диагностическая чувствительность определения классического опухолеассоциированного антигена CYFRA 21-1 в крови пациентов с I–II и III–IV стадиями АК и ПКРЛ, в большинстве случаев не уступает таковой концентрации ГК в крови, MFI CXCR1 в гранулоцитах, доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, однако специфичность измерения содержания CYFRA 21-1 в крови при НМРЛ ниже, чем у названных выше показателей. Наряду с этим нами не обнаружено существенных различий концентрации этого антигена в крови пациен-

тов со II стадией АК и ПКРЛ по сравнению с I стадией. В литературе отсутствуют сведения о диагностических параметрах определения CYFRA 21-1 при ранних и поздних стадиях АК и ПКРЛ в отдельности, однако диагностическая эффективность его измерения в крови пациентов с ранними стадиями НМРЛ безотносительно гистологического подтипа составляет около 77,3 % [9].

MFI CXCR1 в гранулоцитах, доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, и уровня ГК в крови, в отличие от CYFRA 21-1, могут использоваться с целью дифференцирования I стадии АК и ПКРЛ от II. Диагностические параметры определения MFI CXCR1 в гранулоцитах пациентов со II стадией АК превышает таковые при ПКРЛ и оптимальных пороговых значениях. Чувствительность измерения уровня ГК в крови пациентов со II стадией АК, напротив, ниже, чем при ПКРЛ (72,4 % и 88,6 %, соответственно), а специфичность — выше (96,3 и 79,2 % соответственно). Определение доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, демонстрирует большую вероятность верно выявленной II стадии АК в сравнении с ПКРЛ (77,5 и 70,3 %) при сопоставимой диагностической специфичности.

**Заключение.** Несмотря на сравнительно высокие диагностические параметры определения названных выше показателей у пациентов с АК и ПКРЛ, ни один из них не обладает одновременно высокой диагностической чувствительностью и специфичностью при выявлении как ранних, так и поздних стадий АК и ПКРЛ. Ввиду этого задача достижения высоких диагностических параметров для этих показателей остается актуальной. Одним из подходов для решения этой задачи является комбинация лабораторных тестов [3]. Полученные нами данные убеждают в целесообразности использования различных комбинаций для АК и ПКРЛ. Перспективой для дальнейшего исследования является создание комбинаций, включающих концентрацию ГК и CYFRA 21-1 в сыворотке крови, MFI CXCR1 в гранулоцитах и долю лимфоцитов, снабженных CXCR2, для определения I, II и III–IV стадий АК и ПКРЛ с тем, чтобы максимально повысить эффективность использования лабораторных тестов для диагностики этого заболевания.

### Список цитированных источников

1. Lung squamous cell lung carcinoma and lung adenocarcinoma differential gene expression regulation through pathways of Notch, Hedgehog, Wnt and ErbB signaling / D. Anusewitz [et al.] // Scientific reports. — 2020. — Vol. 10. — P. 21128.

2. CYFRA 21-1 tests in the diagnosis of non-small cell lung cancer: a meta-analysis / Lei Fu [et al.] // Int. J. of Biological Markers. — 2019. — Vol. 34, № 3. — P. 251–261.
3. Assessment of seven clinical tumor markers in diagnosis of non-small cell lung cancer / C. Zhong-qing [et al.] // Disease Markers. — 2018. Dec. 11. — P. 9845123.
4. CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer / Qian L. [et al.] // Cytokine and Growth Factor Rev. — 2016. — Vol. 31. — P. 61–71.
5. Expression of CD44 variants in lung cancer and its relationship to hyaluronan binding / Y. Matsubara [et al.] // J. Int. Med. Res. — 2000. — Vol. 28, № 13. — P. 78–90.
6. Хемокины CXCL5, CXCL8 и их рецепторы CXCR1, CXCR2 — потенциальные биомаркеры немелкоклеточного рака легкого // А. Д. Таганович [и др.] // Лабораторная диагностика: Восточная Европа. — 2020. — Т. 9, № 3. — С. 252–271.
7. Взаимосвязь количественных характеристик CD44 в клетках крови с дескрипторами немелкоклеточного рака легкого / А. Д. Таганович [и др.] // Онкологический журнал. — 2020. — Т. 14, № 4. — С. 16–27.
8. Clinical utility of hyaluronic acid values in serum and bronchoalveolar lavage fluid as tumor marker of bronchogenic carcinoma / J. Hernandez [et al.] // Int. J. of Biological Markers. — 1995. — Vol. 10, № 3. — P. 149–155.
9. CYFRA 21-1 new marker for non-small cell lung cancer / J. Niklinski [et al.] // Pneumonol Alergol Pol. — 1994. — Vol. 62, № 5–6. — P. 227–232.

## The level of blood cell receptors and its ligands in blood serum in the diagnosis of lung adenocarcinoma and squamous cell lung carcinoma

*Murashka D. I., Tahanovich A. D., Kauhanka M. M.*

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

There is a need to search for informative biomarkers of adenocarcinoma (AC) and squamous cell lung cancer (SCC) that allow one to judge the extent of the tumor. The study substantiates the expediency of determining the fluorescence intensity (MFI) of CXCR1 in granulocytes, the proportion of lymphocytes equipped with CXCR2, and the concentration of hyaluronic acid (HA) in AC and SCC. For AC I and II stages, the diagnostic efficiency of measuring the concentration of HA in the blood, the proportion of lymphocytes supplied with CXCR2, and MFI CXCR1 in granulocytes is 87,2 %, 80,8, 86,5 %, at III and IV stages — 79,6 %, 84,8, 75,5 %, respectively. The diagnostic efficiency of the same indicators in stages I and II of SCC was 83,0 %, 84,0 %, 85,9 % and in stages III–IV — 78,9 %, 81,7, 86,6 %, respectively. The diagnostic efficiency of the same indicators in stages I–II of SCLC was 89.6 %, 86.6, 77.8 %, and in stages III–IV — 81.6 %, 81.7 % and 87.5 %, respectively. A significant increase in the concentration of HA, the proportion of lymphocytes supplied with CXCR2, MFI CXCR1 in the blood granulocytes of patients with stage II non-small cell lung cancer in comparison with stage I was found. The diagnostic sensitivity of determining these indicators as additional criteria that distinguish stage I from stage II is 82,1 %, 76,9, 79.6 % for AC, and 86,8 %, 72,4, 78,4 %, respectively, for SCC.

**Keywords:** non-small cell lung cancer, hyaluronic acid, CXCR1, CXCR2.

*Поступила 06.09.2022*

УДК 616.127-005.4-092.4:612.8.04:616-092

## УЧАСТИЕ М-ХОЛИНОРЕАКТИВНЫХ СИСТЕМ В РЕАЛИЗАЦИИ КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ L-ЛАКТАТА ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС

*Чепелев С. Н.<sup>1</sup>, Висмонт Ф. И.<sup>1</sup>, Губкин С. В.<sup>2</sup>, Висмонт А. Ф.<sup>1</sup>, Юшкевич П. Ф.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь;*

*<sup>2</sup>Государственное научное учреждение  
«Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Защита миокарда от ишемических и реперфузионных повреждений — важная задача современной экспериментальной и клинической медицины. Данный тип повреждения является ключевым звеном патогенеза ишемической болезни сердца, и прежде всего острого инфаркта миокарда — социально-экономически значимого заболевания, являющегося одной из основных причин потери трудоспособности и смертности среди взрослого населения в Республике Беларусь.

Целью исследования явилось выяснение участия М-холинореактивных систем в реализации кардиопротекторной эффективности посткондиционирования с помощью L-лактата при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс.

В опытах на крысах установлено, что посткондиционирование с помощью L-лактата оказывает инфаркт-лимитирующий эффект при ишемии-реперфузии миокарда как у молодых, так и у старых животных, однако в условиях системного действия в организме атропина (2 мг/кг) инфаркт-лимитирующий эффект посткондиционирования с помощью L-лактата частично сохранялся только у старых крыс. По-видимому, активность периферических М-холинореактивных систем имеет значение в механизмах реализации кардиопротекторных эффектов посткондиционирования с помощью L-лактата у молодых, но не у старых крыс.

**Ключевые слова:** кардиопротекция, L-лактат, ишемия, реперфузия, атропин.

**Введение.** В настоящее время одним из самых распространенных видов сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) является ишемическая болезнь сердца (ИБС). Учитывая большую частоту инвалидизации и сложность реабилитации пациентов с инфарктом миокарда, ИБС представляет собой не только значимую медицинскую, но и важную государственную проблему. В связи с этим поиск новых эффективных методов предотвращения или ослабления ишемического повреждения миокарда и выяснение механизмов его реализации остается актуальной задачей современной экспериментальной и клинической медицины.

В последнее десятилетие объектом повышенного интереса ведущих мировых исследователей в области экспериментальной и клинической кардиологии являются кардиопротекторные (противоишемический и антиаритмический) эффекты дистантного ишеми-

ческого пре- и посткондиционирования (ДПост), которые воспроизводятся ишемией конечностей, осуществляемой до или после острой коронароокклюзии соответственно.

Для эффективного применения любого варианта прекодиционирования (Пре) как меры профилактической кардиопротекции необходимо точно знать, когда наступит ишемия, требующая защиты миокарда. Однако ввиду того, что это практически невозможно, мощный кардиопротекторный потенциал Пре, как правило, клинически не используется. Следовательно, ишемическое посткондиционирование (Пост), особенно ДПост, имеющее несомненное преимущество перед различными вариантами Пре, можно успешно применять в клинической практике наряду с другими рекомендациями. Во-первых, это чрезвычайно безопасно и дешево, а также малоинвазивно; во-вторых, его можно применять при оказании

скорой медицинской помощи и ко всем пациентам с ишемией миокарда, получающим реперфузионное лечение.

Впервые ишемическое Пост было описано Z.-Q. Zhao с соавт. (2003), которые сообщили, что ишемическое Пост, состоящее из коротких прерывистых циклов ишемии-реперфузии миокарда после острой коронароокклюзии может смягчить последствия реперфузионного повреждения. Данный феномен получил название «локальное ишемическое Пост».

Так, G. Andreka с соавт. (2007) в экспериментах на свиньях продемонстрировал ограничение размеров зоны некроза миокарда при воздействии четырьмя последовательными 5-минутными эпизодами ишемии/реперфузии задней конечности, осуществляемыми непосредственно после окончания окклюзии инфаркт-связанной коронарной артерии. Этот феномен получил название ДПост.

До недавнего времени считалось, что способность ДПост оказывать кардиопротекторное действие ограничена первыми минутами после восстановления коронарного кровотока. Однако несколько позже M. Basalay с соавт. (2012) в экспериментах на крысах обнаружил, что кратковременная (15-минутная) ишемия задних конечностей оказывает выраженное инфаркт-лимитирующее действие на миокард не только в первые минуты реперфузии, но и при ее осуществлении на 10-й минуте после восстановления коронарного кровотока.

За последнее десятилетие данные ряда фундаментальных научных и клинических исследований подтвердили, что ишемическое Пост является эффективным методом снижения реперфузионного повреждения [1].

К настоящему времени накоплен достаточно большой объем знаний о феномене ишемического кондиционирования и его защитном влиянии на миокард. Однако биохимические механизмы кардиопротекции, лежащие в основе инфаркт-лимитирующего эффекта ишемического кондиционирования и особенно ДПост при ишемии-реперфузии миокарда, все еще остаются малоизученными [1].

Принимая во внимание известные факты о том, что гипоперфузия, ишемия органов и тканей приводят к повышению уровня молочной кислоты (лактата) в крови, а лактат в свою очередь оказывает коронарное сосудорасширяющее действие за счет выделения эндотелием сосудов монооксида азота (NO) [2], а также способен ингибировать перекисное окисление липидов и свободнорадикальные процессы [3], выраженность которых при реперфузии возрастает

и может использоваться тканями, особенно миокардом, после гипоксии в большей степени, чем глюкоза [4], были основания полагать, что повышенный уровень лактата в крови (гиперлактатемия) сможет уменьшить реперфузионное повреждение миокарда. Так, в проведенном авторами статьи исследовании в 2020 г. было установлено, что после воспроизведения ДПост у экспериментальных животных в крови повышается уровень L-лактата, а введение нейтрального L-лактата на 25-й минуте реперфузии в дозе 10 мг/кг приводит к снижению размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка на 28,2 % ( $p < 0,05$  по сравнению с интактными животными), т. е. ослабляет реперфузионное повреждение сердца [5].

Достаточно долгое время лактат рассматривался как тупиковый метаболит, агент усталости или метаболический яд. В медицине было принято считать, что повышение уровня лактата в крови коррелирует с тяжестью заболевания или травмы. В последнее время в научной литературе стали появляться сведения о ранее неизвестных эффектах лактата и начали резко изменяться представления о роли лактата в физиологии и медицине. Так, в ряде исследований показано, что лактат участвует в регуляции метаболизма и играет ключевую роль в регулировании различных биологических процессов [6]. Выявлено, что L-лактат постоянно образуется и используется в различных клетках организма в полностью аэробных условиях. Лактат, перемещаясь между клетками-продуцентами и клетками-потребителями, выполняет, по крайней мере, три важные функции: является основным источником энергии, предшественником глюкозы в глюконеогенезе и сигнальной молекулой. Концепции «лактатного челнока» описывают роль лактата в доставке окислительных и глюконеогенных субстратов, а также в передаче сигналов клетками [6].

В современной литературе имеются также, хотя и немногочисленные, экспериментальные исследования, посвященные выяснению механизмов влияния лактата на сердечную деятельность. J. Zhang с соавт. (2021) в опытах на мышах показал, что лактат ускоряет поляризацию макрофагов M2, продуцирующих противовоспалительные цитокины, через сигнальный путь STAT3, а также оказывает кардиозащитное действие после инфаркта миокарда за счет улучшения фракции выброса и фракционного укорочения, снижения апоптоза кардиомиоцитов и увеличения плотности микрососудов в зоне ишемии.



В клинической практике в исследовании M. Nalos с соавт. (2014) показано, что инфузия полумолярного лактата натрия может улучшить работу сердца у пациентов с острой сердечной недостаточностью без какого-либо пагубного воздействия на функцию органов. Кроме того, исследования Т. Коуата с соавт. выявили, что Пост с кровью, обогащенной лактатом, обеспечивает потенциальную кардиопротекцию у пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST, которым выполнялось первичное чрескожное коронарное вмешательство (2016). Можно констатировать, что идет процесс накопления данных, свидетельствующих о том, что лактат может быть многообещающим средством лечения ССЗ.

Сегодня имеется ряд исследований, посвященных вопросу влияния пожилого возраста на воспроизводимость инфаркт-лимитирующего эффекта Пост у экспериментальных животных, однако выводы, сделанные на их основании, неоднозначны и во многом являются противоречивыми.

В настоящее время накоплено большое количество сведений, подчеркивающих важную роль парасимпатической регуляции сердечной деятельности в механизмах защиты миокарда от повреждений. В частности, согласно современным представлениям, парасимпатическая регуляция сердечной деятельности имеет важное значение в механизмах защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждений [7].

Известно, что процессы старения организма сопровождаются ослаблением влияния парасимпатической регуляции на сердце, что связано с деструкцией холинергических нервных окончаний, снижением интенсивности процессов синтеза ацетилхолина и числа М-холинорецепторов в миокарде.

Принимая во внимание тот факт, что в организме старых животных происходят значительные морфофункциональные и биохимические изменения, были основания полагать, что возрастные изменения органов и тканей, и в частности, изменения в них активности периферических М-холинореактивных систем могут оказывать существенное влияние на кардиопротекторную эффективность Пост с помощью L-лактата у старых крыс. В то же время в современной литературе отсутствуют сведения, касающиеся выяснению кардиопротекторной эффективности Пост с помощью L-лактата при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс в условиях системного действия в организме животных блокатора М-холинореактивных систем атропина.

**Цель работы** — выяснение участия М-холинореактивных систем в реализации кардиопротекторной эффективности Пост с помощью L-лактата при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 101 наркотизированных нелинейных белых крысах-самцах, разделенных на две возрастные группы: 43 молодых (молод.) крыс массой 200–250 г в возрасте  $4 \pm 1$  мес. и 58 старых (стар.) крыс массой 400–450 г в возрасте  $24 \pm 1$  мес. Из них, с учетом выживаемости животных после острой ишемии миокарда (ОИМ) и последующих процедур, для обработки и анализа результатов исследования было отобрано 72 крысы (по 36 молодых и старых). Все животные в начале эксперимента перед 30-минутной ишемией и последующей 120-минутной реперфузией миокарда были разделены на 6 групп: 1-я (Контроль<sub>молод</sub>) — группа молодых крыс, которым проводилась ишемия-реперфузия миокарда ( $n = 14$ ); 2-я (Контроль<sub>стар</sub>) — группа старых крыс, которым проводилась ишемия-реперфузия миокарда ( $n = 22$ ); 3-я (Лактат<sub>молод</sub>) — группа молодых крыс, которым через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену L-лактат в дозе 10 мг/кг ( $n = 14$ ); 4-я (Лактат<sub>стар</sub>) — группа старых крыс, которым через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену L-лактат в дозе 10 мг/кг ( $n = 17$ ); 5-я (Атропин + Лактат<sub>молод</sub>) — группа молодых крыс, которым проводилась ишемия-реперфузия миокарда и за 10 мин до воспроизведения Пост с помощью L-лактата вводили в левую общую яремную вену атропин (Sigma-Aldrich, США) в дозе 2 мг/кг ( $n = 15$ ); 6-я (Атропин + Лактат<sub>стар</sub>) — группа старых крыс, которым проводилась ишемия-реперфузия миокарда и за 10 мин до воспроизведения Пост с помощью L-лактата вводили в левую общую яремную вену атропин (Sigma-Aldrich, США) в дозе 2 мг/кг ( $n = 19$ ).

Эксперименты проводились в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными. Животные содержались в стандартных условиях вивария УО «Белорусский государственный медицинский университет» с свободным доступом к пище и воде.

Для наркотизации животных использовали тиопентал натрия в дозе 50 мг/кг внутривенно с последующей внутривенной инфузией в левую общую яремную вену поддерживающей дозы 10 мг/кг·ч с помощью инъекционного насоса Braun (Германия). Крыс переводили на искусственное дыхание атмос-

ферным воздухом через трахеостому (частота дыхания  $56 \cdot 60$  в мин) при помощи аппарата искусственной вентиляции легких (Harvard, Великобритания). В ходе экспериментов непрерывно регистрировали электрокардиограмму (ЭКГ) во II стандартном отведении и системное артериальное давление (АД), а полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Spike 4 (Великобритания). Для измерения АД прямым методом крысам канюлировали правую общую сонную артерию. Температуру тела измеряли в прямой кишке с помощью электротермометра (Harvard, Великобритания) и поддерживали электрогрелкой на уровне  $37,0 \pm 0,5$  °С. Грудную клетку наркотизированного животного вскрывали в IV межреберном промежутке слева. После периода 15-минутной стабилизации гемодинамики крысам выполняли 30-минутную окклюзию передней нисходящей ветви левой коронарной артерии (ЛКА) путем механического ее пережатия при помощи лигатуры. Реперфузия миокарда достигалась снятием лигатуры. Длительность реперфузии составляла 120 мин.

На протяжении эксперимента у животных изучены следующие показатели гемодинамики: среднее АД ( $AD_{cp}$ ), частота сердечных сокращений (ЧСС) и двойное произведение (ДП).  $AD_{cp}$  рассчитывали как АД диастолическое +  $1/3$  (АД систолическое — АД диастолическое), ДП — как  $(ЧСС \cdot АД_{систолическое})/100$ . Для оценки антиаритмического эффекта подсчитывали общую длительность нарушений сердечного ритма во время 30-минутной острой коронарной окклюзии — фибрилляции желудочков (ФЖ), пароксизмальной желудочковой тахикардии (ПЖТ), парной желудочковой экстрасистолии, желудочковой экстрасистолии по типу бигеминии, а также определяли наличие реперфузионных нарушений сердечного ритма.

Зону риска определяли путем введения в левую общую яремную вену 0,5 мл 5%-го раствора синьки Эванса (Sigma-Aldrich, США) в конце реперфузии при повторном кратковременном пережатии лигатурой ЛКА. Для идентификации зоны риска в миокарде левого желудочка крыс использовали метод, основанный на определении активности дегидрогеназ. Зону риска определяли как зону, не окрашенную в синий цвет. Затем сердце извлекали и отделяли от него левый желудочек. После замораживания в морозильной камере (при  $-20$  °С в течение 30 мин) левый желудочек разрезали на 6 поперечных срезов, которые в последующем взвешивали и сканировали с обеих сторон. После этого для идентификации зоны некроза

срезы помещали в 1%-й раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида на 15 мин при температуре 37,0 °С. Жизнеспособный миокард (клетки, сохранившие дегидрогеназную активность) окрашивался в кирпично-красный цвет, а некротизированная ткань была бледно-желтой. После 24-часовой инкубации срезов в 10%-м растворе формалина в термостате при температуре 37,0 °С срезы сканировали повторно для определения соотношения площадей зоны риска и зоны некроза. Размеры зон риска и некроза определяли при помощи компьютерной планиметрии с использованием программы Adobe Photoshop CC 2017.

Изучение кардиопротекторной эффективности Пост с помощью L-лактата при ишемии-реперфузии миокарда у крыс проводилось у животных, которым через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену 0,5 мл 40 мМоль нейтрализованного раствора L-(+)-молочной кислоты (Sigma-Aldrich, США), т. е. в дозе 10 мг/кг. Для изготовления нейтрализованного L-лактата для инъекций молочную кислоту растворяли в 0,9%-м растворе NaCl с последующим доведением pH до 7,4 с помощью NaOH (10 N).

Доза L-лактата (10 мг/кг) была выбрана нами с целью обеспечить уровень L-лактата в крови, близкий к тому, что имел место после 15-минутного наложения лигатур на обеих бедренных артериях [5]. Уровень L-лактата в цельной крови, взятой из левой общей яремной вены, определяли при помощи анализатора Lactate Pro 2 (Arkray, Япония) малообъемным методом с помощью тест-полосок Lactate Pro 2 Test Strip для биохимических исследований (Arkray, Япония).

Изучение кардиопротекторной эффективности Пост с помощью L-лактата при ишемии-реперфузии миокарда у старых и молодых крыс в условиях блокады M-холинореактивных систем проводилось у животных, которым за 10 мин до воспроизведения Пост с помощью L-лактата вводили в левую общую яремную вену 0,2%-го раствора M-холиноблокатора атропина (Sigma-Aldrich, США). Доза препарата составила 2 мг/кг.

Полученные результаты анализировались с использованием программного пакета GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США). Для оценки нормальности распределения анализируемых показателей применяли критерий Колмогорова — Смирнова. Статистическую значимость различий полученных данных — зон риска, зон некроза, показателей гемодинамики — между группами животных оценивали при помощи однофакторного дисперсионного

анализа с использованием тестов множественных сравнений Данна и Бонферрони. Результаты исследования при их параметрическом распределении представляли в виде среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости различий данных в случае их непараметрического распределения использовали критерий Краскала — Уоллиса и тест множественных сравнений Данна. При непараметрическом распределении результаты исследования были представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (25-й; 75-й процентиля). Уровень  $p < 0,05$  рассматривали как статистически значимый.

**Результаты и их обсуждение.** Выживаемость крыс после острой коронарной окклюзии составила 71,3 % (29 крыс из 101 погибли в период ОИМ и последующей реперфузии). При этом в группе Контроль<sub>молод</sub> выживаемость животных составила 85,7 %; в группе Контроль<sub>стар</sub> — 54,5 %; в группе Лактат<sub>молод</sub> — 85,7 %; в группе Лактат<sub>стар</sub> — 70,6 %; в группе Атропин + Лактат<sub>молод</sub> — 80,0 %; в группе Атропин + Лактат<sub>стар</sub> — 63,2 %. Так, у старых крыс за время 30-минутной коронароокклюзии и последующей 120-минутной реперфузии имело место значительное снижение выживаемости по сравнению с молодыми крысами (погибло

22 старых и 7 молодых крыс), что свидетельствует о более чем двукратном снижении устойчивости миокарда старых крыс к повреждению, вызванному его длительной ишемией, а также реперфузией. Таким образом, с учетом выживаемости животных в экспериментальных группах осталось по 12 крыс в каждой.

Установлено, что в группах Контроль<sub>молод</sub>, Контроль<sub>стар</sub>, Лактат<sub>молод</sub>, Лактат<sub>стар</sub>, Атропин + Лактат<sub>молод</sub> и Атропин + Лактат<sub>стар</sub> во время ОИМ имело место статистически значимое снижение показателя АД<sub>ср</sub> ( $p < 0,05$ ) по сравнению с его исходными значениями. В начале реперфузии в группах Контроль<sub>стар</sub>, Лактат<sub>стар</sub>, Атропин + Лактат<sub>молод</sub> и Атропин + Лактат<sub>стар</sub> также имело место статистически значимое снижение показателя АД<sub>ср</sub> ( $p < 0,05$ ) по сравнению с его исходными значениями. У животных, которым осуществлялось введение в левую общую яремную вену 0,2%-го раствора М-холиноблокатора атропина в дозе 2 мг/кг за 10 мин до Пост с помощью лактата, отмечалось статистически значимое повышение показателя ЧСС ( $p < 0,01$ ) по сравнению с его исходными значениями на 30, 60, 90 и 120 мин реперфузии. Изменение показателей гемодинамики на протяжении эксперимента у старых и молодых крыс представлено в таблице.

Таблица — Изменение показателей гемодинамики у крыс исследуемых групп на протяжении эксперимента

Показатель гемодинамики	Контроль		Лактат		Атропин + Лактат		
	Молодые (n = 12)	Старые (n = 12)	Молодые (n = 12)	Старые (n = 12)	Молодые (n = 12)	Старые (n = 12)	
До начала ОИМ	АД <sub>ср</sub>	81 $\pm$ 5	88 $\pm$ 5	82 $\pm$ 3	87 $\pm$ 5	84 $\pm$ 3	89 $\pm$ 4
	ЧСС	415 $\pm$ 16	448 $\pm$ 17	410 $\pm$ 15	439 $\pm$ 18	415 $\pm$ 13	435 $\pm$ 19
Начало ОИМ	АД <sub>ср</sub>	68 $\pm$ 4*	70 $\pm$ 5*	69 $\pm$ 4*	71 $\pm$ 4*	68 $\pm$ 5*	72 $\pm$ 4*
	ЧСС	430 $\pm$ 14	408 $\pm$ 24	434 $\pm$ 16	404 $\pm$ 17	426 $\pm$ 19	424 $\pm$ 22
Начало реперфузии	АД <sub>ср</sub>	75 $\pm$ 5	73 $\pm$ 4*	76 $\pm$ 4	74 $\pm$ 5*	73 $\pm$ 3	77 $\pm$ 4*
	ЧСС	433 $\pm$ 23	407 $\pm$ 31	420 $\pm$ 23	399 $\pm$ 35	416 $\pm$ 17	427 $\pm$ 18
30' реперфузии	АД <sub>ср</sub>	77 $\pm$ 4	76 $\pm$ 5	75 $\pm$ 4	77 $\pm$ 5	75 $\pm$ 5	78 $\pm$ 4
	ЧСС	439 $\pm$ 19	404 $\pm$ 24	424 $\pm$ 21	403 $\pm$ 29	495 $\pm$ 21**	514 $\pm$ 24**
60' реперфузии	АД <sub>ср</sub>	76 $\pm$ 5	78 $\pm$ 6	78 $\pm$ 5	78 $\pm$ 4	76 $\pm$ 4	79 $\pm$ 5
	ЧСС	432 $\pm$ 16	398 $\pm$ 23	415 $\pm$ 21	406 $\pm$ 21	502 $\pm$ 20**	521 $\pm$ 23
90' реперфузии	АД <sub>ср</sub>	78 $\pm$ 4	78 $\pm$ 5	78 $\pm$ 4	80 $\pm$ 4	77 $\pm$ 5	81 $\pm$ 4
	ЧСС	420 $\pm$ 16	393 $\pm$ 25	417 $\pm$ 18	416 $\pm$ 24	491 $\pm$ 17**	512 $\pm$ 20
120' реперфузии	АД <sub>ср</sub>	80 $\pm$ 5	79 $\pm$ 5	80 $\pm$ 3	81 $\pm$ 5	81 $\pm$ 4	83 $\pm$ 3
	ЧСС	413 $\pm$ 17	387 $\pm$ 25	420 $\pm$ 17	421 $\pm$ 21	484 $\pm$ 22**	503 $\pm$ 19**

\*  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$  — различия статистически значимы по сравнению с исходными значениями.

При проведении исследования установлено, что величина ДП в анализируемых группах крыс до начала острой коронарной окклю-

зии статистически значимо не различалась. Следовательно, были основания полагать, что животные всех анализируемых групп до начала

эксперимента характеризовались сходной потребностью миокарда в кислороде.

При изучении антиаритмической эффективности Пост с помощью L-лактата при

ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс в условиях системного действия в организме животных блокатора М-холино-реактивных систем атропина (2 мг/кг) были получены следующие результаты продолжи-

тельности аритмий: Контроль<sub>молод</sub> — 167 (49; 233) с; Контроль<sub>стар</sub> — 237 (128; 331) с; Лактат<sub>молод</sub> — 145 (27; 192) с; Лактат<sub>стар</sub> — 97 (66; 154) с; Атропин + Лактат<sub>молод</sub> — 182 (54; 258) с и Атропин + Лактат<sub>стар</sub> — 192 (77; 314) с (рисунок 1).

В ходе исследования также установлено, что в группе Контроль<sub>молод</sub> у 9 из 12 крыс отмечалась ФЖ, а у 11 животных данной группы была выявлена ПЖТ. Реперфузионные нарушения сердечного ритма имели место у 10 крыс данной группы. В группе Контроль<sub>стар</sub> в период острой коронарной окклюзии у 11 из 12 крыс отмечались ФЖ и ПЖТ. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма наблюдались также у 11 животных данной группы. В группе Лактат<sub>молод</sub> в период острой коронарной окклюзии у 9 из 12 крыс отмечались ФЖ и ПЖТ. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма наблюдались у 7 животных данной группы. В группе Лактат<sub>стар</sub> в период острой коронарной окклюзии у 11 из 12 крыс отмечалась ФЖ, а ПЖТ имела место у 10 крыс. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма наблюдались у 8 животных данной группы. В группе Атропин + Лактат<sub>молод</sub> в период 30-минутной ишемии миокарда ФЖ и ПЖТ были выявлены у 11 из 12 животных. Реперфузионные аритмии имели место у 12 животных данной группы. В группе Атропин + Лактат<sub>стар</sub> в период острой коронарной окклюзии у 11 из 12 крыс отмечалась ФЖ и ПЖТ. Во время реперфузии миокарда нарушения сердечного ритма наблюдались у 11 животных данной группы.

Таким образом, длительность ишемических нарушений сердечного ритма в исследуемых группах старых и молодых крыс, подвергнутых атропинизации и Пост с помощью лактата, сопоставима с таковой в группах контроля.

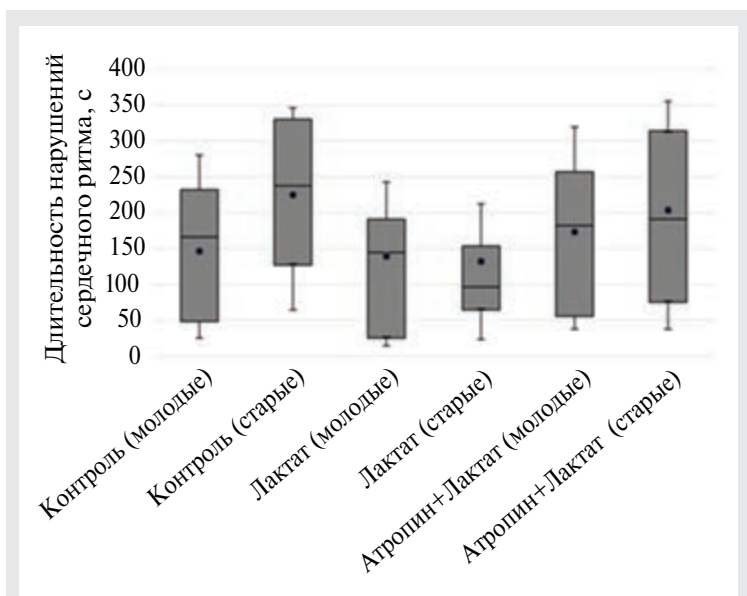


Рисунок 1 — Длительность нарушений сердечного ритма после 30-минутной ишемии и 120-минутной реперфузии миокарда у крыс исследуемых групп

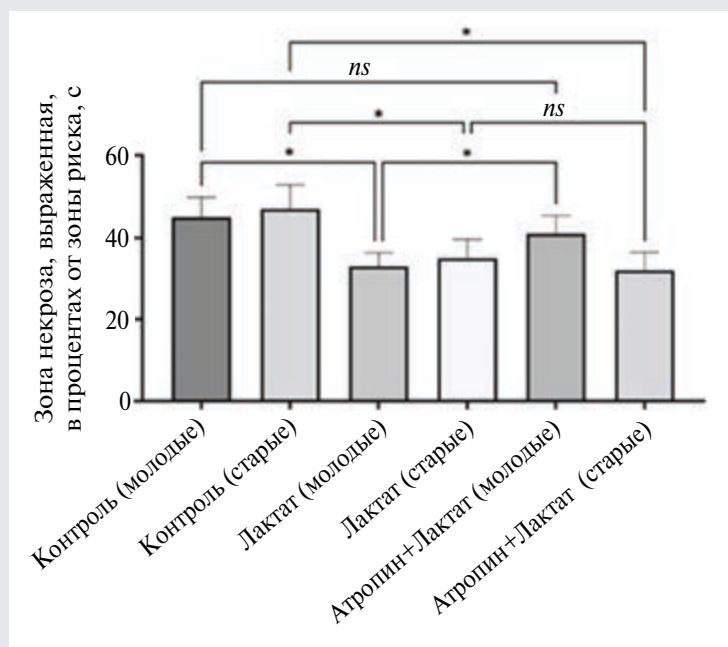


Рисунок 2 — Размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка в исследуемых группах (\* Статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ); ns — различия не достоверны.)



При изучении инфаркт-лимитирующего эффекта Пост с помощью L-лактата при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс в условиях системного действия в организме животных блокатора M-холинореактивных систем атропина статистически значимых различий между анализируемыми группами по показателю размера зоны риска в миокарде левого желудочка не выявлено. Так, зона ишемии в группе Контроль<sub>молод</sub> составила  $54 \pm 3 \%$ , в группе Контроль<sub>стар</sub> —  $55 \pm 3 \%$ ; в группе Лактат<sub>молод</sub> —  $52 \pm 4 \%$ ; в группе Лактат<sub>стар</sub> —  $53 \pm 3 \%$ ; в группе Атропин + Лактат<sub>молод</sub> —  $50 \pm 4 \%$  и в группе Атропин + Лактат<sub>стар</sub> —  $54 \pm 5 \%$ . Таким образом, во всех анализируемых группах крыс размеры зоны риска в миокарде левого желудочка были сопоставимы.

Размер инфаркта является важным показателем повреждения миокарда из-за его влияния на сократимость сердца. Установлено, что размер зоны некроза в миокарде левого желудочка у животных в группе Контроль<sub>молод</sub> составил  $45 \pm 4 \%$ , а в группе Контроль<sub>стар</sub> —  $47 \pm 5 \%$ . После внутривенного введения животным L-лактата (10 мг/кг), которое осуществлялось через 25 мин после начала реперфузии, у крыс при ишемии и реперфузии миокарда в левом желудочке формировались следующие размеры зон некроза: в группе Лактат<sub>молод</sub> —  $33 \pm 3 \%$  ( $p < 0,05$  по сравнению с группой Контроль<sub>молод</sub>), а в группе Лактат<sub>стар</sub> —  $35 \pm 4 \%$  ( $p < 0,05$  по сравнению с группой Контроль<sub>стар</sub>). Размер зоны некроза в группах молодых и старых животных, которым на 15-й мин реперфузии вводили блокатора M-холинореактивных систем атропин (2 мг/кг), а затем внутривенно вводился лактат, был следующим: в группе Атропин + Лактат<sub>молод</sub> —  $41 \pm 4 \%$ , а в группе Атропин + Лактат<sub>стар</sub> —  $32 \pm 4 \%$  ( $p < 0,05$  по сравнению с группой Контроль<sub>стар</sub>) (рисунок 2).

Следовательно, данные исследования свидетельствуют о наличии выраженного инфаркт-лимитирующего эффекта Пост с помощью L-лактата у молодых крыс. Однако в условиях системного действия в организме животных блокатора M-холинореактивных систем атропина (2 мг/кг) у молодых крыс Пост с помощью L-лактата оказывало, но менее выражен-

ный противоишемический эффект. У старых животных в условиях системного действия в их организме атропина инфаркт-лимитирующий эффект Пост с помощью L-лактата сохранялся.

Таким образом, учитывая имеющиеся литературные данные о том, что у старых крыс имеет место выраженное снижение интенсивности процессов синтеза ацетилхолина и активности ацетилхолинтрансферазы, что может свидетельствовать о нарушении процессов холинергической регуляции сердечной деятельности у таких животных, данные выполненных исследований дают основания полагать, что активность периферических M-холинореактивных систем имеет значение в механизмах реализации инфаркт-лимитирующего эффекта Пост с помощью L-лактата у молодых, но не у старых крыс. В пользу сделанного предположения свидетельствуют и такие имеющиеся в литературе сведения, что при старении организма у животных происходит деструкция холинергических нервных окончаний и уменьшение числа M-холинорецепторов в миокарде, что в конечном итоге ведет к ослаблению парасимпатических влияний на сердце у старых животных.

**Заключение.** Посткондиционирование с помощью L-лактата оказывает инфаркт-лимитирующий эффект при ишемии-реперфузии миокарда как у молодых, так и у старых крыс, однако в условиях системного действия в организме животных атропина этот эффект посткондиционирования с помощью L-лактата был менее выражен у молодых крыс и сохранялся у старых животных. По-видимому, активность периферических M-холинореактивных систем имеет значение в механизмах реализации кардиопротекторных эффектов посткондиционирования с помощью L-лактата у молодых, но не у старых крыс.

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

### Список цитированных источников

1. Heusch, G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning / G. Heusch // Circulation Research. — 2015. — Vol. 116. — P. 674–699.
2. Nitric oxide-mediated relaxation to lactate of coronary circulation in the isolated perfused rat heart / J. J. Montoya [et al.] // J. Cardiovasc. Pharmacol. — 2011. — Vol. 58, № 4. — P. 392–398.
3. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an *in vitro* study / C. Groussard [et al.] / J. Appl. Physiol. (1985). — 2000. — Vol. 89, № 1. — P. 169–175.

4. Клинические аспекты динамики лактата крови во время операции на сердце и аорте в условиях искусственного кровообращения / Н. А. Трекова [и др.] // Анестезиология и реанимация. — 2016. — Т. 61, № 5. — С. 324–329.

5 Чепелев, С. Н. О значимости гиперлактатемии в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда в эксперименте / С. Н. Чепелев, Ф. И. Висмонт, С. В. Губкин // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. — 2020. — Т. 64, № 3. — С. 332–340.

6. Brooks, G. A. The science and translation of lactate shuttle theory / G. A. Brooks // Cell Metabolism. — 2018. — Vol. 27, № 4. — P. 757–785.

7. Revisiting the cardioprotective effects of acetylcholine receptor activation against myocardial ischemia/reperfusion injury / K. Intachai [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2018. — Vol. 19, № 9. — P. 2466.

## **M-cholinoreactive system involvement in the implementation of the cardioprotective efficiency of postconditioning using L-lactate during ischemia-reperfusion of myocardium in young and old rats**

*Chepelev S. N.<sup>1</sup>, Vismont F. I.<sup>1</sup>, Goubkin S. V.<sup>2</sup>, Vismont A. F.<sup>1</sup>, Jushkevich P. F.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;*

*<sup>2</sup> State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”,  
Minsk, Republic of Belarus*

The aim of the research was to research of the participation of M-cholinoreactive systems in the implementation of the cardioprotective efficiency of postconditioning using L-lactate during ischemia-reperfusion of myocardium in young and old rats.

In experiments on rats, it was found that postconditioning using L-lactate has an infarct-limiting effect during ischemia-reperfusion of myocardium in both young and old animals, however, under conditions of systemic action of atropine (2 mg/kg), the infarct-limiting effect of postconditioning using L-lactate partially maintained only in old rats. Apparently, the activity of peripheral M-cholinergic systems is important in the mechanisms of implementation of the cardioprotective effects of postconditioning using L-lactate in young, but not in old rats.

**Keywords:** cardioprotection, ischemia, reperfusion, L-lactate, atropine.

*Поступила 02.06.2022*

УДК: 611.018.25:618.46]:577.218

## **ЭКСПРЕССИЯ CD106 И КОИНГИБИТОРНЫХ МОЛЕКУЛ CD273, CD274, CD276 НА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ПЛАЦЕНТЫ**

*Лях Е. Г., Шитикова М. Г., Исайкина Я. И., Новикова М. А.*

*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр  
детской онкологии, гематологии и иммунологии»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Сравнительные исследования мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученных из различных тканей организма, показали, что наряду с однотипными основными характеристиками клеток наблюдаются отличия в пролиферативном и дифференцировочном потенциале, а также в некоторых биологических свойствах. Степень иммуносупрессивной активности МСК может быть

связана с набором антигенов, экспрессируемых на поверхности клеток, в том числе кластеров дифференцировки — CD106 и коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276.

Целью нашего исследования являлась оценка уровня экспрессии CD106 и коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276 на МСК плаценты (П-МСК) и костного мозга (КМ-МСК) в зависимости от продолжительности культивирования клеток.

Было исследовано 26 образцов МСК. Методом иммунофенотипического анализа установлено, что уровень экспрессии CD273 был выше в 2 раза, CD274 — в 1,5 раза и CD106 — в 1,4 раза на П-МСК, чем на КМ-МСК ( $p < 0,05$ ). Полученные данные свидетельствуют о более высоком базовом уровне экспрессии поверхностных антигенов на П-МСК, участвующих в модуляции иммунологической активности, что, возможно, связано с их биологической функцией, а именно, значительной ролью в обеспечении фетоматеринской толерантности.

Сравнительный анализ уровня экспрессии молекул на П-МСК 3-го и 6-го пассажей показал, что длительная экспансия *in vitro* приводила к снижению экспрессии CD273, CD274, а также CD106 на 21,6, 21 и 12 % соответственно ( $p < 0,05$ ). Более высокий иммуносупрессивный потенциал П-МСК ранних пассажей делает применение этих клеток более предпочтительным для иммуносупрессивной клеточной терапии.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, плацента, костный мозг, иммунофенотип, иммуносупрессия.

**Введение.** Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) представляют собой тип мультипотентных стволовых клеток мезодермального происхождения, которые составляют специализированное микроокружение в различных тканях организма, обладают способностью к самообновлению и ортодоксальной дифференцировке в клетки мезенхимальных тканей, такие как остециты, хондроциты и адипоциты [1].

В настоящее время МСК обнаружены практически во всех тканях организма, но наиболее доступными и востребованными источниками являются костный мозг, жировая ткань, а также ткани перинатального происхождения (пуповина, пуповинная кровь, плацента). Сравнительные исследования МСК, полученных из различных тканей, показали наряду с однотипными основными характеристиками клеток, различия в пролиферативной активности и дифференцировочном потенциале, а также биологических свойствах клеток. МСК костномозгового происхождения (КМ-МСК) демонстрируют более высокую способность к хондро- и остеоиндукции, а также поддержке гемопоэза. МСК, полученные из перинатальных тканей, обладают более высоким пролиферативным потенциалом и эффективнее поддаются дифференцировке в эндотелиальном направлении. В то же время нет единого мнения о выраженности иммуносупрессивной активности при сравнении различных типов МСК. Гетерогенность некоторых свойств МСК различного происхождения является важным критерием для подбора оптимального источника МСК для проведения клеточной терапии.

В настоящее время в практической медицине наиболее востребовано применение МСК

в качестве материала для клеточной терапии таких иммуноопосредованных заболеваний, как реакция «трансплантат против хозяина», болезнь Крона, рассеянный склероз и др. [2]. Терапевтическое иммуносупрессивное действие МСК осуществляется как на паракринном уровне, так и при непосредственном взаимодействии МСК с клетками-мишенями. Некоторые исследователи связывают отличия иммуносупрессивных свойств МСК различного тканевого происхождения с набором антигенов, экспрессируемых на поверхности клеток, в том числе кластеров дифференцировки CD106, а также коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276.

CD106 (VCAM-1) — белок, входящий в суперсемейство иммуноглобулинов, который участвует в передаче межклеточных сигналов, а также адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток. На поверхности МСК VCAM-1 участвует в реализации начальных стадий иммуносупрессии. Белки адгезии ICAM-1 и VCAM-1 способствуют установлению непосредственных межклеточных контактов МСК с Т-лимфоцитами, что приводит к ингибированию их функциональной активности по принципу паракринного механизма. Более того, экспериментальные исследования показали, что именно популяция CD106<sup>+</sup> МСК обладает наиболее выраженными иммуносупрессивными и проангиогенными свойствами, которые связывают не только с высокой адгезионной способностью клеток, но и со способностью секретировать высокий уровень иммунорегуляторных и проангиогенных цитокинов и факторов (СОХ-2, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) [3–5]. Тем не менее, уровень экспрессии CD106<sup>+</sup> на поверхности МСК различного тканевого происхождения значительно варьирует. Было показано, что в

популяции МСК из тканей плаценты он более высокий, чем на МСК из костного мозга и значительно выше, чем на МСК из жировой ткани и пуповинной крови [3, 4].

В систему взаимодействия МСК с Т-лимфоцитами и ингибирования иммунных реакций также вовлечены коингибиторные молекулы CD273, CD274, CD275 и CD276, лигандами которых являются молекулы PD-1/2 и ICOS (CD278) [6–7]. Коингибиторные молекулы участвуют в непосредственном ингибировании функций Т-лимфоцитов минуя IDO — путь. Экспрессия этих молекул на поверхности МСК праймируется  $IFN\gamma$ . Тем не менее, в МСК, полученных из перинатальных тканей, отмечается базовый повышенный уровень экспрессии коингибиторных молекул, что связывают с его существенной ролью в обеспечении фетоматеринской толерантности.

**Цель работы** — исследование и сравнение уровня экспрессии CD106 и коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276 на МСК плаценты и костного мозга в зависимости от продолжительности культивирования клеток.

**Материалы и методы.** МСК плаценты (П-МСК) были получены из фрагментов послеродовой плаценты ( $n = 10$ ) после *оперативных или естественных родов*, после получения информированного согласия роженицы на забор плаценты. МСК выделяли ферментативным методом или методом эксплантации. Для получения культуры клеток ферментативным методом суспензию фрагментов обрабатывали 0,14%-м раствором коллагеназы I в течение 30 мин с последующей фильтрацией клеток через 100 $\mu$ m нейлоновый фильтр. Полученные диссоциированные клетки культивировали в среде IMDM (Life Technologies, США) с 10%-й эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) (Life Technologies, США). Для получения культуры методом эксплантации суспензию фрагментов плаценты в стандартной среде помещали в культуральный флакон (Sarstedt, Германия), покрывая дно тонким слоем.

КМ-МСК получали из проб костного мозга здоровых доноров, являвшихся донорами гемопоэтических стволовых клеток для аллогенной трансплантации ( $n = 3$ ). Мононуклеарные клетки выделяли на Гистопаке плотностью 1,077 (Sigma, США), дважды отмывали в растворе Хенкса, ресуспендировали в среде IMDM с 10 % (ЭТС) и переносили в концентрации  $2-3 \cdot 10^6$ /мл во флаконы. Культивирование проводили при 37 °C в CO<sub>2</sub> инкубаторе. Через 48 ч проводили смену среды. При достижении 70–90 % конфлюэнтного слоя клетки снимали с

поверхности флакона 0,25%-м раствором трипсин — ЭДТА и рассаживали в новые флаконы по  $1 \cdot 10^6$ .

П-МСК и КМ-МСК культивировали с проведением 6 пассажей.

Для иммунофенотипического анализа использовали МСК 3-го и 6-го пассажей. Иммунофенотипический анализ МСК проводили с использованием набора моноклональных антител (МКА) в составе CD73 APC, CD90 FITC, CD105 VioBlue, CD34 PE, CD45 PE, CD14 PE, CD19 PE, Anti-HLA-DR VioGreen и изотипического контроля, входящего в набор (MSC Phenotyping Kit human, Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Для определения VCAM-1 и коингибиторных молекул на поверхности МСК использовали МКА CD106, CD273, CD274, CD276, меченные APC-Vio770, PE, PE-Vio615, FITC соответственно (Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Анализ выполняли согласно прилагаемой инструкции. Учет результатов проводили на лазерном проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Анализ иммунофенотипических данных выполняли с применением программного обеспечения Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку данных проводили с применением программ Statistica 6.0 и Excel. Использовали методы описательной статистики, непараметрического теста Манна — Уитни и Краскела — Уоллиса. Различия между сравниваемыми показателями считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Согласно установленным международным обществом клеточной терапии (ISCT) минимальным критериям для определения идентичности МСК было проведено определение экспрессии дифференцировочных антигенов CD90, CD73, CD105, характерных для МСК, и отсутствие антигенов гемопоэтических клеток CD14/CD45/CD34/19 и антигена гистосовместимости 2-го класса — HLA-DR. Сравнение количества клеток, экспрессирующих маркеры МСК, в культурах, полученных из послеродовой плаценты и костного мозга, представлены в таблице 1.

Полученные результаты свидетельствуют, что культуры клеток как из костного мозга, так и из плаценты соответствуют критериям принадлежности к популяции МСК. Необходимо отметить, что КМ-МСК экспрессировали CD90 на более высоком уровне по сравнению с П-МСК ( $p < 0,05$ ). Тем не менее, минимальный порог позитивности по данному маркеру для МСК составляет более 95 %.



Таблица 1 — Иммунофенотип МСК из различных источников

Источник МСК	Антигены дифференцировки и гистосовместимости; медиана (min – max)				
	CD90 + (%)	CD105+ (%)	CD73+ (%)	CD45+/CD14+/CD34+/19+ (%)	HLA-DR (%)
П-МСК (n = 10)	95,0* (93,9–98,8)	97,0 (95,5–99,4)	99,1 (96,5–100,0)	1,95 (0,1–4,6)	2,3 (0,2–3,8)
КМ-МСК (n = 3)	98,2 (97,8–98,9)	97,5 (95,3–97,6)	98,0 (97,4–99,8)	1,7 (1,0–1,8)	0,8 (0,7–1,8)
Достоверность различий (p)	0,020	0,564	0,470	0,613	0,773

\*  $p < 0,05$  при сравнении П-МСК и КМ-МСК.

Было выполнено иммунофенотипическое исследование экспрессии коингибиторных мо-

лекул CD273, CD274, CD276 и CD106 на КМ-МСК и П-МСК (рисунок 1).

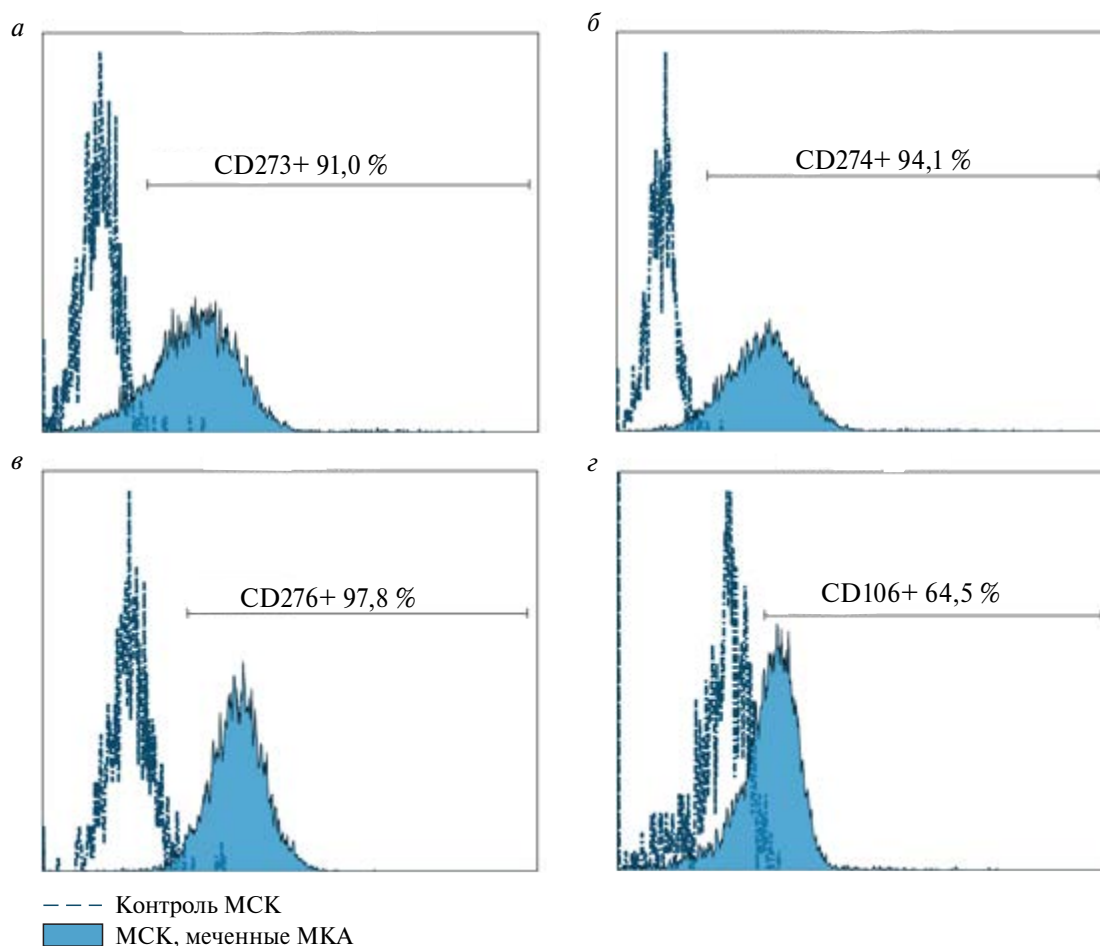
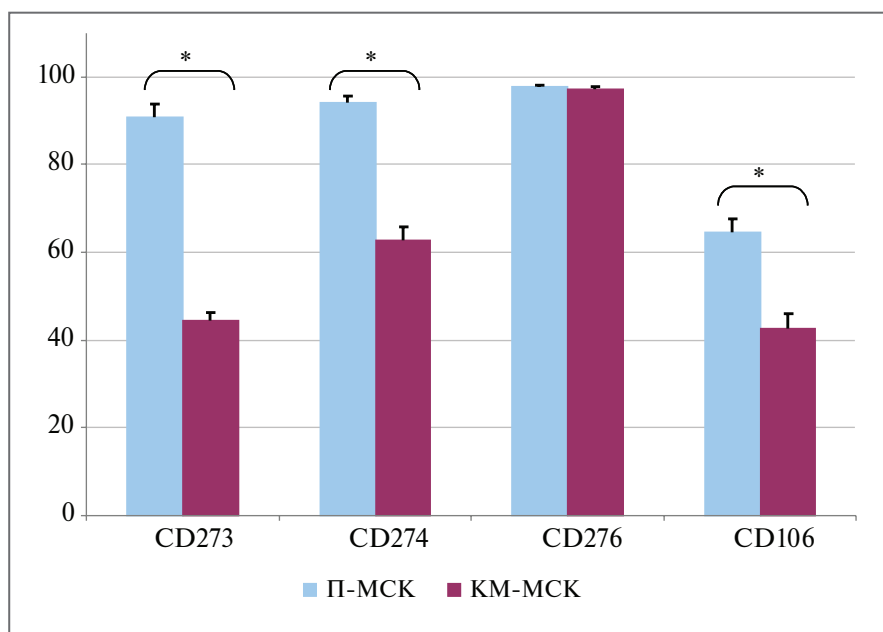


Рисунок 1 — Пример экспрессии коингибиторных молекул CD273 (а), CD274 (б), CD276 (в) и CD106 (г) в культуре П-МСК

Уровни экспрессии CD273, CD274 на П-МСК были значимо выше, чем на КМ-МСК ( $p < 0,05$ ) и для П-МСК составляли 93,2 % (65,0–98,3 %) и 96,1 % (82,3–98,7 %), а для КМ-МСК — 45,0 % (41,2–47,2 %) и 63,6 % (57,6–

67,5 %) соответственно. Экспрессия коингибиторной молекулы CD276 была самой высокой из анализируемых, варьировала в диапазоне 95,5–99,8 % и не отличалась для культур П-МСК и КМ-МСК (рисунок 2).



**Рисунок 2 — Уровень экспрессии коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276 и CD106 в культурах П-МСК и КМ-МСК (\* $p < 0,05$ )**

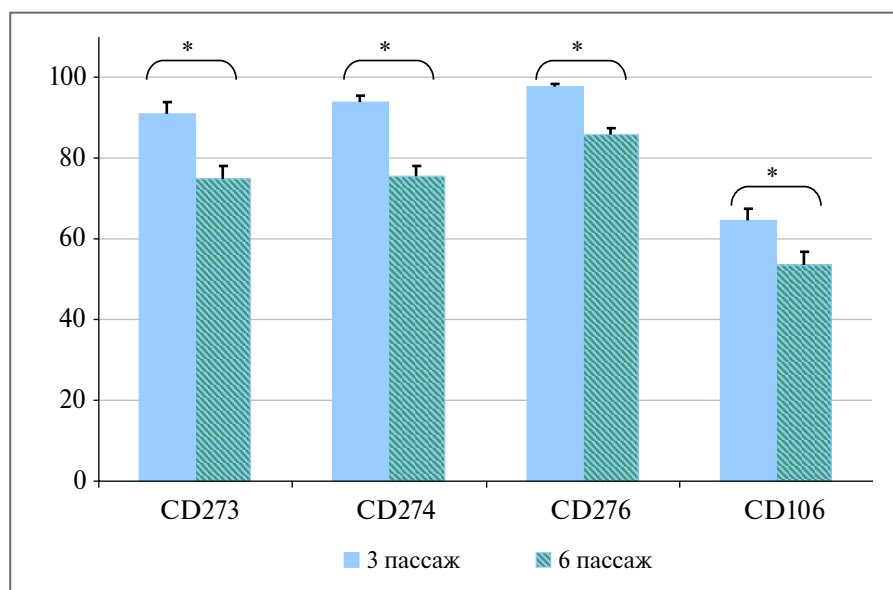
Экспериментальные исследования показали, что МСК, полученные из других перинатальных тканей, а именно, пуповины также экспрессируют CD273, CD274 на более высоком уровне (более 90 %) по сравнению с КМ-МСК (70–71 %) [7]. По литературным данным, CD273 и CD274 при связывании с рецептором PD-1 на Т-клетках способны подавлять различные функции Т-клеток, включая пролиферацию и продукцию цитокинов, таких как IL-2 и IFN $\gamma$  [7]. Кроме того, CD273 и CD274 могут индуцировать противовоспалительный фенотип дендритных клеток, что также редуцирует активность Т-клеток [7]. Оценка экспрессии рецептора VCAM-1 показала, что П-МСК экспрессируют данный маркер на более высоком уровне 61,4 % (49,1–79,6 %), по сравнению КМ-МСК — 42,6 % (36,6–48,7 %) ( $p < 0,05$ ). Наши результаты сопоставимы с данными представленными Z. X. Yang с соавт., которые установили, что субпопуляция клеток, экспрессирующая CD106, составляет 65,01 % в культуре МСК, полученных из ворсин хориона плаценты, 32,04 % — МСК из костного мозга, 7,44 % — МСК из пупочного канатика и 0,73 % — МСК жировой ткани [3]. Z. C. Nan с соавт. также показали более высокий уровень экспрессии CD106 ( $68,2 \pm 7,9$  %) на МСК плацентарного происхождения по сравнению с другими типами МСК (МСК костного мозга —  $13,0 \pm 10,5$  %, МСК пуповинной крови —  $4,0 \pm 2,1$ , МСК

жировой ткани —  $0,2 \pm 0,2$ ) [4]. Как упоминалось выше, субпопуляция CD106+ МСК отличается более высокой адгезионной способностью к Т-лимфоцитам, а также высоким уровнем секреции иммунорегуляторных цитокинов, что позволяет более эффективно ингибировать их активацию [5].

Таким образом, П-МСК отличаются от КМ-МСК более высоким базовым уровнем экспрессии поверхностных антигенов, участвующих в модуляции иммунологической активности, что, вероятно, связано с их биологической функцией в подавлении материнского иммунного ответа на наследуемые от отца аллоантигены.

Было проведено исследование влияния длительности культивирования П-МСК на сохранность экспрессии коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276 и CD106 на П-МСК (рисунок 3).

Установлено, что экспрессия всех исследуемых маркеров значительно снижается при длительном культивировании П-МСК с 3-го до 6-го пассажа: CD273 — на 21,6 %, CD274 — на 21 %, CD276 — на 12,5 % и CD106 — на 12 % ( $p < 0,05$ ). При этом позитивность по маркерам CD274 и CD106 П-МСК 6-го пассажа после экспансии *in vitro* становится на уровне КМ-МСК 3-го пассажа. Подобное снижение CD106+ субпопуляции П-МСК при культивировании было установлено и у других исследователей [3].



**Рисунок 3 — Уровень экспрессии коингибиторных молекул CD273, CD274, CD276 и CD106 в культуре П-МСК на 3 и 6 пассажах (\* $p < 0,05$ )**

**Заключение.** Таким образом, сравнительное исследование иммунофенотипа клеток доказывает неоднородность популяции МСК различного тканевого происхождения. Уровень экспрессии CD273, CD274 и CD106 был выше чем на КМ-МСК в 2 раза, в 1,5 раза и в 1,4 раза соответственно ( $p < 0,05$ ), что может свидетельствовать об их более высоком иммуносупрессивном потенциале. Высокая пролиферативная активность П-МСК делает их лиди-

рующими кандидатами для производства высококлеточного продукта при длительном культивировании. Тем не менее, длительная экспансия *in vitro* приводила к снижению экспрессии маркеров CD273, CD274, а также CD106 на 21,6, 21, и 12 % соответственно ( $p < 0,05$ ), что может приводить к редукции иммуносупрессивных свойств МСК поздних пассажей, в связи с чем рекомендуется отбор П-МСК ранних пассажей для клинического применения.

### Список цитированных источников

1. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici [et al.] // *Cytotherapy*. — 2006. — Vol. 8. — P. 315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
2. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience / K. Le Blanc [et al.] // *J. Intern. Med.* — 2007. — Vol. 262. — P. 509–525. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2007.01844.x.
3. CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties / Z. X. Yang [et al.] // *PLoS. One.* — 2013. — Vol. 8. — P. e59354. DOI : 10.1371/journal.pone.0059354.
4. New insights into the heterogeneity and functional diversity of human mesenchymal stem cells / Z. C. Han [et al.] // *Biomed. Mater. Eng.* — 2017. — Vol. 28. — P. 29–45. DOI: 10.3233/BME-171622.
5. Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Mesenchymal Stem Cells Are Critical for Immunosuppression / G. Ren [et al.] // *J. Immunol.* — 2010. — Vol. 184. — P. 2321–2328. DOI: 10.4049/jimmunol.0902023.
6. IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- $\gamma$ -licensed human mesenchymal stromal cells / R. Chinnadurai [et al.] // *J. Immunol.* — 2014. — Vol. 192. — P. 1491–1501. DOI: 10.4049/jimmunol.1301828.
7. What Makes Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells Superior Immunomodulators When Compared to Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells? / R. N. Bórcia [et al.] // *Stem. Cells. Int.* — 2015. — № 4 (5). — P. 1–14. DOI: 10.1155/2015/583984.



## CD106 and CO-inhibitory molecules CD273, CD274, CD276 expression by the placenta mesenchymal stem cells

*Liakh E., Shytikova M., Isaikina Y., Novikova M.*

*State Institution "Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology",  
Minsk, Republic of Belarus*

Comparative studies of mesenchymal stem cells (MSCs) obtained from different tissues of the body have shown that there are differences in the proliferative and differentiation potential, some biological properties. The degree of immunosuppressive activity of MSCs may be associated with a set of antigens expressed on the cell surface, including differentiation clusters — CD106 and co-inhibitory molecules CD273, CD274, CD276.

The aim of this study was to estimate the level of expression CD106 and co-inhibitory molecules CD273, CD274, CD276 by the placental MSCs (P-MSCs) and bone marrow MSCs (BM-MSCs) depending on the cultivation time.

26 samples of MSCs have been studied. Immunophenotypic analysis showed that the CD273 expression was 2 times higher, CD274 was 1.5 times higher, and CD106 was 1.4 times higher by P-MSCs than BM-MSCs ( $p < 0,05$ ). The data indicated a higher expression of surface antigens involved in the modulation of immunological activity by P-MSCs, which may be related with their biological function in maintaining feto-maternal tolerance.

Comparative analysis showed decrease the expression level of CD273, CD274, and CD106 by 21.6 %, 21 %, and 12 %, respectively ( $p < 0,05$ ) by P-MSCs from 3rd and 6th passages at long-term expansion *in vitro*.

The higher immunosuppressive potential of early-passage P-MSCs makes these cells preferable for immunosuppressive cell therapy.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, placenta, bone marrow, immunophenotype, immunosuppression.

*Поступила 10.06.2022*

УДК 541.69:546.26

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В ПОЛИАКРИАМИДНЫЙ ГЕЛЬ НАНОЧАСТИЦ УГЛЕРОДА УДАЛЯТЬ БИЛИРУБИН ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

*Макаревич Д. А.<sup>1</sup>, Рябцева Т. В.<sup>1</sup>, Ковганко Н. Н.<sup>1</sup>, Жалейко Г. А.<sup>1</sup>, Штемплук Р. Г.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь;*

*<sup>2</sup>Научно-производственное закрытое акционерное общество «Синта»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Исследована сорбционная активность полиакриамидного геля по отношению к билирубину. Показано, что наиболее эффективными в отношении сорбции и удержания в объеме геля молекул билирубина являются наноалмазы детонационного синтеза типа УДА-СП(тип  $\zeta+$ ) и УДА-ГО-СП(30).

**Ключевые слова:** билирубин, сорбция, наноалмаз, полиакриламид, плазма.

**Введение.** Наноразмерные детонационные алмазы (нДА), получаемые с использованием взрывчатых веществ в изолированном объеме, представляют собой уникальный тип алмазных материалов [1, 2]. Наноразмерные детонационные алмазы — наноматериал со средним раз-



мером зерен примерно 4 нм. Отличительной морфологической особенностью нДА является кубическая, редко октаэдрическая форма, организованная из составных беспорядочно ориентированных кубических блоков. Доля поверхностных атомов составляет около 15 % в отличие от фуллеренов, все атомы которых являются поверхностными. Наличие кристаллической решетки типа алмаза центрального ядра наночастицы и разветвленной поверхности нДА, содержащей различные активные химические группы ( $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CO}_2\text{R}$ ,  $\text{CH}_x$ ,  $\text{C-N}$ ,  $\text{C=N}$ ,  $\text{C-O-O}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_x$ ), наделяет частицы уникальными физико-химическими свойствами по сравнению с другими углеродными материалами [3, 4].

Наноалмазы являются перспективными для разработки новых терапевтических подходов в медицине, так как в практических исследованиях учеными доказана низкая токсичность, хорошая биодоступность и высокая удельная поверхность по сравнению с фуллеренами, графеном и нанотрубками [5, 6]. Гидроксильные, карбоксильные, амидные и другие активные группы на поверхности дают возможность модифицировать наноалмазы различными лекарственными веществами, биосенсорами. В настоящий момент область применения нДА в медицине включает внутриклеточную доставку лекарственных средств, противоопухолевую и антибактериальную терапию, клеточную фототерапию, визуализацию маркеров на тканевых срезах (биосенсорика, биодиагностика, визуализация) [7].

Наноалмазы обладают также высокой адсорбционной способностью, имеют большое количество свободных электронов на поверхности (множественный радикал-донор), химически инертны и характеризуются гидрофильным характером поверхности [4, 7]. Исследования, проведенные в ИСМ НАН Украины по изучению адсорбционных свойств микропорошков синтетических алмазов различных зернистостей и различной модификации поверхности, показали, что нДА являются селективными адсорбентами альбуминов и глобулинов плазмы крови. Группы  $\text{CH}_x$ ,  $\text{C-N}$ ,  $\text{C=N}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_x$  на поверхности придают наноалмазным сорбентам способность адсорбции ионов тяжелых металлов (железо, никель, кобальт) [4].

Интерес представляет окисленная поверхность нДА, так как это место проведения на поверхности нДА различных реакций. Для дополнительной очистки поверхности наноалма-

за применяют реакции окисления, которые проводят как в жидкой, так и в газовой фазе, что оказывает влияние на степень окисления и состав химически активных поверхностных групп [7].

Актуальной задачей в эфферентной медицине является удаление токсических продуктов метаболизма из внутренней среды организма посредством сорбции крови. Для этого широко применяются углеродные сорбенты СКТ-6А, БАУ, ВНИИТУ-1, Гемос-Бел. Однако они имеют ряд недостатков: низкое качество углеродных гранул с высоким содержанием минеральных примесей (золы) и шероховатым рельефом поверхности, способных травмировать оболочку элементов крови и способствовать их адгезии на поверхности, а также низкая адсорбционная активность. Упомянутые недостатки ограничивают применение сорбентов этого типа в эфферентной терапии, поэтому разработка новых более эффективных и безопасных является актуальной задачей современной биохимии.

**Цель работы** — изучение эффективности иммобилизованных в полиакриламидный гель наночастиц углерода сорбировать билирубин из плазмы крови человека.

**Материалы и методы.** Изучали 3 типа углеродных наночастиц. УДА-СП (тип  $\xi+$ ), и УДА-ГО-СП (30 нм) — наноалмаз глубокой очистки — сухой порошок серого цвета (содержание окисляемых форм углерода 1,2 %; степень окислительного разложения 0,98; химические функциональные поверхностные группы:  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CO}_2\text{R}$ ,  $\text{CH}_x$ ,  $\text{C-N}$ ,  $\text{C=N}$ ,  $\text{C-O-O}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{CO}$ ). УДА-ЧОШ-СП — наноалмаз селективного окисления, сухой порошок черного цвета (количество окисляемых форм углерода 38,4 %, степень окислительного разложения 0,28; функциональные поверхностные группы:  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CO}_2\text{R}$ ,  $\text{CH}_x$ ,  $\text{C}_6\text{H}_x$ ).

Сополимер акриламида с наночастицами углерода синтезировали путем добавления в смесь при радикальной полимеризации акриламида с  $\text{N,N}$ -метиленабисакриламидом [6]. Объем реакционной смеси составлял 50 мл. Содержание УДА в реакционной смеси — 500 мг. Таким образом, концентрация наночастиц в экспериментальном образце составляла 10 мг/мл.

Протокол изучения эффективности адсорбции проводили шихтовым методом (Batchwise adsorption test) [7]. Использовали круглодонные пробирки диаметром 10 мм, высотой 100 мм и общим объемом заполнения 7 мл. В пробирки загружали 3,0 г полимера, что

соответствует 10 мл полимера в виде нитей и 5,0 мл полимера исходного после полимеризации. Количество наночастиц, участвующих в адсорбции в пробирке, составила 50 мг. В каждую пробирку добавляли 5 мл плазмы, полученной от пациентов при проведении лечебного плазмафереза, с концентрацией общего билирубина  $\geq 100$  мкмоль/л. Инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Затем собирали элюат. Для расчета коэффициента распределения проводили дополнительную элюцию раствором NaCl (5 мл, 0,9 %). Количество сорбированного билирубина рассчитывали как разницу между концентрацией билирубина до и после контакта с сорбентом. Концентрация билирубина в элюате, полученном после смыва, включала вещество в подвижной фазе. Разница между всем адсорбированным билирубином и его количеством в элюате указывала на количество билирубина в неподвижной фазе (внутри гранул геля и/или внутри пор, образуемых в нДА). Отношение концентрации билирубина между неподвижной и подвижной фазами является коэффициентом распределения и свидетельствует о сорбенте по отношению к сорбируемому веществу. Для низкомолекулярных веществ, к

которым относится билирубин, данный коэффициент для ПААГ без лиганда приближается к нулю.

Определение концентрации билирубина модифицированным методом Ендрашика – Грофа. Метод проводили с помощью коммерческих наборов реагентов. Биуретовый метод использовали для определения концентрации общего белка. Метод с бромкрезоловым зеленым применяли для оценки концентрации альбумина.

Для регистрации результатов методом спектроскопии использовали спектрофотометр Multiskan GO (Япония). Результаты описывали в виде медианы, 25 и 75 перцентилей, статистический анализ проводили методами непараметрической статистики.

**Результаты и их обсуждение.** В результате химического синтеза из 10 мл раствора для полимеризации и 50 мг углеродных наночастиц синтезировано по 30 г каждого образца для изучения адсорбционной активности иммобилизованных наночастиц углерода. Качество полимеризации и иммобилизации оценивали с помощью визуального и спектрофотометрического анализа растворов после промывки полученных образцов (таблица 1).

Таблица 1 — Физико-химические показатели геля с иммобилизованными углеродными наночастицами

Показатель	Образец НА-1	Образец НА-2	Образец НА-3	Образец НА-4
Характеристика исходного сырья для лигандизации,	Тонкодисперсный порошок черного цвета	Тонкодисперсный порошок серого цвета	Тонкодисперсный порошок серого цвета	Тонкодисперсный порошок серого цвета
Внешний вид иммобилизованных частиц наноглерода	Тонкие нити (диаметром 1–2 мм) полимера (ПААГ) с включениями черного цвета	Тонкие нити (диаметром 1–2 мм) полимера (ПААГ) с включениями серого цвета	Тонкие нити (диаметром 1–2 мм) полимера (ПААГ) с включениями серого цвета	Тонкие нити (диаметром 1–2 мм) полимера (ПААГ) с включениями серого цвета
pH раствора при хранении геля с НА	6,61	6,45	6,51	6,55
1-я промывка	9,19 [9,10–9,30]	9,57 [9,40–9,80]	10,20 [10,0–10,35]	8,79 [8,50–8,90]
2-я промывка	8,58 [8,18–8,60]	9,27 [9,10–9,75]	9,76 [9,50–10,10]	8,30 [8,15–8,68]
3-я промывка	7,93 [7,50–8,15]	8,10 [8,05–8,48]	8,20 [8,05–8,30]	7,40 [7,15–7,70]
4-я промывка	7,95 [7,30–8,05]	7,67 [7,54–7,86]	7,40 [7,15–7,65]	7,10 [6,80–7,20]
5-я промывка	7,25 [7,15–7,64]	6,90 [6,40–7,10]	6,70 [6,50–6,80]	6,60 [6,50–6,65]
Спектральная характеристика раствора после промывки, $\lambda = 230$ нм				
1-я промывка	3,53 [3,20–3,80]	1,74 [1,50–1,80]	3,34 [3,30–3,60]	3,31 [3,28–3,40]
2-я промывка	2,17 [2,10–2,60]	1,13 [1,10–1,18]	2,01 [1,98–2,15]	1,93 [1,88–1,96]
3-я промывка	0,28 [0,26–0,33]	0,16 [0,10–0,22]	0,29 [0,20–0,36]	0,29 [0,15–0,32]
4-я промывка	0,10 [0,06–0,15]	0,06 [0,03–0,10]	0,09 [0,07–0,11]	0,08 [0,05–0,12]
5-я промывка	0,01 [0,01–0,02]	0,01 [0,01–0,05]	0,01 [0,01–0,02]	0,03 [0,01–0,06]

Анализ показал, что при промывке происходит установление pH раствора в диапазоне нейтральных значений. Снижение оптической плотности промывочных растворов при 230 нм до нулевых значений свидетельствует об удалении из объема геля практически всего непрореагировавшего акриламида и других ненасыщенных соединений. Визуальный анализ показал, что промывочные растворы не содержат черных или серых частиц исходного сырья для иммобилизации. Первый промывочный раствор после иммобилизации частиц типа УДА-ЧОШ-СП оказался желтого цвета, что свидетельствует о возможном содержании примесей железа в образце.

Исследование влияния контакта иммобилизованных углеродных наночастиц на целостность эритроцитов показало, что после

долговременного контакта полиакриламидного геля с наночастицами наблюдается гемолиз, не превышающий 10 %. Минимальные значения гемолиза наблюдали после контакта крови с иммобилизованными частицами типа УДА-СП+(М2). Максимальный гемолиз — после контакта с частицами УДА-ЧОШ-СП (рисунок 1). Полученные результаты свидетельствуют о влиянии метода получения углеродных наночастиц и степени очистки на их гемосовместимость.

Тем не менее, иммобилизованные углеродные наночастицы можно считать гемосовместимыми, так как кратковременный контакт (менее 5 мин) крови с иммобилизованными наноалмазами, который происходит при перфузии крови через емкость с гелем, не вызывал значимого гемолиза (таблица 2).

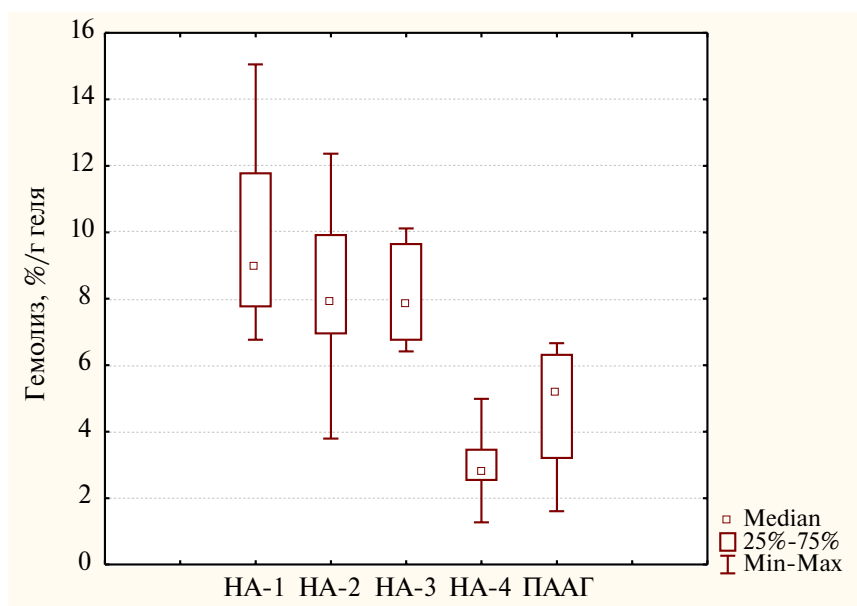


Рисунок 1 — Оценка гемолиза после длительного (60 мин) контакта крови с иммобилизованными на полиакриламидном геле углеродными наночастицами

Таблица 2 — Процент гемолиза крови после кратковременного контакта с полиакриламидным гелем лигандизированным наноалмазами

Образец	Процент гемолиза, %
Кровь + дист. вода	100
УДА-ЧОШ-СП-ПААГ	0,38 (0,32; 0,43)
УДА-ГО-СП-ПААГ	0,18 (0,12; 0,25)
УДА-СП — ПААГ	0,14 (0,09; 0,19)
УДА-СП+(М2)- ПААГ	0,30 (0,26; 0,37)
ПААГ	0,48 (0,42; 0,53)

Изучение неспецифической адсорбции метиленового синего наноалмазами в растворе показало, что максимально эффективными явля-

ются наноалмазы типа УДА-ЧОШ-СП (HA-1). На 1 мг наноалмазов сорбция МС составляет 25,63 [23,53–28,49] мг (рисунок 2). Адсорбция

остальных образцов, по сравнению с НА-1, невелика и примерно одинаковая: для НА-2 — 6,25 [4,95–7,10] мг, для НА-3 — 8,72 [7,93–9,80] мг, для НА-4 — 8,41 [7,84–9,23] мг. Полученная раз-

ница в адсорбции объясняется тем, что наноалмазы типа УДА-ЧОШ-СП обладают удельной поверхностью 399 м<sup>2</sup>/г, которая больше, чем у других образцов наноалмазов (см. таблицу 2).

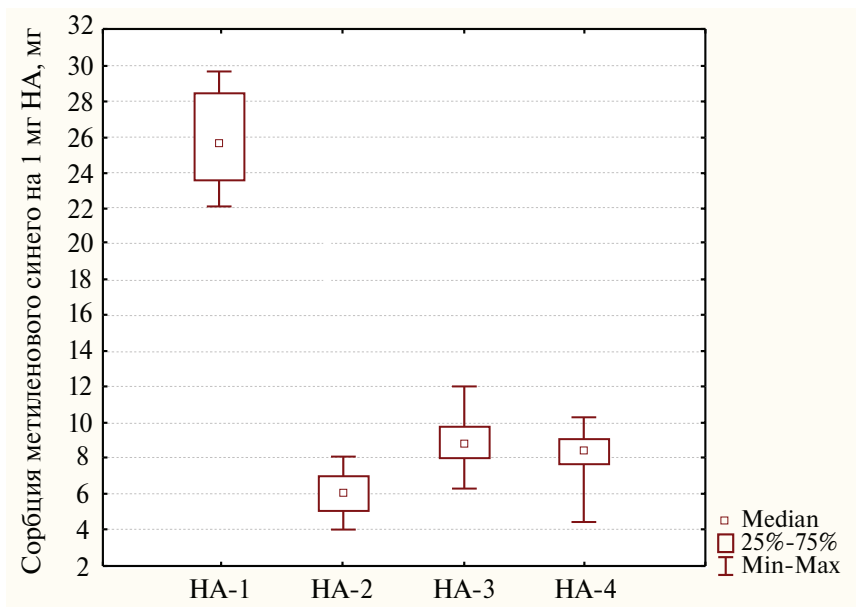


Рисунок 2 — Адсорбция метиленового синего наноалмазами (50 мг) различной модификации

Исследование адсорбционных свойств иммобилизованных наноалмазов подтвердило тенденцию: максимальной адсорбционной активностью обладают наноалмазы типа УДА-ЧОШ-СП (рисунок 3). При этом значение адсорбции иммобилизованными наноалмазами,

по сравнению со свободными, увеличивается в несколько раз, что объясняется собственной неспецифической адсорбционной способностью полиакриламидного геля по отношению к метиленовому синему.

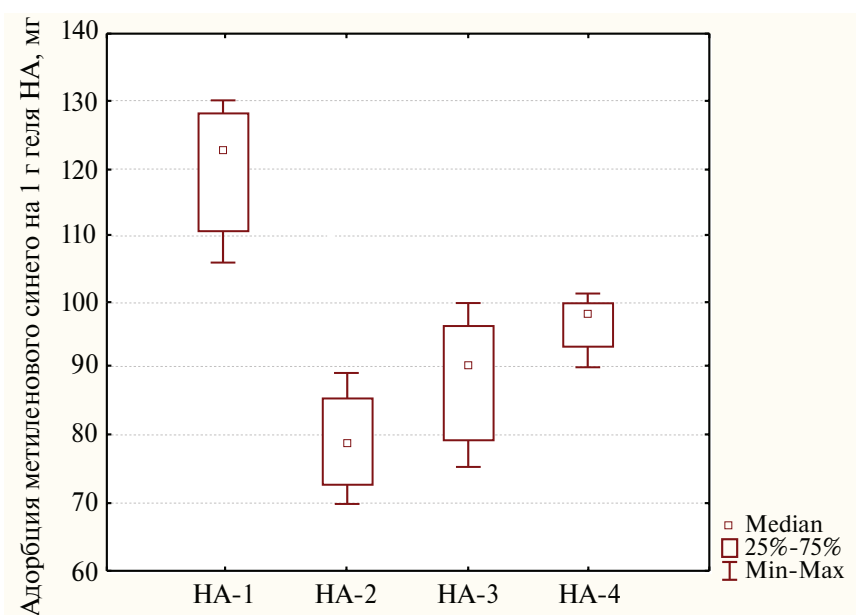


Рисунок 3 — Адсорбция метиленового синего иммобилизованными наноалмазами



Дальнейшее исследование концентрации общего билирубина в ходе экспериментов с иммобилизованными нДА показало достоверное снижение концентрации общего билирубина после контакта со всеми экспериментальными образцами по сравнению с контролем (ПААГ без нДА). Изменение концентрации общего билирубина для образцов УДА-ГО-СП-ПААГ (30) составило 36,7 (33,7;

45,5) мкмоль/ на 1 мл сорбента, для УДА-СП(тип  $\xi+$ )-ПААГ образцов 43,0 (40,8; 56,1) мкмоль/на 1 мл сорбента, для УДА-ЧОШ-СП-ПААГ — 22,8 (21,6; 25,1) мкмоль / на 1 мл сорбента. В контрольных образцах, полученных после контакта плазмы с ПААГ без нДА, изменение концентрации билирубина было равно 8,8 (6,6;9,4) мкмоль/на 1 мл сорбента (таблица 3).

Таблица 3 — Результаты определения эффективности сорбции билирубина ПААГ с иммобилизованными наноалмазами

Образец	Количество сорбированного билирубина, мкмоль на 1 мл сорбента	Количество билирубина в подвижной фазе, мкмоль/л	Коэффициент распределения
УДА-ЧОШ-СП-ПААГ	22,8 (21,6; 25,1)*	13,5 (11,2; 14,0)*	0,81 (0,65; 1,08)*
УДА-ГО-СП(30)-ПААГ	36,7 (33,7; 45,5)*	16,5 (14,4; 17,3)*	1,46 (1,06; 1,73)*
УДА-СП(тип $\xi+$ )-ПААГ	43,0 (40,8; 56,1)*	16,5 (14,4; 18,5)*	1,55 (1,28; 2,54)*
ПААГ (контроль без НА)	8,8 (6,6; 9,4)	1,4 (0,9; 1,5)	0,16 (0,15; 0,23)

\*  $p \leq 0,05$ , при сравнении с ПААГ без наноалмазов, тест Манна – Уитни.

Коэффициент распределения для сорбентов с иммобилизованными нДА статистически значимо был больше, чем для ПААГ без нДА. Однако только иммобилизация нДА типа УДА-СП(тип  $\xi+$ ) и УДА-ГО-СП (30) приводила к увеличению коэффициента распределения больше единицы.

**Заключение.** Результаты экспериментов свидетельствуют, что включение в трехмерную сетку ПААГ нДА увеличивают сорбционную активность геля по отношению к билирубину.

Наиболее эффективны в отношении сорбции и удержания в объеме геля молекул билирубина являются нДА типа УДА-СП(тип  $\xi+$ ) и УДА-ГО-СП(30), возможно, это связано с тем, что их степень окисленности в 3 раза выше, чем у УДА-ЧОШ-СП-ПААГ. Таким образом, использование нДА данной степени окисленности можно рекомендовать в качестве лигандов для разработки гемосорбентов с целью снижения концентрации билирубина в плазме крови.

### Список цитированных источников

1. Даниленко, В. В. Из истории открытия синтеза наноалмазов / В. В. Даниленко // Физика твердого тела, 2004. — Т. 46, № 4. — С. 581–584.
2. Osawa, E. Superaromacity / E. Osawa, K. Kagaku // Chem. Abs., 1970. — Vol. 25. — P. 854–863.
3. Vapor deposition of diamond particles from methane / S. Matsumoto [et al.] // Jpn. J. Appl. Phys., 1982. — Vol. 21. — P. 183–185.
4. Bogatyreva, G. P. Diamond — an adsorbent of a new type / G. P. Bogatyreva, M. A. Marinich, V. L. Gvyazdovskaya // Diamond. Relat. Mater., 2000. — Т. 9, № 12. — P. 2002–2005.
5. Surface functionalisation of detonation diamond suitable for biological applications / A. Kryger [et al.] // J. Mater. Chem., 2006. — Vol. 16, № 24. — P. 2322–2328.
6. Shenderova, O. A. Carbon Nanostructures / O. A. Shenderova, V. V. Zhirnov, D. W. Brenner // Critical reviews in solid state and materials sciences, 2002. — Vol. 27, № 3–4. — P. 227–356.
7. Turcheniuk, K., Biomedical applications of nanodiamond (Review) / K. Turcheniuk, V. N. Mochalin // Nanotechnology, — 2017. — Vol. 28, № 25. — P. 1–28.



## Efficiency of carbon nanoparticles immobilized in polyacrylamide gel to remove bilirubin from human blood plasma

*Makarevich D. A.<sup>1</sup>, Ryabtseva T. V.<sup>1</sup>, Kauhanaka M. M.<sup>1</sup>,  
Zhaleika H. A.<sup>1</sup>, Shtemplyuk R. G.<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;*

*<sup>2</sup>Scientific and production closed joint-stock company "Sinta", Minsk, Republic of Belarus*

The sorption activity of polyacrylamide gel with respect to bilirubin was studied. It has been shown that the most effective in terms of sorption and retention of bilirubin molecules in the gel volume are detonation synthesis nanodiamonds of the UDD-SP type ( $\zeta^+$  type) and UDD-GO-SP(30) type.

**Keywords:** bilirubin, sorption, nanodiamond, polyacrylamide, plasma.

*Поступила 08.06.2022*



**Фармация**

**Pharmacy**

УДК 616.365: 547.567.5

## АНТИГИПОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗОХИНОНА В УСЛОВИЯХ ГИПЕРКАПНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

*Рашкевич О. С., Волчек А. В.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** В работе изучено антигипоксическое действие гидрохинона, 1,4-бензохинона и тимохинона при однократном внутрибрюшинном введении мышам на модели гиперкапнической гипоксии в герметическом объеме. Установлено, что 1,4-бензохинон в дозе 5 мг/кг на данной модели обладает существенным антигипоксическим эффектом, увеличивая время жизни животных в среднем на 82 % ( $p = 0,00017$ ), превосходя по этому показателю препарат сравнения беметил в дозе 100 мг/кг (54 %,  $p = 0,003$ ). В нашем исследовании в ряду гидрохинон — 1,4-бензохинон антигипоксической активностью обладала именно окисленная форма бензохинона. Также была установлена определенная тенденция к антигипоксическому действию тимохинона в дозе 5 мг/кг (увеличение продолжительности жизни на 28 %,  $p = 0,048$ ). В другой серии экспериментов было показано, что защитное антигипоксическое действие 1,4-бензохинона не сопровождается обнаруживаемыми неврологическими нарушениями и не ведет к отложенной гибели животных. Тимохинон и 1,4-бензохинон могут представлять интерес для дальнейших исследований в качестве индивидуальных антигипоксических средств, а также возможных компонентов в составе антигипоксических комбинаций.

**Ключевые слова:** 1,4-бензохинон, тимохинон, гидрохинон, мельдоний, беметил, гипоксия, гиперкапния, мыши.

**Введение.** Ишемическая цереброваскулярная и коронарная патологии сегодня занимают ведущие позиции во всем мире. Частота неотложных состояний, вызванных этими заболеваниями, и риск летальных осложнений чрезвычайно высоки. Эффективность фармакотерапии ишемической патологии недостаточна, а она сама в основном носит паллиативный характер. В частности, в США ежегодно регистрируют около 800 тыс. инсультов, из которых приблизительно 130 тыс., несмотря на терапию, заканчиваются летально [1]. В основе патологических изменений в тканях при ишемии лежит подавление аэробного образования энергии в результате нарушения энергосинтезирующей функции дыхательной цепи митохондрий. Другим вероятным фактором, имеющим важное значение в патогенезе ишемии, является активация перекисного окисления липидов и мембраноповреждающее действие свободных радикалов. Жизнеспособность клеток в зоне ишемии определяется многими факторами, главным из которых является сбалансированность ряда высокоэнергетических процессов — обеспечение функциональной активности клеток, поддержание мембранных структур и состава органелл [2]. В целях коррекции ишемических нарушений очевидна потребность в цитопротекторах и средствах, восста-

навливающих метаболические процессы. Подобным действием обладают так называемые антигипоксанты, применяемые в некоторых странах мира, однако эффективность и универсальность имеющихся препаратов требует уточнения. Помимо ишемической патологии сердца и мозга, антигипоксические средства могут быть полезны в терапии респираторной гипоксии (например, при тяжелом течении COVID-19 инфекции) и других состояниях.

В связи с этим поиск средств, повышающих устойчивость клеток и тканей к гипоксии, представляет большой интерес и является весьма актуальной задачей. Одно из перспективных направлений поиска потенциальных антигипоксических средств — производные хинона, которые известны антиоксидантными свойствами и влиянием на процессы генерации энергии в клетке.

**Цель работы** — изучение антигипоксических свойств 1,4-бензохинона, тимохинона и гидрохинона в скрининговом объеме исследования.

**Материалы и методы.** Исследование проведено в условиях экспериментальной лаборатории НИЧ БГМУ в соответствии с нормами биомедицинской этики и правилами гуманного обращения с животными, с соблюдением требований Европейской конвенции 86/609



ЕЕС. Антигипоксическое действие субстанций исследовали в опытах на 80 мышах-самцах линии С57В1/6 массой 28–38 г на модели гиперкапнической гипоксии в герметическом объеме [3].

Подопытные и контрольные группы по 8 мышей формировали методом рандомизации по массе тела в качестве ведущего признака. Опытные группы получали производные бензохинона в дозе 5 мг/кг, беметил в дозах 50 мг/кг и 100 мг/кг, мельдоний в дозе 50 мг/кг. Испытуемые соединения вводили внутривентрально однократно за 40 мин до эксперимента в объеме 0,1 мл/10 мг массы тела. Для растворения субстанций использовали изотонический водный раствор хлорида натрия с добавлением 1 % этанола и 1 % диметилсульфоксида. Контрольные животные получали эквивалентный объем растворителя. Для оценки антигипоксического действия животных по одному помещали в стеклянные контейнеры объемом 270 см<sup>3</sup>, герметичность контролировали путем погружения в сосуд с водой. Время жизни мышей регистрировали секундомером.

В другой серии экспериментов выживших после 30-минутной экспозиции при гиперкапнической гипоксии животных освобождали из герметического контейнера и немедленно подвергали тестированию общего неврологического статуса (пробы на нейротоксичность). Влияние соединений на ЦНС и вегетативные функции исследовали по методике Irvin в модификации Morgurgo. Наблюдение за животными проводили непрерывно на протяжении первых 6 ч после введения препаратов. В последующий период состояние животных отмечали дважды в сутки в течение 14 дней.

Тимохинон, гидрохинон и 1,4-бензохинон были предоставлены кафедрой радиационной медицины и химико-фармацевтических технологий химического факультета Белорусско-

го государственного университета; субстанция беметила (2-этилтиобензимидазола гидробромид) производства Института физико-органической химии Национальной Академии наук Беларуси, мельдоний производства Grin-dex (Латвия).

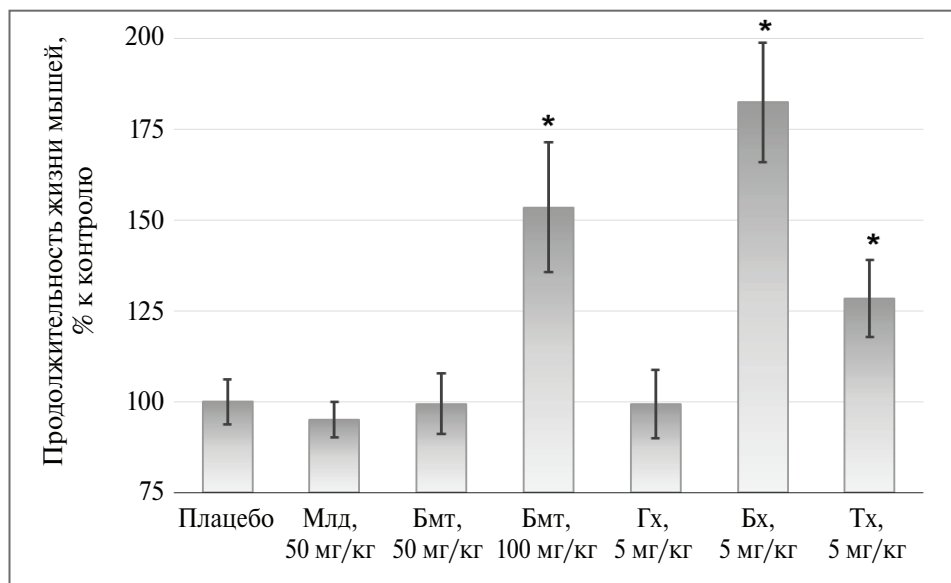
Полученные данные обрабатывали с использованием параметрического и непараметрического анализа по критериям *U*-Уилкоксона Манна – Уитни и Ньюмена – Келса. Различия между группами признавали достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** При помещении мышей в герметически закрытые емкости по мере потребления кислорода концентрация его в воздухе сосуда и организме снижается, а количество углекислого газа, наоборот, возрастает – развивается гипоксическая гипоксия с гиперкапнией. Первые признаки гипоксии у животных, получавших плацебо, появлялись, в среднем, на 15-й минуте нахождения в герметическом объеме. Вначале отмечали нарушение типичного поведения, отдельные признаки возбуждения, увеличение частоты дыхательных движений. В дальнейшем последовательно появлялись: шаткость и не координированность походки, утрачивалась способность удерживать позу, отдельные агональные вдохи, остановка дыхания и гибель. Средняя продолжительность жизни мышей контрольной группы в условиях гиперкапнической гипоксии в герметическом объеме 270 см<sup>3</sup> составляло  $19,9 \pm 1,2$  мин (таблица 1, рисунок 1). Препарат сравнения беметил при однократном внутривентральном введении в дозе 100 мг/кг повышал устойчивость животных к гипоксии. Типичные поведенческие проявления кислородного голодания у мышей появлялись значительно позже, а средняя продолжительность жизни была на 54 % больше в сравнении с группой контроля ( $30,5 \pm 3,6$  мин,  $p = 0,003$ ).

Таблица 1 — Влияние субстанций на продолжительность жизни мышей в условиях острой гипоксии с гиперкапнией

Субстанция	Продолжительность жизни, мин			Продолжительность жизни, в % к контролю		
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>m</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>m</i>
Плацебо ( $n = 16$ )	19,9	4,7	1,2	100	23,8	6,3
Мельдоний, 50 мг/кг ( $n = 8$ )	18,9	2,8	1,0	95,0	13,8	4,9
Беметил, 50 мг/кг ( $n = 8$ )	19,8	4,7	1,7	99,4	23,6	8,3
Беметил, 100 мг/кг ( $n = 8$ )	30,5*	10,0	3,6	153,5*	50,1	17,9
Гидрохинон, 5 мг/кг ( $n = 8$ )	19,8	5,3	1,9	99,4	26,5	9,4
1,4-бензохинон, 5 мг/кг ( $n = 8$ )	36,3*	9,3	3,3	182,5*	46,6	16,5
Тимохинон, 5 мг/кг ( $n = 8$ )	25,5*	6,0	2,1	128,4*	30,1	10,6

\*  $p < 0,05$  в сравнении с плацебо по критерию Ньюмена – Келса.



**Рисунок 1 — Влияние субстанций на продолжительность жизни мышей в условиях острой гипоксии с гиперкапнией:**

Млд — мельдоний; Бмт — беметил; Гх — гидрохинон; Бх — 1,4-бензохинон; Тх — тимохинон  
 (\* $p < 0,05$  в сравнении с плацебо по критерию Ньюмена — Келса)

Учитывая, что данная экспериментальная методика стабильно воспроизводилась, а результаты характеризовались относительно невысокой индивидуальной вариабельностью (коэффициент вариабельности  $SD \% < 15$  %), а также эффектом эталонного средства беметила, примененную модель можно считать репрезентативной для оценки антигипоксической активности и эффективности лекарственных средств. Другой препарат сравнения мельдоний в дозе 50 мг/кг однократно, который по данным литературы является эффективным на моделях гипоксии [3], не обнаруживал эффекта, и средняя продолжительность жизни животных была неотличима от получавших плацебо ( $p = 0,988$ ). Не оказывал антигипоксического действия и беметил в дозе 50 мг/кг ( $p = 0,999$ ).

Продолжительность жизни мышей, получавших тимохинон в дозе 5 мг/кг, составила  $25,5 \pm 2,1$  мин, что больше чем в группе плацебо на 28 % ( $p = 0,048$ ). Гидрохинон в дозе 5 мг/кг не влиял на показатель времени жизни животных ( $p = 0,970$  в сравнении с плацебо). Установлено, что 1,4-бензохинон при однократном введении в дозе 5 мг/кг обладал существенным антигипоксическим эффектом на данной модели, увеличивая время жизни животных в среднем на 82 % ( $p = 0,00017$ ), превосходя по этому показателю препарат сравнения беметил в дозе 100 мг/кг (54 %).

В другом эксперименте и аналогичных условиях проведения после 30-минутной экс-

позиции при гиперкапнической гипоксии в герметичном объеме животных, получавших 1,4-бензохинон в дозе 5 мг/кг ( $n = 8$ ), освобождали и определяли их общий неврологический статус. Среднее время жизни мышей из группы плацебо этой серии было  $21,0 \pm 1,76$  мин ( $n = 8$ ). Показано, что защитное антигипоксическое действие 1,4-бензохинона на всем протяжении эксперимента не сопровождалось обнаруживаемыми неврологическими нарушениями. К моменту извлечения животных из гипоксических условий не зафиксировано поведенческих проявлений кислородного голодания ( $n = 8$ ). Влияние 1,4-бензохинона на мышечный тонус определяли в тесте подтягивания на перекладине: все мыши при подвешивании за передние лапы на горизонтальную проволоку подтягивали задние конечности. Моторно-координационные функции тестировали по удержанию на вращающемся барабане тредбана при скорости 18 об/мин, критерием нормы служило сохранение равновесия более 3 мин. Дальнейшее наблюдение в течение 14 суток не выявило каких-либо отклонений либо гибели животных.

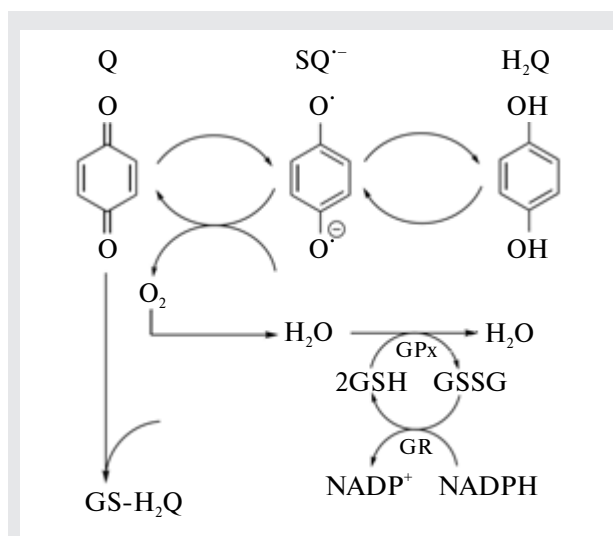
Таким образом, на экспериментальной модели гипоксии-гиперкапнии в герметичном объеме при однократном введении среди исследованных производных бензохинона в использованных дозах наибольшей антигипоксической активностью и эффективностью обладал 1,4-бензохинон, который статистически

значимо увеличивал продолжительность жизни мышей по сравнению с плацебо на 83 %. Действие тимохинона было существенно слабее, время жизни мышей в тех же условиях повышалось на 28 % по отношению к контролю. Восстановленное соединение 1,4-бензохинона — гидрохинон в эквимолярной дозе при однократном применении не оказывал антигипоксического действия, а по показателю продолжительности жизни животные этой экспериментальной группы принадлежали к единой генеральной совокупности с группой плацебо с вероятностью более 97 %. Установлено, что на данной экспериментальной модели антигипоксическим эффектом обладает именно окисленная форма бензохинона, различия показателей средней продолжительности жизни групп, получавших гидрохинон и 1,4-бензохинон, достоверны при  $p = 0,000037$ .

Определенный интерес представляют возможные механизмы обнаруженного в настоящем исследовании антигипоксического действия 1,4-бензохинона и тимохинона. Тимохинон, по литературным данным, ингибирует окислительный стресс *in vitro* и *in vivo* на различных экспериментальных моделях атеросклероза, метаболического синдрома, воспаления, цитотоксичности [4, 5]. Тимохинон ингибирует NF- $\kappa$ B и p53-зависимые процессы, а также повышает экспрессию супероксид дисмутазы 1, каталазы, глутатион пероксидазы 2 [4, 5]. Следует отметить, что однократного назначения препарата, примененного в нашем исследовании, было бы недостаточно для реализации перечисленных выше геномных эффектов. В целях активации геномных процессов адаптации следовало использовать индукционный режим введения.

В биохимических процессах хиноны могут существовать в трех формах окисленной (1,4-бензохинон), семихинон и восстановленной (гидрохинон). Для понимания возможных механизмов антигипоксического действия 1,4-бензохинона на рисунке 2 представлена схема окислительно-восстановительных превращений в системе бензохинон-семихинон-гидрохинон [6].

Известно, что превращения в системах бензохинон-семихинон-гидрохинон и бензохинон-гидрохинон протекают как с участием ферментов, так и неферментативно [6, 7]. Хиноны (бензохиноны) могут подвергаться биоредуктивной активации двумя путями — восстановлением одним или двумя электронами. Восстановление одним электроном дает семихинон, а восстановление двумя электронами



**Рисунок 2 — Окислительно-восстановительные превращения в системе бензохинон-семихинон-гидрохинон:**  
**Q — бензохинон; SQ<sup>•-</sup> — семихинон радикал анион; H<sub>2</sub>Q — гидрохинон; GSH — восстановленная форма глутатиона; GS-H<sub>2</sub>Q — глутатион-хинон; GSSG — окисленная форма глутатиона; GPx — глутатион-пероксидаза; GR — глутатион-редуктаза**

дает соответствующий гидрохинон. При нормальном уровне кислорода семихинон может окисляться до хинона, в процессе чего O<sub>2</sub> восстанавливается, приводя к образованию супероксидных анион-радикалов (O<sup>2-</sup>). В отсутствие кислорода семихиноны, образующиеся в результате одноэлектронного восстановления, не могут окисляться до хинонов, что приводит к накоплению семихинона и меньшего количества гидрохинона [7]. Таким образом, 1,4-бензохинон и его производное семихинон являются акцепторами электронов, а семихинон дополнительно может служить источником активных форм кислорода. Указанные превращения можно считать одним из возможных механизмов влияния 1,4-бензохинона на биоэнергетику для обеспечения выживания клеток при гипоксии.

**Заключение.** Результаты исследования показали, что 1,4-бензохинон и тимохинон обладают антигипоксическим эффектом и могут рассматриваться в качестве возможных индивидуальных антигипоксантов, а также как компоненты в составе синергичных антигипоксических комбинаций и представляют интерес для дальнейших изысканий.

**Список цитированных источников**

1. Heart Disease and Stroke Statistics — 2018 Update: A Report from the American Heart Association / E. J. Benjamin [et al.] // *Circulation*. — 2018. — Vol. 137. — P. e67–e492.
2. Егорова, М. С. Современные цитопротекторы (антигипоксанты, антиоксиданты): в чем феномен популярности в кардиологии и неврологии? / М. С. Егорова, Ю. Ю. Гармаш // *Український медичний часопис*. — 2017. — № 1. — С. 72–76.
3. Potentiation of the hypoxic preconditioning effect by antihypoxants / V. E. Novikov [et al.] // *Rev. Clin. Pharm. and Drug. Therapy*. — 2019. — № 17. — P. 37–44.
4. Thymoquinone and its pharmacological perspective: A review / S. Tabassum [et al.] // *Pharm. Res. Mod. Chin. Medicine*. — 2021. — Vol. 1. — P. 100020.
5. Thymoquinone and its therapeutic potentials. / S. Darakhshan [et al.] // *Pharm. Res.* — 2015. — Vol. 95–96. — P. 138–158.
6. Modelling changes in glutathione homeostasis as a function of quinone redox metabolism / R. A. Kelly [et al.] // *Sci. Rep.* — 2019. — № 9. — P. 6333.
7. Wellington, K. W. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones / K. W. Wellington // *RSC Adv.* — 2015. — № 5. — P. 20309–20338.

## **Antihypoxic effect of benzoquinone derivatives under hypercapnic hypoxia**

*Rashkevich O. S., Vauchok A. U.*

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

Due to the high incidence of ischemic pathology and the insufficient effectiveness of its therapy, the search for agents that increase the resistance of cells and tissues to hypoxia is of great interest and is a very urgent task. One of the promising directions in the search for potential antihypoxic agents is quinone derivatives, which are known for their antioxidant properties and influence on the processes of energy generation in the cell. In this work, the antihypoxic effect of hydroquinone, 1,4-benzoquinone and thymoquinone after a single intraperitoneal injection to mice on a model of hypercapnic hypoxia in a hermetic volume was studied. The experimental groups received benzoquinone derivatives at a dose of 5 mg/kg, bemethyl at doses of 50 mg/kg and 100 mg/kg, meldonium at a dose of 50 mg/kg intraperitoneally once 40 minutes before the experiment in a volume of 0.1 ml/10 mg of body weight. It was found that 1,4-benzoquinone at a dose of 5 mg/kg has a significant antihypoxic effect, increasing the life time of animals by an average of 82 %, surpassing the reference drug bemethyl at a dose of 100 mg/kg (54 %) in this model. In our study, in the series hydroquinone — 1,4-benzoquinone, the oxidized form of benzoquinone had antihypoxic activity. A certain trend towards the antihypoxic effect of thymoquinone at a dose of 5 mg/kg was also established (an increase in life expectancy by 28 %). In another series of experiments was shown that the protective antihypoxic effect of 1,4-benzoquinone is not accompanied by detectable neurological disorders and does not lead to delayed death of animals. Thymoquinone and 1,4-benzoquinone may be of interest for further research as individual antihypoxic agents, as well as possible components in synergetic antihypoxic combinations.

**Keywords:** 1,4-benzoquinone, thymoquinone, hydroquinone, meldonium, bemethyl, hypoxia, hypercapnia, mice.

*Поступила 27.06.2022*



УДК [616.276+615.212]: 547.567.5

## ВЛИЯНИЕ 1,4-БЕНЗОХИНОНА И ТИМОХИНОНА НА КАРРАГЕНИНОВОЕ ВОСПАЛЕНИЕ У МЫШЕЙ

*Рашкевич О. С., Волчек А. В.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** В работе изучены противовоспалительные свойства 1,4-бензохинона и тимохинона при однократном внутрибрюшинном введении на модели каррагенинового отека лапы у мышей. Показано, что исследованные производные хинона обладают значительным зависимым от дозы противовоспалительным эффектом. При этом рассчитанная методом регрессионного анализа среднеэффективная доза 1,4-бензохинона на данной модели составила 4,47 мг/кг, а среднеэффективная доза тимохинона — 57 мг/кг. Так, 1,4-бензохинон и тимохинон могут представлять интерес для дальнейших исследований в качестве индивидуальных противовоспалительных средств, а также возможных компонентов в составе противовоспалительных комбинаций.

**Ключевые слова:** 1,4-бензохинон, тимохинон, диклофенак, НПВС, воспаление, мышцы, каррагенин.

**Введение.** Воспаление — это универсальная сосудисто-мезенхимальная реакция организма на повреждение, в которой участвуют факторы гуморального и клеточного иммунитета, система гемостаза и процессы репарации. Это явление характерно для большинства заболеваний, с биологической точки зрения оно выполняет защитно-приспособительную функцию и в конечном итоге направлено на восстановление гомеостаза. В клинической практике воспалению рассматривают как патологический процесс, приводящий к деструкции и нарушению функции тканей. В связи с этим фармакологические модуляторы воспаления имеют большое значение и широко используются в медицине. Для уменьшения отека тканей, боли и других симптомов при воспалении применяют главным образом две группы лекарств: нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) и глюкокортикостероиды (ГКС).

ГКС ингибируют как клеточный, так и гуморальный компонент воспалительной реакции, снижают продукцию вазоактивных и хемоаттрактивных факторов, уменьшают секрецию липолитических и протеолитических ферментов, подавляют экстравазацию лейкоцитов в области повреждения, тормозят экспрессию провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ ), а также циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) и NOS2. Плейотропность противовоспалительного действия ГКС обуславливает чрезвычайно высокую эффективность этих средств, однако такие побочные эффекты, как надпочечниковая недостаточность, водно-электролитные нарушения, гипертензия, ги-

пергликемия, повышенная восприимчивость к инфекциям, пептические язвы, остеопороз, миопатии, поведенческие расстройства, катаракта, задержка роста и характерный габитус передозировки стероидов препятствуют их широкому применению.

НПВС представляют собой одну из наиболее востребованных групп лекарственных средств для лечения воспаления и боли. Они нашли широкое применение благодаря их безопасности, доступности и удовлетворительной эффективности. Противовоспалительное, болеутоляющее и жаропонижающее действие этих препаратов связано со снижением ЦОГ2-зависимого синтеза простагландинов (ПГ). Однако противовоспалительный эффект НПВС ограничен определенным пределом, выше которого он не может возрасти при простом увеличении дозы. На экспериментальных моделях воспаления кривая доза—эффект ингибиторов ЦОГ выходит на плато при ингибировании (в зависимости от применяемого индуктора или ирританта) от 20 до 70 % воспалительного отека [1], что обусловлено различным, но ограниченным вкладом ПГ в патологический процесс. Очевидно, что эффективность НПВС нельзя повысить путем совместного применения нескольких ингибиторов ЦОГ. Поэтому определенный интерес представляет поиск средств, влияющих на другие медиаторы острой фазы воспаления и использование таких соединений, как для монотерапии, так и в комбинации с НПВС.

Одно из перспективных направлений поиска потенциальных противовоспалительных

средств — производные хинона, которые известны антиоксидантными свойствами и влиянием на процессы генерации энергии в клетке. В настоящей работе представлены результаты изучения противовоспалительных свойств двух субстанций, выбранных в ходе предварительного скринингового исследования — тимохинона и 1,4-бензохинона, на модели острого каррагенинового воспаления у мышей.

**Цель работы** — изучение противовоспалительной активности и эффективности тимохинона и 1,4-бензохинона на модели острого каррагенинового воспаления у мышей.

**Материалы и методы.** Исследование проведено в условиях экспериментальной лаборатории НИЧ БГМУ в соответствии с нормами биомедицинской этики и правилами гуманного обращения с животными, с соблюдением требований Европейской конвенции 86/609 ЕЕС. Противовоспалительную активность субстанций исследовали в опытах на 50 нелинейных мышках-самцах массой 26–32 г на модели острого каррагенинового отека лапы, воспроизводящего экссудативно-клеточную фазу воспаления. Лямбда-каррагенин — ионогенный полисахарид, модельный флогогенный агент, широко используемый в экспериментальной медицине для скрининга и изучения противовоспалительных средств. Субплантарное введение каррагенина вызывает у мышей выраженную воспалительную реакцию, характеризующуюся 3-фазной динамикой течения. Первая фаза (нарастания отека) — занимает около 2 ч после инъекции флогогена, вторая фаза (плато) продолжается примерно два последующих часа и третья фаза (регрессии отека) занимает последующие от 4 до 12 ч, завершаясь обычно восстановлением исходных параметров конечности. Молекулярный механизм воспаления после введения в ткани геля каррагенина включает: индукцию ИЛ-8; посредством толл-подобных рецепторов типов 4 и 6 и активных форм кислорода активацию NF- $\kappa$ B; наработку ПГ E2. Цитокины ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  не принимают участия в инициации каррагенинового воспаления [2]. Ирритант лямбда-каррагенин приобретен в Sigma Aldrich (США). Субстанции тимохинона и 1,4-бензохинона были предоставлены кафедрой радиационной медицины и химико-фармацевтических технологий химического факультета Белорусского государственного университета; использован диклофенак производства «Берлин-Хеми АГ» (Германия).

Подопытные и контрольные группы по 6 мышей формировали методом рандомизации по массе тела в качестве ведущего признака. За

40 мин до индукции воспаления животным внутрибрюшинно в объеме 0,4 мл/10 г массы тела вводили препараты: 1,4-бензохинон в дозах 1 мг/кг, 2 мг/кг и 5 мг/кг; тимохинон в дозах 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг, составляющих менее 1/10 LD<sub>50</sub>. В качестве препарата сравнения применяли диклофенак в дозе 10 мг/кг, обладающий стандартной для НПВС противовоспалительной эффективностью и использующийся в качестве эталона в подобных исследованиях. Для растворения субстанций использовали изотонический водный раствор хлорида натрия с добавлением 1%-го этанола и 1%-го диметилсульфоксида. Контрольные животные получали эквивалентный объем растворителя.

Острое воспаление вызывали путем введения 1%-го водного раствора лямбда-каррагенина по 0,03 мл под плантарный апоневроз задней правой лапы. Воспалительную реакцию оценивали по величине отека стопы через 1, 2, 3, 4, 5 и 24 ч после инъекции флогогена. Толщину стопы измеряли с помощью микрометрического устройства с точностью до 0,01 мм в условиях постоянного давления. Величину отека выражали в миллиметрах. Противовоспалительный эффект соединений определяли по индексам ингибирования (*I*) различных фаз воспалительной реакции в сравнении с плацебо и рассчитывали по формуле

$$I = \frac{100 \cdot (Sd - Sp)}{Sp},$$

где *Sd* и *Sp* — средние значения площадей под кинетическими кривыми отека лапы соответственно для групп, получавших испытуемые препараты или плацебо.

Значения *Sd* и *Sp* находили методом суммирования площадей трапеций под кривыми в координатах время—эффект. Полученные данные обрабатывали с использованием параметрических и непараметрических критериев вариационной статистики. Различия между группами признавали достоверными при  $p < 0,05$ . Эффективные дозы (ED16–ED84) субстанций определяли методом регрессионного анализа с использованием вычислительных возможностей компьютерной программы Microsoft Excel. Уравнение регрессии считали качественным при ошибке аппроксимации данных менее 15 %.

**Результаты и их обсуждение.** Действие диклофенака, тимохинона и 1,4-бензохинона на динамику острого каррагенинового воспаления лапы у мышей представлено в таблицах 1–3.

Таблица 1 — Влияние диклофенака, тимохинона и 1,4-бензохинона на динамику острого каррагенинового воспаления лапы у мышей ( $M \pm m$ )

Субстанция	Доза мг/кг	Прирост толщины стопы (мм)					
		1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч	24 ч
Плацебо	—	0,82 ± 0,06	0,94 ± 0,07	0,99 ± 0,04	0,74 ± 0,06	0,61 ± 0,07	0,56 ± 0,06
Диклофенак	10	0,62 ± 0,05	0,70 ± 0,11	0,65 ± 0,06*	0,54 ± 0,08	0,43 ± 0,05	0,32 ± 0,04
Тимохинон	5	0,74 ± 0,06	0,77 ± 0,07	0,78 ± 0,05	0,54 ± 0,03	0,51 ± 0,04	0,44 ± 0,04
	10	0,72 ± 0,08	0,62 ± 0,10*	0,82 ± 0,12	0,71 ± 0,11	0,50 ± 0,09	0,37 ± 0,06
	20	0,70 ± 0,05	0,68 ± 0,06	0,76 ± 0,08*	0,57 ± 0,09	0,47 ± 0,07	0,36 ± 0,05
1,4-бензохинон	1	0,75 ± 0,06	1,19 ± 0,07	0,93 ± 0,04	0,81 ± 0,05	0,64 ± 0,05	0,55 ± 0,04
	2	0,70 ± 0,06	0,97 ± 0,12	0,87 ± 0,64	0,77 ± 0,04	0,61 ± 0,02	0,53 ± 0,03
	5	0,55 ± 0,07	0,64 ± 0,07*	0,63 ± 0,07*	0,61 ± 0,08	0,52 ± 0,08	0,38 ± 0,02

\*  $p < 0,05$  в сравнении с плацебо по критерию Дункана;  $n = 6$ .

Таблица 2 — Площади под кривой (AUC) различных фаз каррагенинового воспаления лапы ( $mm^2$ ) у мышей диклофенака, тимохинона и 1,4-бензохинона ( $M \pm m$ )

Субстанция	Доза, мг/кг	Фазы воспалительного отека			
		0–2 ч	2–5 ч	0–5 ч	0–24 ч
Плацебо	—	1,29 ± 0,08	2,51 ± 0,10	3,80 ± 0,16	4,39 ± 0,22
Диклофенак	10	0,96 ± 0,10*	1,75 ± 0,20*	2,71 ± 0,30*	3,08 ± 0,32*
Тимохинон	5	1,13 ± 0,09	1,95 ± 0,10	3,08 ± 0,19	3,55 ± 0,18
	10	1,03 ± 0,13	2,09 ± 0,30	3,11 ± 0,43	3,54 ± 0,48
	20	1,04 ± 0,08	1,90 ± 0,22*	2,94 ± 0,29*	3,35 ± 0,34*
1,4-бензохинон	1	1,34 ± 0,08	2,65 ± 0,09	3,40 ± 0,12	4,58 ± 0,13
	2	1,18 ± 0,10	2,43 ± 0,15	3,61 ± 0,22	4,18 ± 0,22
	5	0,84 ± 0,10*	1,81 ± 0,22*	2,67 ± 0,31*	3,13 ± 0,35*

\*  $p < 0,05$  в сравнении с плацебо по критерию Дункана;  $n = 6$ .

Таблица 3 — Индексы ингибирования различных фаз каррагенинового воспаления лапы (%) у мышей диклофенака, тимохинона и 1,4-бензохинона ( $M \pm m$ )

Субстанция	Доза, мг/кг	Фазы воспалительного отека			
		0–2 ч	2–5 ч	0–5 ч	0–24 ч
Диклофенак	10	–25,3 ± 8,0*	–30,4 ± 7,9*	–28,7 ± 7,8*	–29,7 ± 7,2*
Тимохинон	5	–12,7 ± 7,2	–22,1 ± 4,1	–18,9 ± 4,9	–19,0 ± 4,0
	10	–20,5 ± 10,2	–16,8 ± 12,1	–18,1 ± 11,4	–19,2 ± 11,0*
	20	–19,5 ± 5,9	–24,3 ± 8,6*	–22,7 ± 7,6*	–23,7 ± 7,8*
1,4-бензохинон	1	+3,9 ± 6,5	+5,6 ± 3,7	+5,0 ± 3,2	+4,4 ± 3,0
	2	–8,5 ± 7,5	–3,1 ± 5,8	–4,9 ± 5,9	–4,7 ± 4,9
	5	–32,2 ± 7,8*	–27,7 ± 8,6*	–29,2 ± 8,2*	–28,5 ± 8,0*

\* —  $p < 0,05$  в сравнении с плацебо по критерию Дункана;  $n = 6$ .

Каррагенин при введении под плантарный апоневроз у мышей вызывал выраженный воспалительный отек, увеличивая толщину лапы в среднем на  $0,99 \pm 0,04$  мм. Острая фаза воспаления продолжалась около 5 ч, максимальные показатели отека лапы регистрировали на 2–3 ч после инъекции каррагенина. Полученные данные свидетельствуют о высокой активности модельного флогогена.

Диклофенак, классическое НПВС, в дозе 10 мг/кг статистически значимо ( $p = 0,014$  по критерию Дункана) подавлял все фазы отека лапы у мышей, индекс ингибирования острой фазы воспаления составил  $-28,7 \pm 7,8$  (таблицы 1–3), эффект препарата сохранялся на одном уровне на протяжении всего эксперимента. Учитывая, что реакция на каррагенин стабильно воспроизводится и характеризуется

относительно невысокой индивидуальной вариабельностью ответа (коэффициент вариации SD % составляет <20 %), а также эффект эталонного средства диклофенака, примененная модель каррагенинового воспаления у мышей является репрезентативной для оценки противовоспалительной активности и эффективности лекарственных средств.

В дозах 1 и 2 мг/кг 1,4-бензохинон, испытанный на каррагениновой модели воспаления, не оказывал существенного влияния на величину экссудативного отека лапы у мышей. В дозе 5 мг/кг препарат обладал значительным противовоспалительным действием, приближаясь к эффекту препарата сравнения диклофенака в дозе 10 мг/кг (см. таблицы 1–3, рисунок 1).

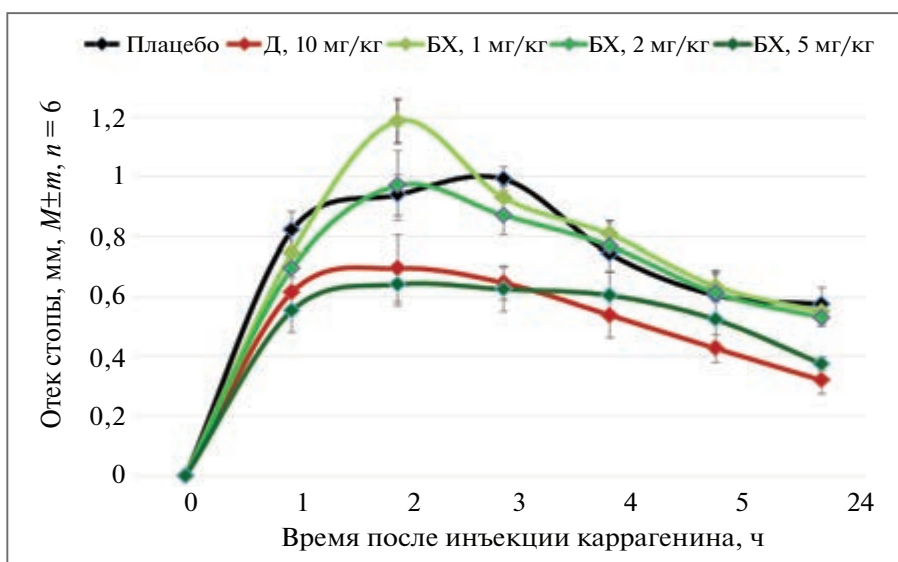


Рисунок 1 — Влияние диклофенака (Д) и 1,4-бензохинона (БХ) на динамику острого каррагенинового воспаления лапы у мышей (по данным таблицы 1)

По выраженности действия на каждую фазу воспалительного отека в отдельности, продолжительности действия и по интегральному индексу ингибирования 1,4-бензохинон в дозе 5 мг/кг полностью соответствовал препарату сравнения. Регрессионный анализ показал стойкую зависимость доза–противовоспалительный эффект в изученном диапазоне доз, данная закономерность сохранялась на

протяжении всего периода наблюдений. При высоком уровне качества аппроксимации данных (точность более 95 %), рассчитанная среднеэффективная доза 1,4-бензохинона ( $ED_{50}$ ) на данной модели — 4,47 мг/кг;  $ED_{16}$  и  $ED_{84}$  составили, соответственно, 2,7 мг/кг и 7,5 мг/кг. Кривые доза–эффект 1,4-бензохинона в лог-нормальных координатах представлены на рисунке 2.

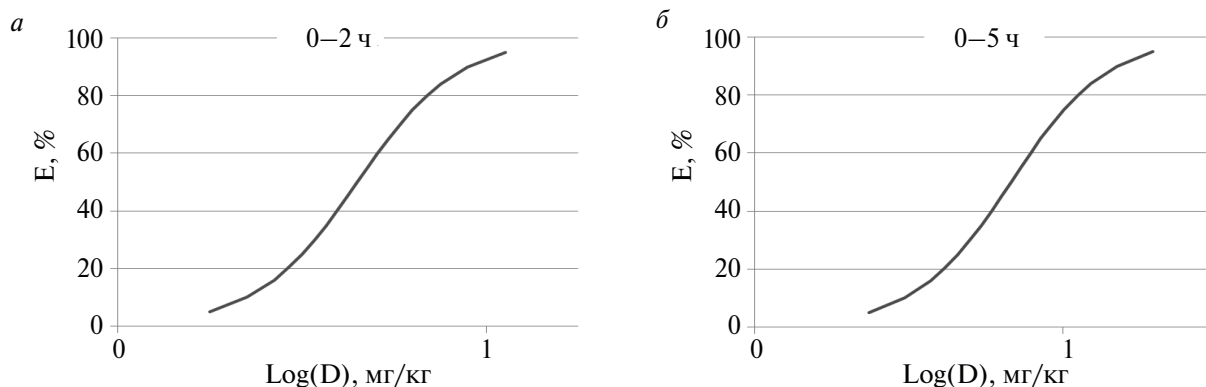


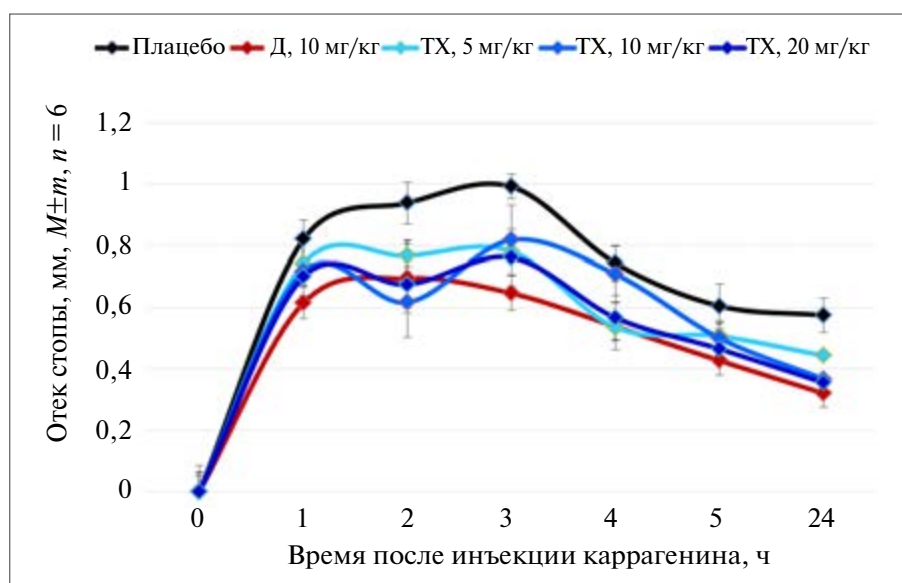
Рисунок 2 — Кривые регрессии доза–противовоспалительный эффект 1,4-бензохинона в лог-нормальных координатах на модели острого каррагенинового воспаления лапы у мышей в начальную и острую фазы отека



Постоянный на протяжении всего эксперимента наклон кривой доза–эффект свидетельствует об едином механизме противовоспалительного действия препарата на все фазы каррагенинового отека.

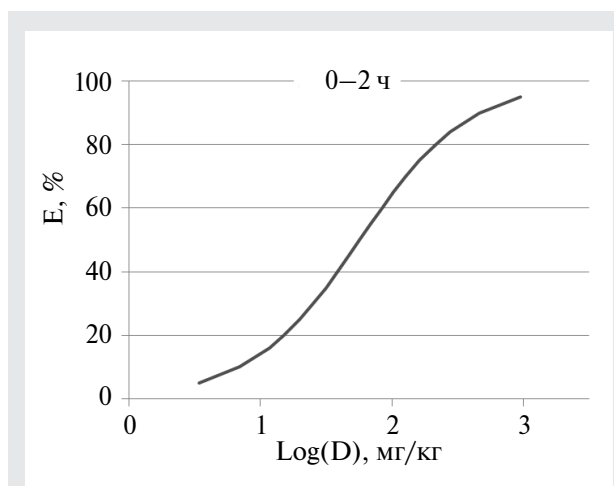
Тимохинон в дозах 5, 10 и 20 мг/кг в различные фазы острой воспалительной реакции угнетал отечную реакцию на флогоген на 18–

24 %, а его расчетная ED<sub>50</sub> по противовоспалительному эффекту составила 56,9 мг/кг. Действие препарата заметно ослабилось на третий час после введения. Регрессионный анализ показал дозозависимый характер изменения величины воспалительного отека у мышей, получавших тимохинон (рисунки 3–4).



**Рисунок 3 — Влияние диклофенака (Д) и тимохинона (ТХ) на динамику острого каррагенинового воспаления лапы у мышей (по данным таблицы 1)**

Большой интерес представляют возможные механизмы противовоспалительного действия 1,4-бензохинона и тимохинона. По литературным данным, тимохинон подавляет окислительный стресс *in vitro* и *in vivo* на различных экспериментальных моделях атеросклероза, метаболического синдрома, воспаления, цитотоксичности [3, 4]. Тимохинон ингибирует NF-κB и p53-зависимые процессы, а также повышает экспрессию супероксид дисмутазы 1, каталазы, глутатион пероксидазы 2 [5]. Противовоспалительное действие тимохинона может реализовываться путем ингибирования ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-6 и ФНО-α миелопероксидаз и фактора активации тромбоцитов, снижением выработки лейкотриенов, подавлением продукции NO-макрофагами [6, 7]. В целом биологические эффекты тимохинона и других производных хинона отличаются значительным разнообразием, а для многих из них доказана плеiotропность действия. В связи с тем, что влияние хинонов на воспаление не ограничивается ингибированием ЦОГ-зависимого синтеза ПГ, они могут быть перспективны для создания синергичных противовос-



**Рисунок 4 — Закономерность доза–противовоспалительный эффект тимохинона в лог-нормальных координатах на модели острого каррагенинового воспаления лапы у мышей в начальную фазу отека**

палительных комбинаций, эффективность которых может оказаться выше таковой у НПВС.

**Заключение.** Результаты исследования показали, что 1,4-бензохинон и тимохинон обладают значительным противовоспалительным

эффектом и могут рассматриваться в качестве возможных индивидуальных противовоспалительных средств, а также как компоненты в составе синергичных противовоспалительных комбинаций и представляют интерес для дальнейших изысканий.

#### Список цитированных источников

1. Rainsford, K. D. Aspirin and Related Drugs / K. D. Rainsford // Taylor & Francis, London, 2004. — P. 242–245.
2. Myers, M. J. Molecular mechanism of action responsible for carrageenan-induced inflammatory response / M. J. Myers, C. M. Deaver, A. J. Lewandowski // Mol. Immunol. — 2019. — № 109. — P. 38–42.
3. Perspectives on medicinal properties of benzoquinone compounds / P. R. Dandawate [et al.] // Mini. Rev. Med. Chem. — 2010. — № 10(5). — P. 436–454.
4. Chandra, S. HIV-1 protease inhibitor induced oxidative stress suppresses glucose stimulated insulin release: protection with thymoquinone / S. Chandra, D. Mondal, K. C. Agrawal // Exp. Biol. Med. (Maywood). — 2009. — № 234. — P. 442–453.
5. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats / O. A. Badary [et al.] // Toxicology. — 2000. — № 143. — P. 219–226.
6. Mansour, M. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone / M. Mansour, S. Tornhamre // J. Enzyme Inhibit. Med. Chem. — 2004. — № 19. — P. 431–436.
7. El Gazzar, M. A. Thymoquinone suppresses in vitro production of IL-5 and IL-13 by mast cells in response to lipopolysaccharide stimulation / M. A. El Gazzar // Inflamm. Res. — 2007. — № 56. — P. 345–351.

## Effect of 1,4-benzoquinone and thymoquinone on carragenine inflammation in mice

*Rashkevich O. S., Vauchok A. U.*

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

Anti-inflammatory properties of 1,4-benzoquinone and thymoquinone after a single intraperitoneal injection in a model of carrageenan paw edema in mice were studied. Tested quinone derivatives have a significant dose-dependent anti-inflammatory effect. The average effective dose of 1,4-benzoquinone calculated by the method of regression analysis in this model is 4.47 mg/kg; the average effective dose of thymoquinone is 57 mg/kg. 1,4-benzoquinone and thymoquinone may be of interest for further research as individual anti-inflammatory agents, as well as possible components in anti-inflammatory combinations.

**Keywords:** 1,4-benzoquinone, thymoquinone, diclofenac, NSAIDs, inflammation, mice, carrageenan.

*Поступила 27.06.2022*

УДК 617-089.844

## ВОЗМОЖНОСТИ ФОТОИНДУЦИРОВАННОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ХИРУРГИИ СУХОЖИЛИЙ СГИБАТЕЛЕЙ ПАЛЬЦЕВ КИСТИ

*Титова А. Д., Волотовский А. И., Довгалевиц И. И., Людчик А. В.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Вопрос оптимального подхода к лечению поврежденных сухожилий сгибателей пальцев кисти на сегодняшний день остается открытым для кистевых хирургов. Сложность анатомического строения сухожильного аппарата пальцев кисти с высоким риском спаечного процесса часто приводит к неудовлетворительным результатам лечения в раннем послеоперационном периоде. Поиск путей улучшения регенерации сухожилий сгибателей, направленных на снижение адгезии к окружающим тканям, является актуальной темой современной хирургии кисти.

**Ключевые слова:** гиалуроновая кислота, паратенон, сухожилия сгибателей кисти.

**Введение.** Сухожилие — ключевое звено анатомии движений. Тонкая связь между объектом приложения силы и «мышечным мотором» с очень сложной организацией. Сухожилия сгибателей пальцев кисти вследствие анатомического строения являются одной из самой сложной локализации для полного восстановления функции после повреждения. Особенности обусловлены количеством мелких суставов кисти, где изменяется кинематическая ось и возрастает сила трения и нагрузка на сухожилие, что компенсируется сухожильным влагалищем и синовиальной жидкостью. Для обеспечения направленного движения пальцев кисти удержание сухожилий сгибателей в правильном положении осуществляется поддерживающим аппаратом — кольцевидными и крестообразными связками, фиксирующими сухожилие в костно-фиброзном канале. Таким образом, сложность сухожильного аппарата пальцев кисти, обусловленная большим количеством соединительнотканых элементов, сосредоточенных в узком пространстве, является «источником проблем» при регенерации после повреждений. Изучение механизмов заживления сухожилий, выявление причин образования спаек, глубокое понимание процессов, лежащих в основе посттравматических изменений в сухожилии будет способствовать повышению эффективности лечения пациентов с травмами сгибательного аппарата пальцев кисти. Несмотря на развитие хирургии кисти как отдельного направления травматологии, неудовлетворительные результаты восстановления сухожилий сгибателей кисти достигают до 20 %

среди изолированных травм и до 60 % при множественных повреждениях кисти [1]. Непредсказуемость результатов после хирургического восстановления сгибательного аппарата пальцев кисти обусловлена невозможностью спрогнозировать выраженность адгезивных процессов в зоне первичного шва к окружающим тканям с последующим развитием стойких контрактур. Одним из путей решения проблемы образования спаек в сухожильном канале является ранняя мобилизация, стимулирующая внутренние факторы заживления с ускорением созревания и ремоделирования сухожильного шва. Кроме того, экскурсия сухожилия создает эффект помпы, улучшая его питание. Однако ранняя мобилизация является фактором для снижения прочности рубца с его удлинением и снижением амплитуды движений в суставах в отдаленном периоде, а также увеличивает риск разрывов в зоне шва сухожилия. В то же время длительная иммобилизация после травмы приводит к снижению плотности тенобластов и деградации коллагена, а также активной экссудации в зоне шва, что усиливает спаечные процессы. Таким образом, поиск путей улучшения регенерации сухожилий после повреждения с выработкой индивидуальных подходов к восстановительному лечению является актуальной темой для современной хирургии кисти. Разработка и внедрение в клиническую практику алгоритма комбинированного лечения повреждения сухожилий сгибателей и соединительнотканых структур пальцев кисти — приоритетная задача для хирургии сухожилий.

**Цель работы** — изучение влияния препаратов низкомолекулярной гиалуроновой кислоты на регенерацию сухожилий после повреждения.

**Материалы и методы.** В процессе восстановления сухожилия после повреждения выделяют три фазы (по Strickland J.W., 1995). Первая фаза (воспаления) — самая короткая 3–5 дней, связана с формированием кровяного сгустка в зоне повреждения с его последующей организацией и выпадением фибрина в области сухожильного шва. В ходе первой фазы образуются тромбы на месте поврежденных капилляров. Ключевым моментом первых дней является активная продукция факторов роста фибробластов и ангиогенных факторов роста.

Пролиферативная фаза характеризуется синтезом коллагена, преимущественно I и III типов, а также других элементов внеклеточного матрикса. В эту фазу происходит активная пролиферация фибробластов и эндотелиальных клеток с формированием источников кровоснабжения. В третьей фазе (созревания) продолжается синтез коллагена, но главный компонент этой фазы — правильная продольная переориентировка волокон с формированием сухожилиеподобной ткани. Гистологически от сухожильной ткани сформировавшийся рубец отличается большим количеством клеточных элементов и капилляров, а также менее упорядоченной ориентацией волокон (таблица 1) (по Strickland J. W., 1995) [2, 3].

Таблица 1 — Биология сращения сухожилия

Фаза	Процесс регенерации
Экссудативная (воспалительная) фаза (0–5-е сутки)	Между краями сухожилий образуется кровяной сгусток, происходит пролиферация и миграция фибробластов, выполняющих функцию фагоцитов. Прочность иммобилизованного сухожилия снижается с 3 по 5-е сутки по причине нарастания отека и размягчения концов сухожилий
Пролиферативная (фибропластическая) фаза (5–28-е сутки)	В области повреждения начинается образование коллагена. Вначале фазы волокна коллагена в области сухожильного шва ориентированы случайным образом, но затем приобретают продольную направленность. Прочность сухожильного шва увеличивается и к 28-му дню становится достаточной для того, чтобы выдержать активное сокращение мышцы
Фаза ремоделирования (после 28 суток)	Происходит дифференцировка тканей, рубцы становятся менее жесткими, начинается восстановление баланса между образованием коллагена и его лизисом. Волокна коллагена в области шва постепенно замещаются вновь образованным продольно ориентированным коллагеном, что повышает прочность шва

Таким образом, после ушивания концов поврежденного сухожилия сгибателя пальцев кисти формирование сухожилиеподобной ткани происходит в узком пространстве костнофиброзного канала в зоне сухожильного шва. В литературе отмечается, что первые 2–3 недели развивается отек поврежденных концов сухожилия, что временно, но существенно снижает прочность шва, приводя к его рубцовому удлинению и снижению амплитуды движений и силы хвата. Повреждение паратенона с пролиферативной реакцией также значительно ухудшает скользящие свойства сухожилия, снижает амплитуду вплоть до полного отсутствия движений [4]. Исходя из особенностей регенерации сухожилий, для получения хороших результатов лечения необходимо преимущественно влиять

на первую фазу сращения путем снижения экссудации и на вторую фазу путем увеличения пролиферации клеточных и внеклеточных элементов сухожильной ткани и снижения адгезии рубца к окружающим тканям.

Клиническое применение препаратов гиалуроновой кислоты для регенерации соединительнотканых структур является предметом изучения исследователей многих специальностей, так как натриевая соль гиалуроновой кислоты содержится в высокой концентрации в синовиальной жидкости, внеклеточном матриксе синовиальных оболочек, в волокнах связочного аппарата и других соединительнотканых структурах организма. Имеются данные, доказывающие возможности стимуляции миграции фибробластов и клеточной пролифе-



рации, улучшение дренирования соединительной ткани, акцепцию активных форм кислорода и блокирование перекисного окисления липидов [5]. Препараты гиалуроновой кислоты способны оказывать выраженный гидратирующий эффект, стимулируя трофические процессы в коже, слизистых и окружающих соединительных тканях. Исходя из описанных выше свойств спектр болезней и состояний, при которых препараты гиалуроновой кислоты оказывают эффективное воздействие, весьма широкий.

Для изучения влияния препаратов низкомолекулярной гиалуроновой кислоты на регенерацию поврежденной сухожильной ткани нами был проведен эксперимент по моделированию поперечного рассечения ахиллового сухожилия крыс с последующей его реконструкцией.

Экспериментальное исследование выполнено на базе ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» с использованием крыс-самцов линии *Wistar* ( $n = 12$ ) в возрасте не менее 6 мес. Животные содержались в условиях вивария со свободным доступом к воде и пищи в соответствии с нормами ГОСТ-33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными».

Модель выполнена на скакательном комплексе задней конечности крысы — трехглавой мышце голени, состоящей из трех головок, переходящих в общее ахиллово сухожилие к бугру пяточной кости.

Линейным доступом вдоль структур скакательного комплекса по заднелатеральной поверхности голени крысы от уровня нижней трети бедра до бугра пяточной кости проведено хирургическое вмешательство на ахилловом сухожилии (12 лап). Подопытные животные были разделены на 3 группы по 4 особи в каждой.

В первой (контрольной) группе (I) было проведено поперечное пересечение ахилла с наложением двух блокирующих швов нитью Даклон 5/0.

Во второй группе (нативной гиалуроновой кислоты) (II) было проведено поперечное пересечение ахилла с наложением двух блокирующих швов нитью Даклон 5/0 с введением в область шва и аппликацией препарата нативной низкомолекулярной гиалуроновой кислоты Гиалин вокруг паратенона.

В третьей группе (фотоиндуцированная гиалуроновая кислота) (III) было проведено поперечное пересечение ахилла с наложением двух блокирующих швов нитью Даклон 5/0 с

введением в область шва и паратенона препарата фотоиндуцированной низкомолекулярной гиалуроновой кислоты Гиалин.

Техника оперативного вмешательства: линейный доступ по заднелатеральной поверхности в проекции ахиллового сухожилия с его выделением от окружающих тканей от зоны сухожильно-мышечного перехода до места прикрепления к пяточной кости. Поперечное пересечение производилось посередине сухожильного отрезка. С целью раннего возврата животных к уровню предоперационной активности выбрали два блокируемых шва сухожилия конец в конец во встречных направлениях нитью Даклон 5/0. Прочность шва проверялась сгибательно-разгибательными движениями лапы животного. Кожный разрез ушивался нитью ПГА 5/0 непрерывно внутрикжно с погружением узла под кожу. Послеоперационный период без ограничений.

Заживление послеоперационных ран без осложнений у всех 12 животных.

**Результаты и их обсуждение.** Оценка восстановления двигательной и опорной функции лап производилась путем наблюдения за животным. Первую неделю все крысы прихрамывали на оперированную конечность. Исчезновение хромоты с восстановлением нормальной походки у прооперированных животных наблюдалось ко 2-й неделе эксперимента.

Сроки выведения из эксперимента были обусловлены биологией сращения сухожилий и приближены для человека. Вывод из эксперимента осуществлялся через 6 недель с момента операции с выделением макропрепарата сухожилия скакательного комплекса задней лапы крыс и окружающих мягких тканей.

Макропрепарат первой группы резко отличался внешне от препаратов второй и третьей группы, которые были схожи между собой. При попытке выделения макропрепарата контрольной группы выявлен выраженный спаечный процесс с окружающими тканями, фактически в зоне шва сухожилия образовался рубцовый конгломерат. Визуально дифференцировать сухожилие от рубцовой ткани не представлялось возможным. Адгезия паратенона, сухожилия и окружающих тканей наблюдалась как в зоне шва, так и на протяжении скакательного комплекса. В группах II и III клиническая картина результата лечения не отличалась между собой и резко контрастировала с результатом группы I. На месте смоделированного повреждения отмечалась «сухо-

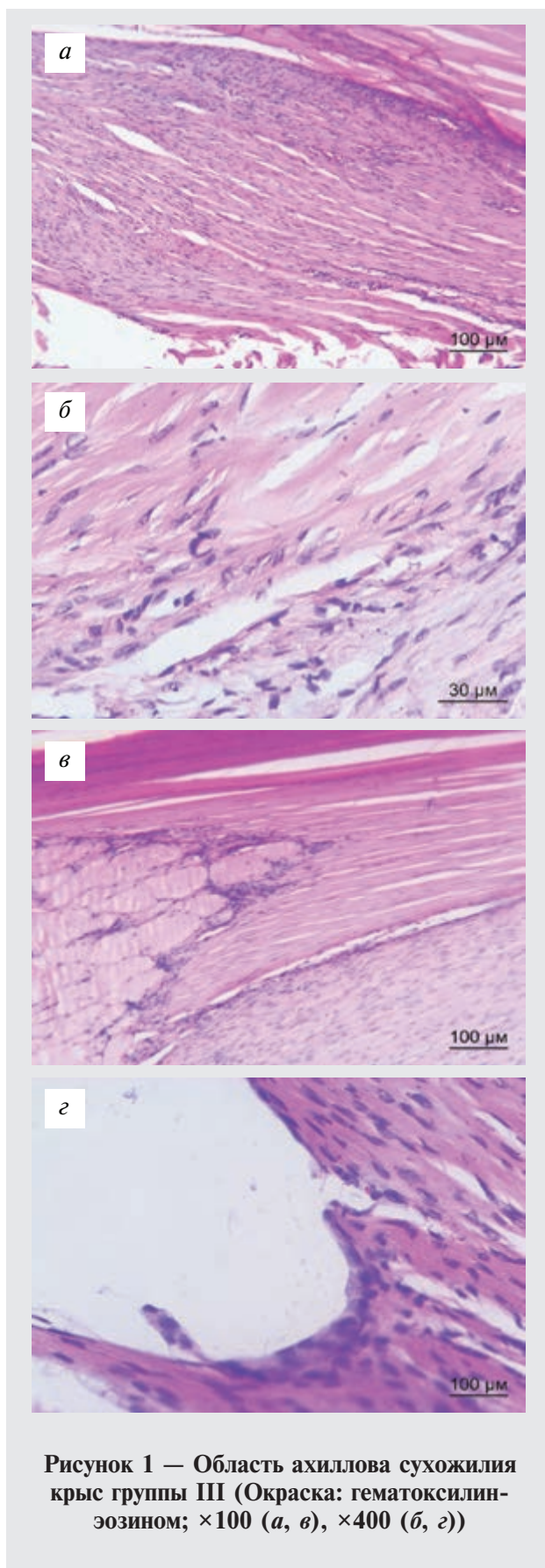


Рисунок 1 — Область ахиллова сухожилия крыс группы III (Окраска: гематоксилин-эозином;  $\times 100$  (а, в),  $\times 400$  (б, г))

жилиеподобная» ткань с незначительным рубцеванием с окружающими тканями вокруг зоны шва. Дифференцировка слоев в проксимальном и дистальном направлении не нарушена. Рубцового перерождения ахиллового сухожилия не выявлено. Диссекция производилась без затруднений.

При проведении гистологического исследования микропрепаратов были выявлены следующие особенности. Во всех группах эксперимента наблюдались репаративные процессы в травмированном сухожилии разной степени выраженности. Наиболее полное восстановление структуры, с упорядоченным расположением пучков коллагеновых волокон в группе с использованием нативной гиалуроновой кислоты, однако оно сопровождалось кластерными скоплениями клеток фибробластического дифферона, т. е. скоплением клеток незрелой сухожильной ткани к моменту окончания эксперимента. Кровеносные сосуды располагались в эндотендинии, плотность их была низкой. В участках сухожилия, расположенных дистальнее области травматического повреждения, паратенон преимущественно имел характерное строение.

В группе с применением фотоиндуцированной гиалуроновой кислоты выявилось существенное отличие от группы II в степени зрелости клеточных элементов. Теноциты с узким длинным ядром и вытянутой цитоплазмой, что характерно для зрелых клеток, при этом волокна располагались менее упорядочено. Также в III группе местами наблюдалось умеренное увеличение числа кровеносных сосудов в эндотендинии. В участках сухожилия, расположенных проксимально и дистально области травматического повреждения, паратенон имел характерное строение без спаянности с окружающими тканями (рисунок 1).

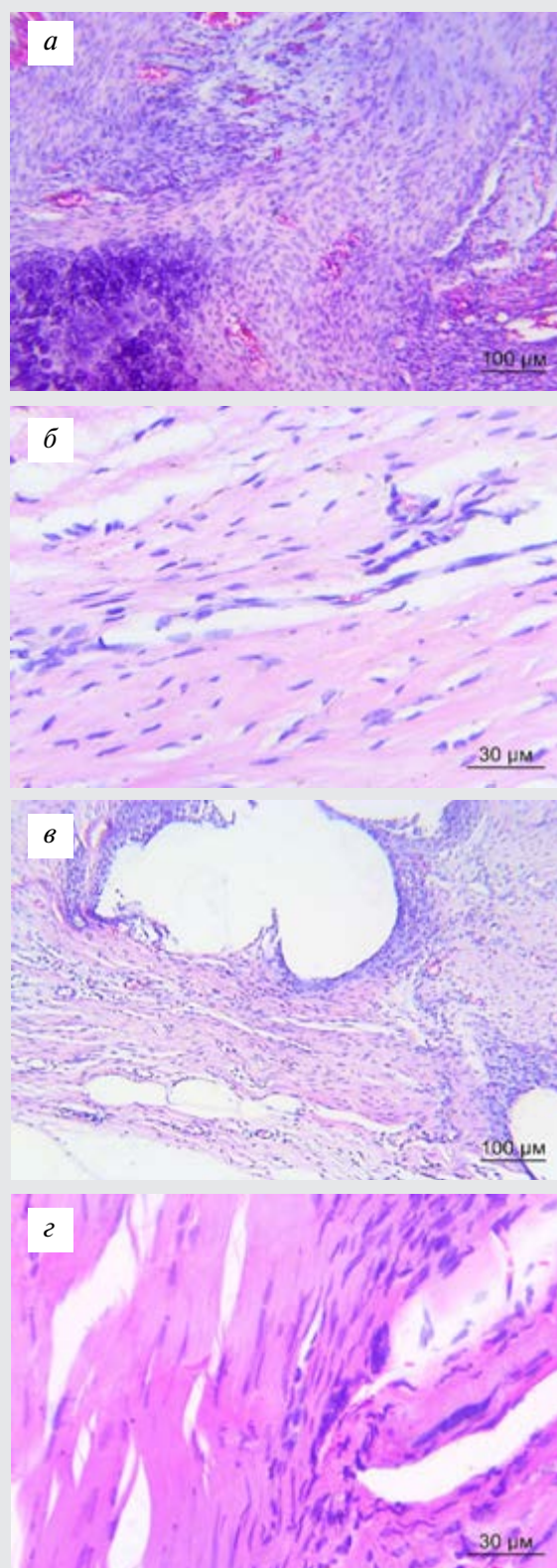
В контрольной группе отмечалось формирование сухожилиеподобной ткани в области повреждения, представленной плотными пучками коллагеновых волокон, расположенных разнонаправленно. Распределение теноцитов среди коллагеновых волокон нарушено: выявились участки с повышенной пролиферацией клеток и бесклеточные области. Кровеносные сосуды в регенерате распределялись неравномерно. Встречались участки с их значительным количеством. Выявить четкие границы паратенона и окружающих тканей на протяжении не представляется возможным из-за адгезии (рисунок 2).



Анализ скользящей функции пучков коллагеновых волокон в структуре сухожилия провели при оценке паратенона. Выявили, что разрастание соединительной ткани, нарушающей скольжение пучков коллагеновых волокон, наиболее выражено в контрольной серии эксперимента. Применение препаратов гиалуроновой кислоты в II и III группах в значительной степени способствовало разобщению раневых поверхностей сухожилия и окружающей ткани. Данный факт свидетельствует о полезных антиадгезивных свойствах препаратов гиалуроновой кислоты на соединительнотканые структуры сухожильного комплекса.

Таким образом, в группах II и III с использованием препаратов низкомолекулярной гиалуроновой кислоты, отмечалось выраженное снижение адгезии зоны сухожильного шва с окружающими тканями. Принципиальным различием гистологических препаратов II и III групп явилась степень зрелости сухожильной ткани, так во II группе преобладали клетки фибропластического дифферона, тогда как в III — более зрелые фибробласты, что косвенно указало на высокий регенераторный потенциал фотоиндуцированной гиалуроновой кислоты.

**Заключение.** Результаты проведенного эксперимента являются оптимистичными относительно установленных целей. Препараты низкомолекулярной гиалуроновой кислоты на модели повреждения ахиллового сухожилия крыс продемонстрировали выраженные антиадгезивные свойства со значительным снижением рубцово-спаечного процесса. Под влиянием фотоиндуцированной гиалуроновой кислоты отмечается образование зрелых теноцитов в более ранние сроки, что косвенно свидетельствует об активации пролиферативных процессов в зоне сухожильного шва. При использовании препаратов гиалуроновой кислоты к 6 неделе удалось добиться образования сухожилиеподобной ткани в зоне повреждения, которая разительно отличается от рубцовой ткани, сформировавшейся в контрольной группе. Таким образом, первичный эксперимент, поддерживаемый данными литературы, позволяет сделать вывод о необходимости дальнейшего изучения свойств препаратов низкомолекулярной гиалуроновой кислоты в хирургии сухожилий.



**Рисунок 2 — Область ахиллова сухожилия крыс контрольной группы (Окраска: гематоксилин-эозином; ×100 (а, в), ×400 (б, д))**

### Список цитированных источников

1. Пастух, В. В. Профилактика посттравматического спаечного процесса вокруг сухожилий : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.21 / В. В. Пастух; Харьковская МАПО ; науч. рук. А. Н. Хвисяк. — Харьков, 2015. — 153 с.
2. Кисель, Д. А. Хирургия кисти: повреждения сгибательного аппарата / Д. А. Кисель, И. О. Голубев // Избранные вопросы пластической хирургии. — 2004. — Т. 1. — № 11.
3. Strickland, J. W. Master techniques in orthopedic surgery: the hand / J. W. Strickland, T. J. Graham. — Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. — 2005. — P. 251–265.
4. Овсянникова, А. Д. Реабилитация и тактика ведения пациентов после хирургического восстановления сухожилий сгибателей пальцев кисти / А. Д. Овсянникова // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. — 2018. — Т. 2. — С. 62–73.
5. Andreutti, D. Effect of hyaluronic acid on migration, proliferation and alpha-smooth muscle actin expression by cultured rat and human fibroblasts / D. Andreutti, A. Geinoz // J. Submicrosc Cytol. Pathol. — 1999. — № 31(2). — P. 173–177.

## Potential of photo-induced hyaluronic acid in finger flexor tendon surgery

*Titova A. D., Volotovskiy A. I., Dovgalevich I. I., Liudchik A. V.*

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

So far, the optimal approach to the treatment of hand flexor tendon injuries remains open for hand surgeons. The complexity of the anatomical structure of the finger tendon apparatus with a high risk of adhesions often leads to unsatisfactory treatment results in the early postoperative period. The search for ways to improve flexor tendon regeneration aimed at reducing adhesion to the surrounding tissues is a highly topical issue in modern hand surgery.

**Keywords:** hyaluronic acid, parathenon, flexor tendons.

*Поступила 10.06.2022*

УДК 547.787:615.281.873

## ИССЛЕДОВАНИЕ *IN SILICO* ЗАВИСИМОСТИ СТРУКТУРА–АКТИВНОСТЬ ОКСАЗОЛИДИНОВ В ПОИСКЕ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Ляхвич Ф. Ф., Борова М. И., Ринейская О.Н.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Лекарственно-устойчивый туберкулез является актуальной проблемой для Республики Беларусь. В данной работе представлены результаты исследования *in silico* оксазолидинонов как новой группы потенциальных противотуберкулезных лекарственных средств. Получены были количественные характеристики, которые отражают аффинность Линезолида и его производных, а также Ривароксабана к протеину  $\beta$ -кетоацил[АСР]синтазе I. Установлено, что наименьшую энергию связывания показал S-изомер Ривароксабана (–8,47 ккал/моль). Была изучена взаимосвязь структура–активность для оксазолидинонов. Установлено, что амидная группа в оксазиновом кольце, а также фтор не влияют на связывание с рецептором. Тиофеновый фрагмент участвует в гидрофобных взаимодействиях с фенилаланином-239  $\beta$ -кетоацил[АСР]синтазы I. Полученные данные будут использоваться при дальнейшем поиске противотуберкулезных лекарственных средств.

**Ключевые слова:** докинг, зависимость структура–активность, Линезолид, оксазолидиноны, Ривароксабан.



**Введение.** В настоящее время Линезолид применяют для лечения инфекций, вызванных лекарственно-устойчивыми штаммами грамположительных бактерий, в том числе для терапии заболеваний, вызванных метициллин-резистентными золотистыми стафилококками, ванкомицин-резистентными энтерококками [1]. Также Всемирная организация здравоохранения предлагает схемы лечения, содержащие Линезолид, для терапии туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) [2]. Проблема устойчивого к терапии туберкулеза для Беларуси стоит довольно остро. Доля МЛУ-ТБ среди всех диагностированных случаев туберкулеза составляет около 35 % [3].

Описанный ранее механизм действия Линезолида заключается в ингибировании синтеза бактериальных белков [4]. Однако в контексте противотуберкулезной активности Линезолид может обладать и другим механизмом действия. Микобактерии содержат в составе своей клеточной стенки миколовые кислоты, которые обуславливают кислотоустойчивость бактерий и, следовательно, являются специфическими молекулярными мишенями для действия лекарственных средств. В нашей работе мы поставили задачу с помощью исследования *in silico* проверить возможность реализации альтернативного механизма действия Линезолида и его производных за счет ингибирования β-кетоацил[АСР]синтазы I — фермента, участвующего в синтезе миколовых кислот. Для этого был проведен молекулярный докинг с соответствующим модельным протеином, который мы ранее использовали при изучении аффинности дигидрокси замещенных изонипекотинамидов [5] и альдонамидов [6].

Близким по структуре к Линезолиду ЛС являются антикоагулянт Ривароксабан. Проведенные испытания Ривароксабана компанией Байер не показали антибактериальной активности в отношении грамположительных бактерий [7]. Но микобактерии являются специфическими грамположительными бактериями, поэтому целью данного исследования явилась сравнительная оценка аффинности Ривароксабана, Линезолида и его производных к β-кетоацил[АСР]синтазе I с помощью молекулярного докинга.

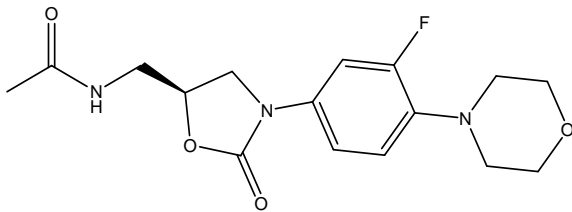
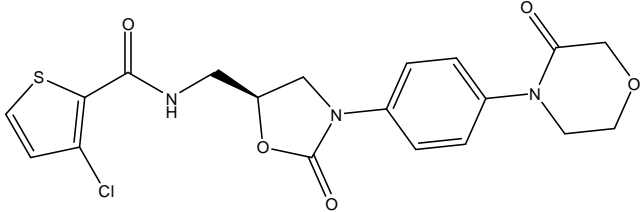
**Материалы и методы.** Дизайн структур выполнен с помощью программного пакета ChemOffice. Информация о трехмерной структуре протеина (код белка 2WGF, цепь A) получена с сайта Protein Data Bank.

Молекулярный докинг *in silico* осуществлен с помощью электронного ресурса Dockingserver [8] с использованием полуэмпирического метода расчетов квантовой химии PM6, метода геометрической оптимизации MMFF94 при значении pH 7,0, количество пробегов — 20. В настоящей работе энергией связывания считали наименьшее значение изменения свободной энергии Гиббса при переходе комплекса лиганд-протеин из несвязанного в связанное состояние [9].

**Результаты и их обсуждение.** Был проведен молекулярный докинг Линезолида и его производных и Ривароксабана с β-кетоацил[АСР]синтазой I.

Более низкая энергия связывания и константа ингибирования для Ривароксабана (таблица 1) свидетельствуют о его более высокой аффинности к анализируемому белку.

Таблица 1 — Результаты молекулярного докинга Линезолида (I) и Ривароксабана(II)

№	Лиганд	Свободная энергия связывания	Константа ингибирования
I		-6,70 ккал/моль	12,20 μM
II		-8,47 ккал/моль	614,18 nM

Для определения причины значительного отличия в энергии связывания был проведен сравнительный анализ структур Линезолида и Ривароксабана. Так, в отличие от Линезолида молекула Ривароксабана содержит амидную группу в оксазиновом фрагменте, гидрофобный тиофеновый фрагмент, а также атом хлора, который потенциально может образовывать

галогеновую связь. В то же время Линезолид содержит атом фтора в бензольном кольце. Как Линезолид, так и Ривароксабан представлены S-изомером. На основании данных отличий были построены лиганды на основе структур Линезолида и Ривароксабана для установления зависимости структура- активность *in silico* (таблицы 2, 3).

Таблица 2 — Результаты молекулярного докинга Линезолида (I) и его производных

№	Лиганд	Свободная энергия связывания	Константа ингибирования
I		-6,70 ккал/моль	12,20 $\mu\text{M}$
III		-6,52 ккал/моль	16,51 $\mu\text{M}$
IV		-6,60 ккал/моль	14,43 $\mu\text{M}$

Таблица 3 — Результаты докинга для Ривароксабана (II) и его R-изомера (V)

№	Лиганд	Свободная энергия связывания	Константа ингибирования
II		-8,47 ккал/моль	614,18 nM
V		-8,07 ккал/моль	1,21 $\mu\text{M}$

Энергии связывания лигандов I (Линезолид), III и IV оказались практически одинаковыми. Таким образом, амидная группа и фтор существенным образом не влияют на связывание с протеином.

Можно предположить, что ключевую роль в повышении аффинности лиганда к протеину играет введение в молекулу Ривароксабана гидрофобного тиофенового фрагмента.

Лидером среди всех изученных лигандов оказался Ривароксабан, представленный S-изомером. Далее было изучено влияние конфигурации стереогенного центра Ривароксабана на связывание с белком (см. таблицу 3)

Большую энергию связывания показывает лиганд II, представляющий собой S-изомер (-8,47 ккал/моль), который соответствует лекарственному средству Ривароксабан. Для дан-

ного лиганда был проанализирован характер взаимодействия с аминокислотными остатками активного центра белка.

В результате эксперимента установлено, что основной вклад в энергию связывания вносят гидрофобные взаимодействия (таблица 4). Суммарная энергия гидрофобных взаимодействий равна -3,38 ккал/моль, что составляет около 40 % от всей энергии взаимодействия лиганда с рецептором. При этом галогеновая связь хлора с гистидином 345 составляет только 1,69 % от общей энергии взаимодействия, а связь с глицином-200, по-видимому, энергетически невыгодна.

Значительный вклад в связывание с рецептором вносит тиофеновый фрагмент, который обеспечивает  $\pi$ -стекинг взаимодействия с аминокислотой фенилаланином-239 (рисунок 1).

Таблица 4 — Энергия связывания лиганда (ккал/моль) с аминокислотными фрагментами протеина

Галогеновая связь	Полярные взаимодействия	Гидрофобные взаимодействия	Другие взаимодействия
HIS345 (-0,1433) GLY200 (0,8165)	GLU199 (0,0811)	PRO206 (-0,9706) LEU205 (-0,8247) PHE239 (-0,7364) VAL123 (-0,4501) ALA119 (-0,4009)	GLU203 (-0,8968)

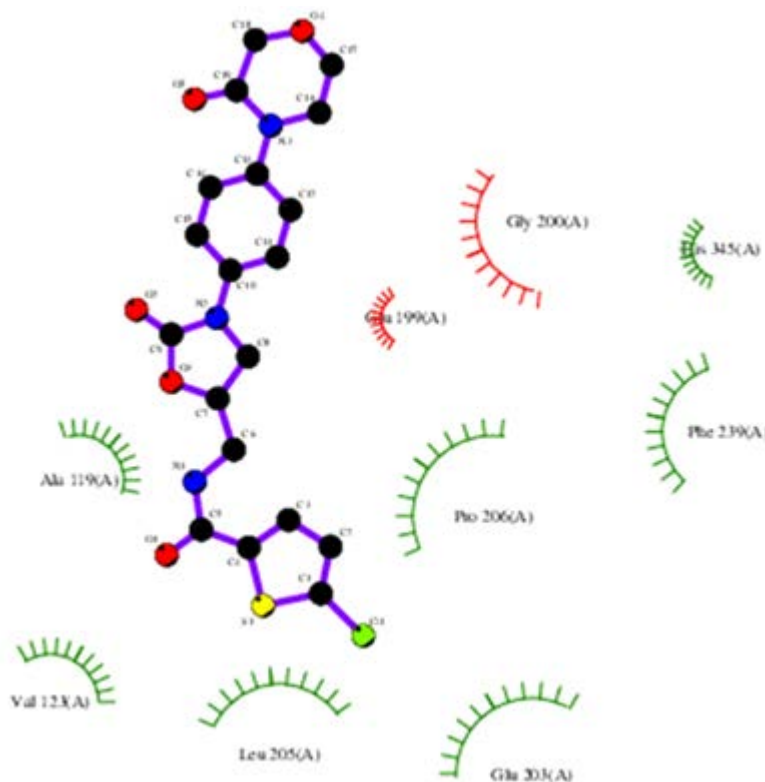


Рисунок 1 — Взаимодействие Ривароксабана с рецептором

Исходя их высоких предсказанных *in silico* количественных показателей аффинности Ривароксабана (и умеренных — для Линезолида) к протеину  $\beta$ -кето-ацил[АСР]синтазе I, можно предположить, что противотуберкулезное действие Линезолида может быть обусловлено альтернативным механизмом ингибирования синтеза миколовых кислот.

Полученные данные будут в дальнейшем использованы для определения фармакофора и для последующего поиска противотуберкулезных средств *in vitro*.

**Заключение.** Установлено, что в эксперименте *in silico* Ривароксабан показывает высокую аффинность к белку-рецептору  $\beta$ -кетоацил[АСР]синтазе I; при этом он связывается с протеином значительно эффективнее

по сравнению с Линезолидом. Амидная группа в оксазиновом фрагменте, а также фтор в бензольном кольце не влияют на энергию связывания с рецептором. Наибольший вклад в энергию связывания Ривароксабана с протеином вносят гидрофобные взаимодействия, в том числе за счет тиофенового фрагмента.

Результаты исследования *in silico* показывают перспективность изучения производных оксазолидинонов, в том числе субстанций, которые используются в медицине при поиске новых противотуберкулезных лекарственных средств. Полученные результаты предполагают проведение дальнейших исследований для изучения биологической активности производных оксазолидинонов *in vitro*.

### Список цитированных источников

1. Hashemian, S. M. R. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care / S. M. R. Hashemian, T. Farhadi, M. Ganjparvar // Drug. Des. Devel. Ther. — 2018. — № 12. — P. 1759–1767.
2. Treatment of tuberculosis: Guidelines for national programmes [Electronic resource] / World Health Organization. — Mode of access: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67890>. — Date of access: 01.06.2022.
3. Global tuberculosis report 2021 [Electronic resource] / World Health Organization. — Mode of access: [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/). — Date of access: 01.06.2022.
4. Livermore, D. M. Linezolid *in vitro*: mechanism and antibacterial spectrum / M. D. Livermore // J. Antimicrob Chemother. — 2003. — № 51. — P. 9–16.
5. Лахвич, Ф. Ф. Рациональный дизайн модели ациклических аналогов гидроксиизонипекотиновых кислот / Ф. Ф. Лахвич, П. Ю. Зушик, А. Ф. Лахвич // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики : сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Республики Беларусь, Белорус. гос. мед. ун-т. — Минск : БГМУ, 2019. — Вып. 9. — С. 389–399.
6. Лахвич, Ф. Ф. Исследование средства альдонамидов к рецепторам KASA в контексте разработки противотуберкулезных препаратов / Ф. Ф. Лахвич, М.И. Борова // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики : сб. науч. тр. / М-во здравоохранения Республики Беларусь, Белорус. гос. мед. ун-т. — Минск : БГМУ, 2021. — Вып. 11. — С. 518–523.
7. Assessment report Xarelto Rivaroxaban [Electronic resource] / European Medicines Agency. — Mode of access: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/xarelto-h-c-944-x-0010-epar-assessment-report-extension\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/xarelto-h-c-944-x-0010-epar-assessment-report-extension_en.pdf). — Date of access: 01.06.2022.
8. DockingServer [Electronic resource] / DockingServer, 2006. — Mode of access: <https://www.dockingserver.com/web>. — Date of access: 01.06.2022.
9. Горемыкин, К. В. Исследование взаимодействия лигандов с аденозиновыми рецепторами типа  $a_{2b}$  *in silico* / К. В. Горемыкин, И. В. Ивлев, Ю. А. Королева // Вестник Новосибирского гос. ун-та. Сер. Биология, клинич. медицина. — 2010. — Т. 8, № 1. — С. 11–16.

## In silico SAR studies of oxazolidinones as potential anti-tuberculosis drugs

Lakhvich T. T., Borava M. I., Ryneiskaya O. N.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Drug-resistant tuberculosis poses a major risk to global health security and in particular for Belarus. In this work, we have studied *in silico* anti-tuberculosis activity of oxazolidinones as a new group of potential drugs. The assay included the evaluation of SAR for Linezolid and its derivatives, as well as for Rivaroxaban with the receptor protein Ketoacyl synthase A. The highest binding energy was found for



S-isomer of Rivaroxaban, ( $-8.47$  kcal/mol). It has been found that the amide group in the oxazine ring, as well as fluorine, do not affect the binding to the receptor. The thiophene fragment is involved in hydrophobic interactions with phenylalanine-239 of Ketoacyl synthase I. The data obtained will be useful for new search for anti-tuberculosis drugs.

**Keywords:** docking, Linezolid, oxazolidinones, Rivaroxaban, structure-activity relationship.

Поступила 05.09.2022

УДК 615.015.1:599.323.4.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ НОВЫХ АНАЛОГОВ АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНА

Саванец О. Н.<sup>1</sup>, Кравченко Е. В.<sup>1</sup>, Ольгомец Л. М.<sup>1</sup>, Пилюцкая А. А.<sup>1</sup>,  
Бородина К. В.<sup>1</sup>, Пустюльга Е. С.<sup>1</sup>, Голубович В. П.<sup>1</sup>, Бизунок Н. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»,  
г. Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup> Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** С целью поиска новых аналогов аргинин-вазопрессина (АВП), обладающих хроно-тропными свойствами, изучен ряд пептидных аналогов С-концевого фрагмента АВП: N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub>, N-Ас-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>. В условиях неизбежного стресса у особой контрольной группы выявлен десинхроноз, проявлениями которого служило отсутствие: а) статистически значимого повышения активности в темное время суток; б) снижения активности во второй половине ночного периода; в) повышения активности в утренний период; сниженная амплитуда циркадного ритма двигательной активности. Пептид N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (1,0 мкг/кг), в меньшей степени — 0,1 и 10,0 мкг/кг, а также N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> (1,0 мкг/кг), но не N-Ас-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> существенно корректировали указанные изменения. Приближение значений А к таковым у интактного контроля отмечено на фоне введения N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (10,0 мкг/кг) и N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> (1,0 мкг/кг).

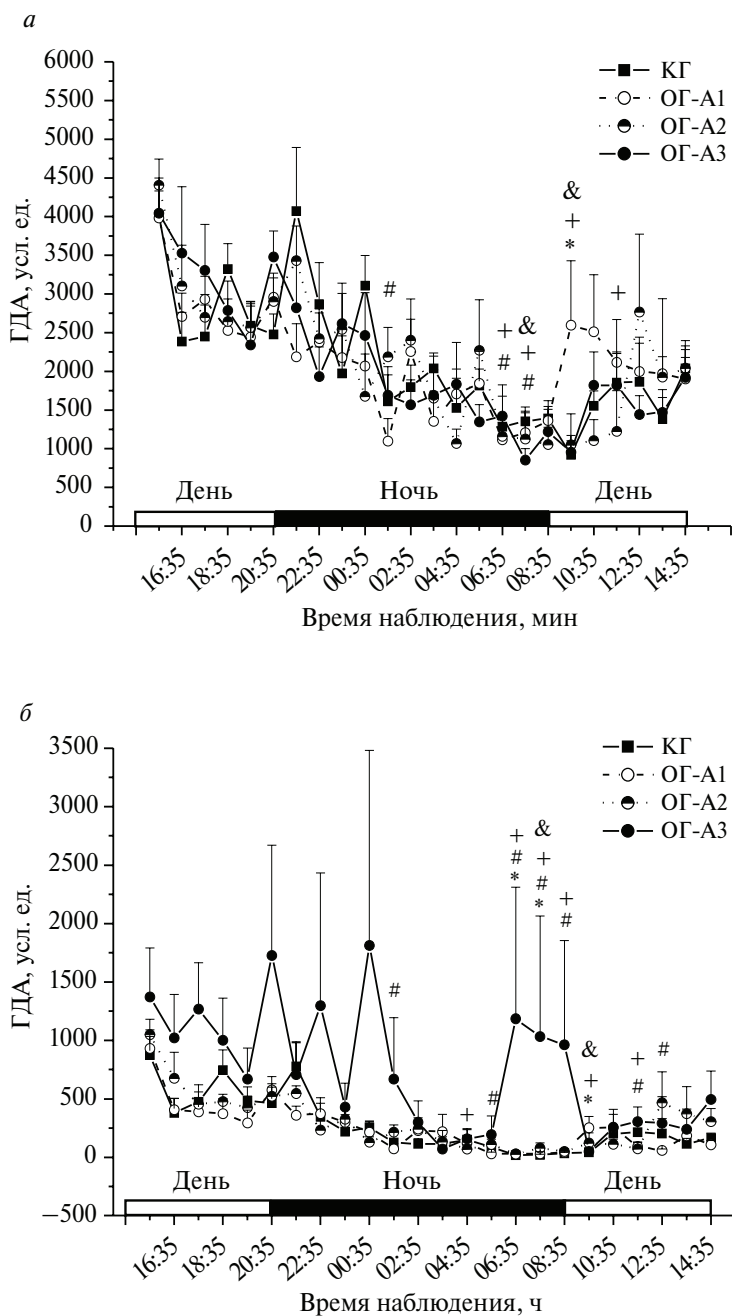
**Ключевые слова:** тетрапептиды, аргинин-вазопрессин, циркадные ритмы, интраназальное введение, мыши.

**Введение.** Поиск новых биологически активных соединений среди производных аргинин-вазопрессина (АВП) в качестве перспективных фармакологических веществ является актуальным ввиду наличия нейротрансмиттерной, модуляторной и регуляторной активности у нейрогормона-«прототипа» в отношении центральной нервной системы. Вазопрессин модулирует реакцию организма на стресс [1], а также участвует в регуляции циркадных ритмов [2]. Сказанное выше хорошо объясняет регуляторные эффекты вазопрессина в отношении стресс-индуцированного десинхроноза. Перспективным и актуальным является поиск активного соединения с хронофармакологическим действием среди тетрапептидов — аналогов С-концевого

фрагмента АВП. С учетом изложенного целесообразно изучение возможного регуляторного действия аналогов вазопрессина в отношении десинхроноза, вызванного помещением животного в ситуацию поведенческого «отчаяния».

**Цель работы** — изучение влияния С-концевых фрагментов АВП N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub>, N-Ас-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> на циркадные ритмы двигательной активности мышей ICR, подвергшихся неизбежному стрессу.

**Материалы и методы.** Исследования проводили с использованием 80 половозрелых мышей-самцов ICR с массой тела 20–30 г, полученных в секторе биоиспытаний Института биоорганической химии НАН Беларуси.



**Рисунок 1 —** Динамика ГДА (а) и ВДА (б) мышей ICR, подвергшихся неизбежному стрессу (КГ — контроль, ОГ-A1 — N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (0,1 мкг/кг), ОГ-A2 — N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (1,0 мкг/кг), ОГ-A3 — N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (10,0 мкг/кг); различия статистически значимы в сравнении со 2 часом: \* — для КГ; # — для ОГ-A1; + — для ОГ-A2; & — для ОГ-A3; *p* < 0,05, критерий Фридмана с последующей обработкой данных по критерию Даннета)

Животные подвергались неизбежному стрессу в условиях «принудительного плавания» (ПП) [3]. Мышей-самцов помещали на 6 мин в цилиндрический бассейн (диаметр сосуда — 10 см, высота — 30 см), наполненный водой. Уровень воды в бассейне составлял 20,5 см, температура — 24–25 °С [3].

По окончании процедуры ПП животных обсушивали, обогревали на протяжении 20 мин и поодиночке помещали в боксы актометра «Универсал 22–32» (Беларусь).

Особям контрольной группы КГ (*n* = 8) за 30 мин до начала сеанса ПП вводили растворитель (дистиллированная вода) интраназально, а мышам основных групп — тетрапептиды с использованием того же способа введения. Группы были сформированы следующим образом: мышам групп ОГ-A1, ОГ-A2 и ОГ-A3 применяли N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> в дозах 0,1; 1,0 и 10,0 мкг/кг соответственно; ОГ-B1, ОГ-B2 и ОГ-B3 — N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> в дозах 0,1; 1,0 и 10,0 мкг/кг соответственно; ОГ-C — N-Ас-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> в дозе 1,0 мкг/кг. Животные, не подвергавшиеся «инъекционному» стрессу и ПП, вошли в группу КГ-0 (*n* = 16). Исследования осуществлялись в зимний период года (январь-февраль) в режиме день/ночь: день — с 14:35 до 20:30 и с 08:30 до 14:35; ночь — с 20:30 до 08:30; освещение боксов проводили лампами подсвета Я-100 Л-12 В ( $\lambda$  = 670–680 нм; уровень освещенности — 5–10 лк). Эксперименты выполнены в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными.

Регистрировали уровень горизонтальной (ГДА) и вертикальной (ВДА) двигательной активности грызунов; полученные данные выражали в усл. ед., соответствующих числу пересечений инфракрасных лучей в горизонтальной и вертикальной плоскостях. Посредством

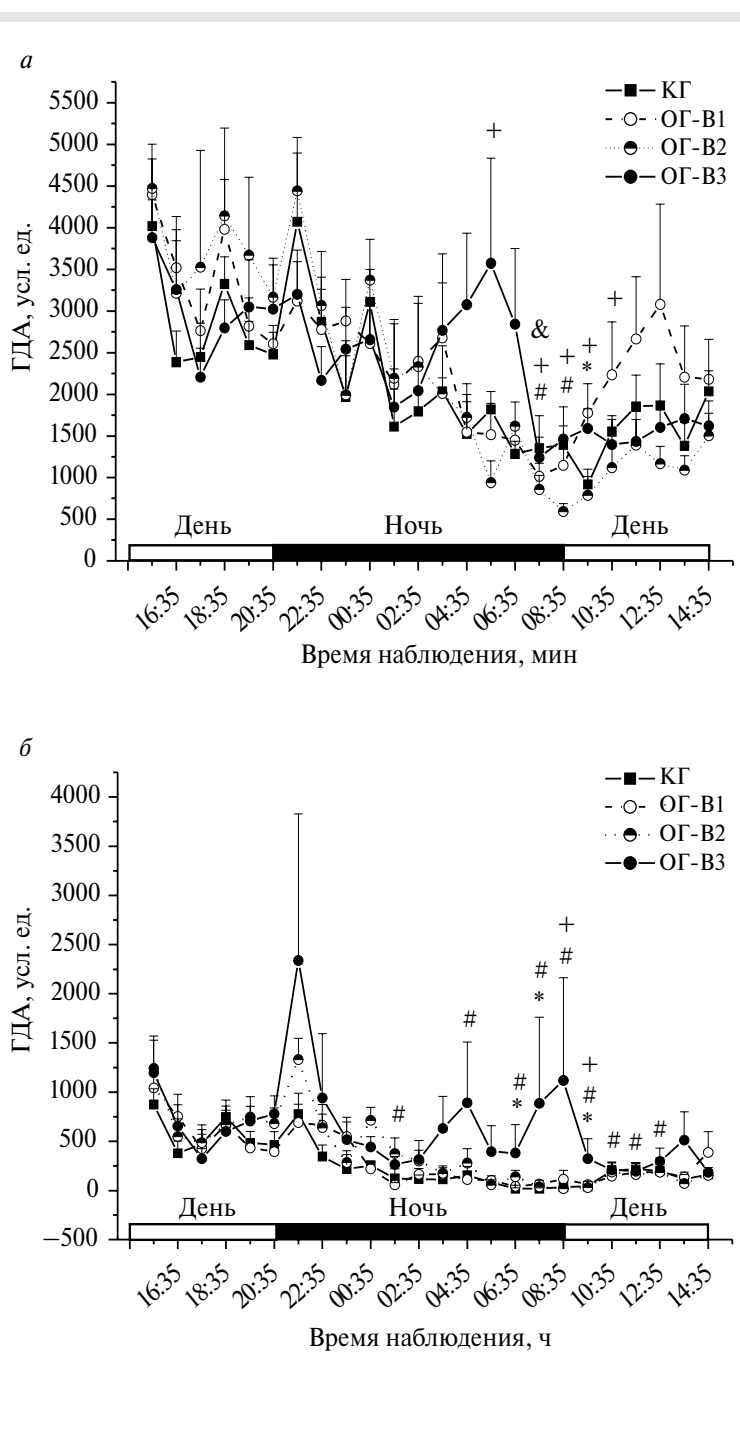
компьютерной программы методом косинор-анализа определяли амплитуду ритма (A). При обработке результатов методом косинор-анализа в расчеты не включали данные за первый час, поскольку в указанный период изменения ГДА и ВДА связаны преимущественно не с колебательным процессом, а с реакцией на «новизну» обстановки. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Cosinor 2.5, CorelDRAW, Biostat 4.03, Origin 6.1.

**Результаты и их обсуждение.**

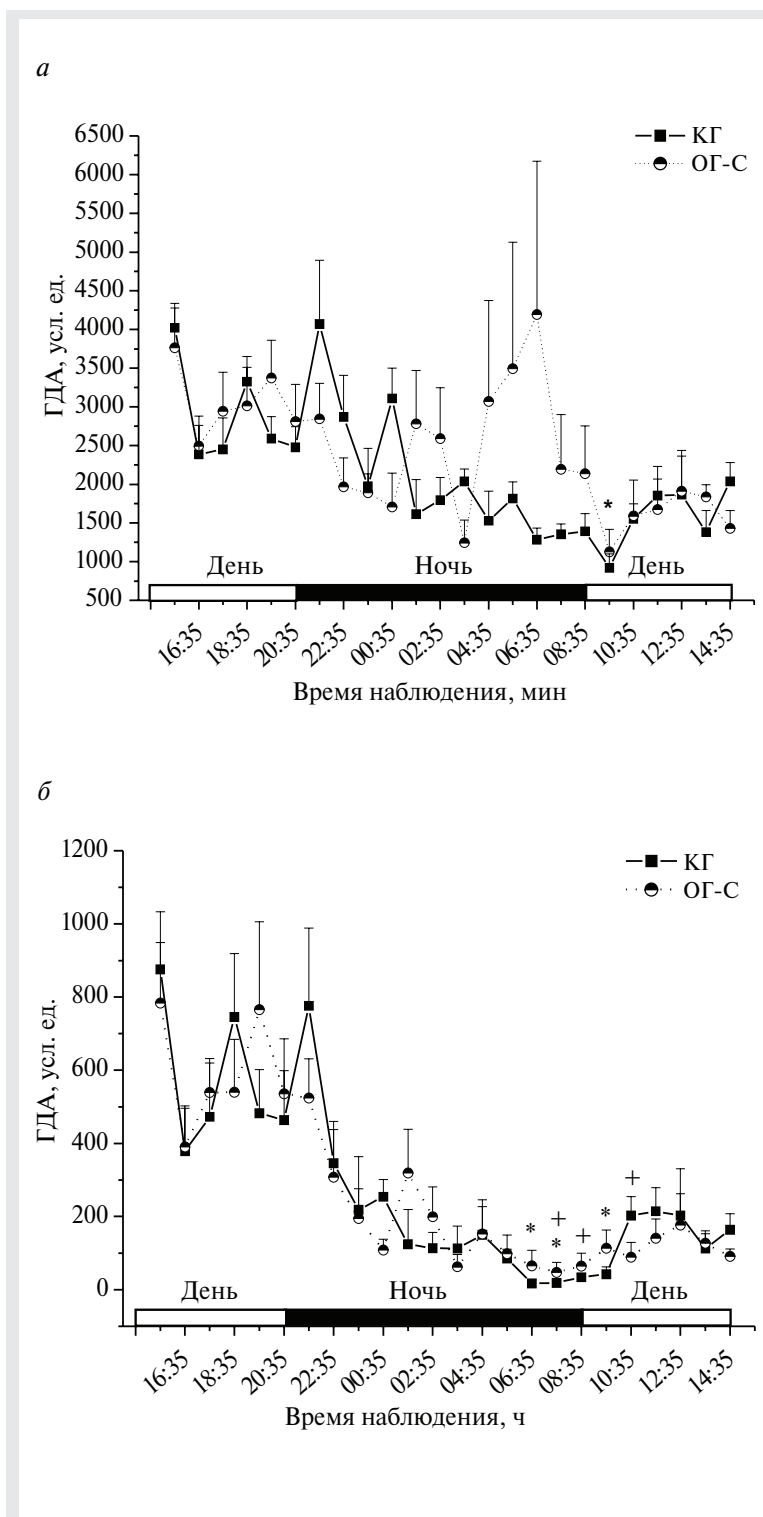
Процедура ПП сопровождалась реорганизацией хронограмм двигательной активности лабораторных грызунов, носившей характер десинхроноза. У особей КГ наступление «темного» периода не сопровождалось формированием статистически достоверного максимума подвижности ГДА и ВДА, в ночные часы имели место несколько слабо сформированных пиков активности. Применение тетрапептидов не оказывало существенного влияния на формирование максимумов подвижности на рубеже «светлого» и «темного» периодов актометрии (рисунки 1, 2, 3).

Снижение активности ГДА и ВДА во второй половине ночного периода, являющееся нормой [4], отсутствовало в КГ. При применении N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (рисунок 1, а) и N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> (рисунок 2, а) во всех изученных дозах имело место статистически достоверное уменьшение уровня ГДА в сравнении с соответствующим показателем во 2-й час актометрии. На уровень ВДА в указанный промежуток времени ни одно из вышеуказанных соединений не оказывало существенного влияния (рисунок 1, а и рисунок 2, б).

Повышение активности в утренние часы, связанное с привычным кормлением и сменой подстилки, характерно для лабораторных грызунов [4]. Моторика животных КГ характеризовалась



**Рисунок 2 —** Динамика ГДА (а) и ВДА (б) мышей ICR, подвергшихся неизбежному стрессу (КГ — контроль, ОГ-B1 — N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> (0,1 мкг/кг), ОГ-B2 — N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> (1,0 мкг/кг), ОГ-B3 — N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> (10,0 мкг/кг); различия статистически значимы в сравнении со 2 часом: \* — для КГ; # — для ОГ-B1; + — для ОГ-B2; & — для ОГ-B3; *p* < 0,05, критерий Фридмана с последующей обработкой данных по критерию Даннета)



**Рисунок 3 — Динамика ГДА (а) и ВДА (б) мышей ICR, подвергшихся неизбежному стрессу (КГ — контроль, ОГ-С — N-Ас-Тур-Про-Арг-Гли-НН<sub>2</sub> (1,0 мкг/кг); различия статистически значимы в сравнении со 2 часом: \* — для КГ; + — для ОГ-С;  $p < 0,05$ , критерий Фридмана с последующей обработкой данных по критерию Даннета)**

достоверным снижением как локомоторной (ГДА), так и исследовательско-ориентировочной (ВДА) активности, что явилось одним из четких маркеров индуцированного десинхроноза.

Пептид N-Ас-Тур-Про-Арг-Гли-НН<sub>2</sub> в дозе 0,1, но не 1,0 и 10,0 мкг/кг, способствовал повышению уровня ГДА и ВДА в утренние часы (см. рисунок 1, а, б). Соединение N-Ас-DSer-Про-DArg-Гли-НН<sub>2</sub> в дозах 0,1 и 10,0, но не 1,0 мкг/кг вызывало увеличение локомоторной активности в утренние часы, предположительно повышало уровень ВДА в дозе 10,0 (см. рисунок 2, а, б). Соединение N-Ас-Тур-Про-Арг-Гли-НН<sub>2</sub> в дозе 1,0 способствовало увеличению исследовательско-ориентировочной активности в начале светлого периода (рисунок 3, б).

Известно, что стрессовое воздействие (например, «инъекционный» стресс) способствует снижению амплитуды ритма двигательной активности лабораторных грызунов [4]. В настоящем исследовании следствием «принудительного плавания» явилось снижение амплитуды 24-часового циркадного ритма в контрольной группе КГ в сравнении с интактными животными: ГДА — на 54,8 %, ВДА — на 189,1 % (таблица). Применение N-Ас-DSer-Про-DArg-Гли-НН<sub>2</sub> в дозе 1,0 мкг/кг сопровождалось увеличением амплитуды циркадного ритма ГДА в сравнении с амплитудой КГ (на 73,1 %) и ВДА (на 47,4 %); а тетрапептид N-Ас-Тур-Про-Арг-Гли-НН<sub>2</sub> в дозе 10,0 мкг/кг способствовал повышению амплитуды ритма ВДА (38,1 %) относительно уровня А в контрольной группе (таблица). Таким образом, названные выше пептиды в указанных дозах оказывали корректирующее воздействие на циркадные ритмы мышей ICR, приближая к норме значения амплитуды ритма и препятствуя стресс-индуцированным изменениям «рисунка» хронограммы.



Таблица — Влияние однократного введения N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> и N-Ас-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> на амплитуду циркадных ритмов мышей ICR

Параметр	Группа (число животных)	A, %	p
ГДА	КГ (N = 8)	100	p < 0,05
	КГ-0 (N = 16)	154,8	p < 0,05
	ОГ-А1 (N = 8)	66,2	p < 0,05
	ОГ-А2(N = 8)	102,2	p < 0,05
	ОГ-А3 (N = 8)	107,9	p < 0,05
	ОГ-В1 (N = 8)	99,3	p < 0,05
	ОГ-В2 (N = 8)	173,1	p < 0,05
	ОГ-В3 (N = 8)	71,2	p < 0,05
	ОГ-С (N = 8)	39,9	p < 0,05
ВДА	КГ (N = 8)	100	p < 0,05
	КГ-0 (N = 16)	289,1	p < 0,05
	ОГ-А1 (N = 8)	65,5	p < 0,05
	ОГ-А2(N = 8)	93,1	p < 0,05
	ОГ-А3 (N = 8)	138,1	p < 0,05
	ОГ-В1 (N = 8)	109,9	p < 0,05
	ОГ-В2 (N = 8)	147,4	p < 0,05
	ОГ-В3 (N = 8)	90,3	p < 0,05
	ОГ-С (N = 8)	94,6	p < 0,05

*Примечания* — 1. ОГ-А1 — N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (0,1 мкг/кг), ОГ-А2 — N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (1,0 мкг/кг), ОГ-А3 — N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (10,0 мкг/кг), ОГ-В1 — N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> (0,1 мкг/кг), ОГ-В2 — N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> (1,0 мкг/кг), ОГ-В3 — N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> (10,0 мкг/кг), ОГ-С — N-Ас-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (1,0 мкг/кг).  
2. А, % — изменение А по отношению к значениям амплитуды в КГ.

**Заключение.** В результате изучения влияния аналогов С-концевых фрагментов АВП N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub>, N-Ас-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> на циркадные ритмы двигательной активности мышей ICR, подвергшихся неизбежному стрессу, выявлено корригирующее действие всех указанных соединений. Применение N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> и N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> способствовало снижению локомоторной активности во второй половине ночного периода в дозах 0,1, 1,0 и 10,0 мкг/кг. Повышение уровня ГДА в утренние часы наблюдалось на фоне введения N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> в дозе 0,1 мкг/кг, N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> в дозах 0,1 и 10 мкг/кг. Применение N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> в дозе

0,1 мкг/кг, N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> (10,0 мкг/кг) и N-Ас-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> в дозе 1,0 мкг/кг способствовало повышению ВДА в первой половине утреннего периода.

Тетрапептиды увеличивали амплитуду циркадного ритма ГДА (N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> в дозе 1,0 мкг/кг) и ВДА (N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> в дозе 10,0 мкг/кг, N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> — 1,0 мкг/кг), приближая к норме значения указанного параметра, характеризующего суточный периодизм.

Перспективно дальнейшее изучение синтетических аналогов фрагмента аргинин-вазопрессина N-Ас-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, N-Ас-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> и N-Ас-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> в качестве хронофармакологических средств.

### Список цитированных источников

1. Vasopressin but not oxytocin responds to birth stress in infants / S. F. Malfertheiner [et al.] // Front. Neurosci. — 2021. — Vol. 27. — P. 1–4.
2. Vasopressin facilitates GABAergic transmission in rat hippocampus via activation of V (1A) receptors / G. Ramanathan [et al.] // Neuropharmacology. — 2012. — Vol. 63, № 7. — P. 1218–1226.
3. Neumann, I. D. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors / I. D. Neumann, R. Landgraf // Trends Neurosci. — 2012. — Vol. 35, № 11. — P. 649–659.



4. Арушанян, Э. Б. Тофизопам и мелатонин ослабляют перестройку ритма суточной подвижности крыс при инъекционном стрессе / Э. Б. Арушанян, А.В. Попов // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2006. — Т. 69, № 2. — С. 14–17.

## Chronotropic properties of new analogues of arginine-vasopressin

*Savanets O. N.<sup>1</sup>, Kravchenko E. V.<sup>1</sup>, Olgomets L. M.<sup>1</sup>, Pilyutskaya A. A.<sup>1</sup>,  
Borodina K. V.<sup>1</sup>, Pustyluga E. S.,<sup>1</sup> Golubovich V. P.<sup>1</sup>, Bizunok N. A.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> State scientific Institution "Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus", Minsk, Republic of Belarus;

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

In order to search for new analogues of arginine vasopressin (AVP) with chronotropic properties, several of peptide analogues of the C-terminal fragment of AVP were studied: N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>, N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub>, N-Ac-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>. Under unavoidable stress, in mice of the control group were found to have desynchronosis, the manifestations of which were the absence of: a) a statistically significant increase in activity in the dark; b) decrease in activity in the second half of the night period; c) increased activity in the morning; reduced amplitude of the circadian rhythm. Peptide N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (1.0 µg/kg, to a lesser extent - 0.1 and 10.0 µg/kg), as well as N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> (1.0 µg/kg) but not N-Ac-Tyr-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> corrected these changes. Approximation of A values to those of the intact control was observed with the introduction of N-Ac-Trp-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub> (10.0 µg/kg) and N-Ac-DSer-Pro-DArg-Gly-NH<sub>2</sub> (1.0 µg/kg).

**Keywords:** tetrapeptides, arginine-vasopressin, circadian rhythms, intranasal administration, mice.

Поступила 13.06.2022

УДК 615.9+[613.63:615.33]

## ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ АЗИТРОМИЦИН В ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*Зиновкина В. Ю., Богданов Р. В., Василькевич В. М., Земцова В. О.*

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** В условиях острого, подострого и субхронического токсикологического эксперимента, проведенного для регламентирования в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе фармацевтической субстанции азитромицин, установлены показатели токсичности и изучен характер биологического действия субстанции. По параметру средняя смертельная концентрация в воздухе азитромицин отнесен к 4 классу опасности. При однократном местном воздействии азитромицина на кожу и слизистые оболочки глаз лабораторных животных в остром эксперименте не выявлено раздражающего действия. Установлена слабая аллергенная активность субстанции. При повторном эпикутанном воздействии в подостром эксперименте азитромицин не вызывал раздражения кожных покровов, существенных сдвигов физиологических и морфофункциональных показателей состояния организма лабораторных животных. В субхроническом эксперименте выявлена слабая кумулятивная активность субстанции по смертельным эффектам и общетоксическое действие по изменению клинико-лабораторных показателей.

**Ключевые слова:** азитромицин, раздражающее действие, ингаляционное воздействие, кожно-резорбтивное действие, сенсибилизирующая способность, кумулятивная активность.

**Введение.** В Республике Беларусь динамично развивается фармацевтическая отрасль промышленности, позволяющая производить эффективные отечественные лекарственные средства. С этой целью реализуется Государственная научно-техническая программа «Разработка фармацевтических субстанций, лекарственных средств и нормативных правовых актов, обеспечивающих производство фармацевтической продукции» на 2021–2025 годы.

Фармацевтическое производство характеризуется опасностью загрязнения воздуха рабочей зоны химическими и/или биологическими веществами, что обуславливает необходимость создания рабочих мест с безопасными условиями труда работников данных предприятий и населения, проживающего на прилегающих территориях [1].

В соответствии с законодательством все новые химические вещества, внедряемые в хозяйственную деятельность, подлежат обязательной токсикологической оценке и гигиеническому регламентированию, что позволяет создать безопасные условия труда, разработать методы контроля и эффективную систему профилактических мероприятий для предотвращения развития производственно-обусловленных заболеваний [1–2].

Востребованным бактериостатическим полусинтетическим антибиотиком, применяемым для лечения широкого спектра бактериальных инфекций легкой и средней степени тяжести, является азитромицин, относящийся к подклассу азалидов. Механизм действия азитромицина аналогичен механизму действия других макролидов и проявляется ингибированием мРНК-зависимого синтеза белковой молекулы бактерии, чувствительной к действию антибиотика. Антибиотик обратимо связывается с 50S-субъединицей бактериальной рибосомы, блокируя процессы транспептидации и/или транслокации, что и приводит к подавлению биосинтеза белка, замедляя рост и размножение бактерий. Азитромицин обладает широким спектром действия, активен в отношении грамположительных, грамотрицательных и некоторых анаэробных бактерий, кроме устойчивых к эритромицину, некоторых других микроорганизмов. Высокий и быстрый клинический эффект, способность накапливаться и длительно сохранять высокие концентрации в очаге воспаления, минимальный риск развития осложнений, возможность сокращения кратности введения препарата и сроков лечения благодаря постантибиотическому эффекту вы-

годно отличают азитромицин среди других антибиотиков.

Для разработки и научного обоснования гигиенического норматива фармацевтической субстанции азитромицин в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе необходимо установить параметры токсикометрии субстанции и изучить биологическое действие данного вещества в токсикологическом эксперименте.

Дизайн токсикологического эксперимента включал: установление среднесмертельной концентрации, изучение местного действия на кожу и слизистые оболочки глаз, кожно-раздражающих и кожно-резорбтивных свойств, способности к кумуляции и аллергенной активности [3].

**Цель работы** — определение токсикометрических параметров в остром, подостром и субхроническом токсикологическом эксперименте и изучение характера биологического действия фармацевтической субстанции азитромицин для последующего регламентирования в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлась фармацевтическая субстанция азитромицин (производитель Alembic Limited, Индия). Образец субстанции для исследований предоставлен ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов».

Все исследования с использованием лабораторных животных выполнены с соблюдением этических норм обращения с животными, которые соответствуют правилам, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986). Проведение экспериментов с использованием лабораторных животных также одобрено Комиссией по биоэтике государственного предприятия «НПЦГ».

Токсикологические эксперименты по изучению раздражающего действия азитромицина на кожу и кожно-резорбтивного действия, кумулятивных свойств проводились на нелинейных белых крысах обоего пола, массой 180–220 г, раздражающее действие на слизистые оболочки глаз изучалось на кроликах, массой 2,8–3,2 кг, аллергенное действие — на белых беспородных мышах, массой 18–20 г. Экспериментальные группы животных формировали методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя.

теля (разность в массе тела животных составляла не более 10 %).

Изучение местного кожно-раздражающего, ирритативного, кожно-резорбтивного действия, кумулятивных свойств и сенсибилизирующей (аллергенной активности) способности в тесте опухания лапы мыши (ТОЛМ) проводили в соответствии с Инструкцией 1.1.11-12-35-2004 [4].

Оценку острой ингаляционной токсичности проводили методом однократного интраназального введения 30%-го спиртового раствора азитромицина в дозах 53 мг/м<sup>3</sup>, 265 мг/м<sup>3</sup>; 1325 мг/м<sup>3</sup> с помощью пипеточного дозатора. Контрольным животным в аналогичных условиях вводили растворитель.

При изучении кожно-резорбтивного действия оценку состояния лабораторных животных проводили по смертельным эффектам, симптомам интоксикации, раздражающему эффекту, клинико-лабораторным показателям. Наличие раздражения кожи хвостов проводили визуально, а также путем измерения объема хвостов на протяжении всего эксперимента [4].

Кумулятивные свойства азитромицина, которые характеризуют способность субстанции накапливаться в организме животных и вызывать неблагоприятное действие на уровне проявления смертельных эффектов или токсических эффектов, оцениваемых по функциональному состоянию органов и систем лабораторных животных, изучали методом Ю. С. Кагана и В. В. Станкевича (1964) в условиях субхронического 45-суточного (по 5 раз в неделю) введения в желудок белых крыс 30%-й спиртовой суспензии азитромицина в дозе, равной 1/10 (224,4 мг/кг) от средней смертельной дозы при введении в желудок, установленной ранее в остром опыте [5], контрольные животные получали в эквивалентном количестве растворитель [4].

В токсикологическом эксперименте по определению кожно-резорбтивного действия (подострый эксперимент) и кумулятивных свойств (субхронический эксперимент) азитромицина проводили систематическое наблюдение за состоянием, поведением животных, потреблением ими корма и воды, отмечали возможные проявления токсичности, учитывали количество и сроки возможной гибели животных. В ходе экспериментов и по их окончании регистрировали изменения массы тела, определяли показатели функционального состояния органов и систем организма лабораторных животных: сердечно-сосудистой системы (частота

сердечных сокращений, артериальное давление), нервной системы (суммационно-пороговый показатель — способность суммировать подпороговые импульсы), печени (морфофункциональные показатели, биохимические параметры крови и мочи) и почек (морфофункциональные показатели, диурез, биохимические параметры мочи и крови).

В субхроническом эксперименте для дополнительной оценки функционального состояния нервной системы изучали ориентировочно-исследовательскую и эмоционально-поведенческую активность лабораторных животных в тесте «открытое поле», который позволил изучить поведенческую реактивность по ряду показателей: горизонтальная активность, «норковый» рефлекс, количество вертикальных стоек, количество эпизодов груминга, количество эпизодов фризинга, количество актов дефекаций [6].

Для оценки биологического действия фармацевтической субстанции азитромицин по окончании подострого и субхронического экспериментов у животных опытных и контрольных групп исследовали ряд физиологических (прирост массы тела, изменение ректальной температуры), гематологических (показатели красной крови, лейкограмма, тромбоцитов), биохимических показателей сыворотки крови (глюкоза, мочевины, общий белок, альбумины, щелочная фосфатаза, аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, общий билирубин, холестерин, креатинин, лактатдегидрогеназа (ЛДГ), триглицериды, мочевины, кальций, железо), показатели, характеризующие функцию почек (диурез, pH мочи, удельный вес мочи, наличие белка, глюкозы, лейкоцитов, билирубина в моче), определяли морфофункциональные (интегральные) параметры: относительные коэффициенты массы внутренних органов.

Статистическая обработка количественных экспериментальных данных проводилась с использованием общепринятых методов статистики с помощью программного продукта Microsoft Excel и Statistica 13 (лицензия № AXA8111525627ARCN2ACD-M). Данные представлены в виде средней величины и ее ошибки ( $M \pm m$ ). Межгрупповые различия определяли по критерию  $t$ -Стьюдента при уровне статистической значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Изучение кожно-раздражающего и ирритативного действия азитромицина. В условиях острого токсикологического эксперимента при однократном нанесении 50%-й водной суспензии азитромици-



на на выстриженные участки кожи спины лабораторных животных не отмечалось клинических проявлений, признаков интоксикации и гибели животных на протяжении всего периода наблюдения. Не регистрировалось изменений состояния кожных покровов: гиперемии, сухости, отека при визуальном осмотре и при проведении инструментальных измерений толщины кожной складки на опытных и контрольных участках кожных покровов животных после воздействия исследуемой субстанции через 1 и 16 ч. Значимых различий опытных и контрольных участков кожи не выявлено. Индекс раздражающего действия фармацевтической субстанции составил 0 баллов ( $I_{cut} = 0$ ) и в соответствии с классификацией [4] азитромицин отнесен к 0 классу по выраженности кожно-раздражающих свойств при однократном местном воздействии.

После однократного внесения в нижний конъюнктивальный свод глаз кроликов 50 мкг 30%-й водной суспензии азитромицина не выявлено симптомов повреждения слизистой глаз: гиперемии конъюнктивы, отека век, выделения из глаз, непосредственно после внесения водной суспензии фармацевтической субстанции и на протяжении первых 24 ч после воздействия. Среднегрупповой суммарный балл выраженности ирритативного действия составил 0 баллов ( $I_{irr} = 0$ ), из чего следует, что фармацевтическая субстанция азитромицин не обладает ирритативным действием.

*Изучение острой ингаляционной токсичности фармацевтической субстанции азитромицин.* При ингаляционном воздействии фармацевтической субстанции азитромицин в остром эксперименте в концентрации 50 000 мг/м<sup>3</sup> не выявлено токсических эффектов, приводящих к гибели животных и к нарушению жизнедеятельности организма в целом, что позволило установить среднюю смертельную концентрацию в воздухе для азитромицина на уровне  $CL_{50} > 50\ 000$  мг/м<sup>3</sup> и отнести данную фармацевтическую субстанцию к 4 классу опасности по ГОСТ 12.1.007-76 [7].

*Изучение аллергенной активности.* Экспериментальное изучение сенсибилизирующей способности (аллергенной активности) было проведено в тесте опухания лапы мыши, который позволяет оценить наличие и выраженность развития клеточно-опосредованного типа аллергических реакций — гиперчувствительности замедленного типа. Исследованиями установлено, что аллергенная активность азитромицина в опытной группе сенсибилизированных животных по абсолютному показателю толщины кожной складки (мм) в 1,5 раза превышала аналогичный показатель в контроле, но различия были статистически не значимы ( $p > 0,05$ ). По интегральному показателю толщина кожной складки в баллах в опытной группе превысила значения контрольной группы в 1,75 раза, но различия были статистически не значимы ( $p > 0,05$ ) (таблица 1).

Таблица 1 — Показатели ТОЛМ у белых мышей, сенсибилизированных азитромицином

Показатель, единицы измерения	Статистическая величина	Группы сравнения	
		Контроль ( $n = 10$ )	Опыт ( $n = 10$ )
Абсолютный показатель толщины кожной складки, $10^{-2}$ мм	$M \pm m$	$0,1367 \pm 0,113$	$0,2096 \pm 0,066$
	$t$	—	$t = 0,082$
	$H$	0/10	0/10
Относительный показатель толщины кожной складки, баллы	$M \pm m$	$0,8 \pm 1,03$	$1,4 \pm 0,7$
	$t$	—	$t = 0,095$

*Примечание* —  $H$  — числитель — количество животных со сверхнормативными показателями, знаменатель — всего в опыте.

Таким образом, в модельных опытах на мышцах сенсибилизирующей активности фармацевтической субстанции азитромицин не установлено. Полученные результаты позволили отнести азитромицин согласно классификационным критериям к веществам со слабой сенсибилизирующей способностью (4-й класс аллергенной активности) [4].

*Изучение кожно-резорбтивного действия.* Постановка эксперимента по выявлению

кожно-резорбтивного действия фармацевтической субстанции азитромицин проведена с целью установить способность фармацевтической субстанции проникать через неповрежденную кожу и вызывать интоксикацию организма при повторном воздействии.

При изучении кожно-резорбтивных свойств азитромицина в условиях 20-кратных аппликаций на кожу хвостов белых крыс «пробирочным» методом не выявлено внешних

признаков раздражения кожи хвостов (эритемы и отека) при визуальном и инструментальном исследовании, клинических симптомов интоксикации и гибели животных. Статистически значимых различий объема хвостов в ходе эксперимента и по его завершении у животных опытной и контрольной групп не установлено.

При повторном эпикутанном воздействии азитромицина в эксперименте не установлено статистически значимых различий физиологических параметров, показателей функционального состояния сердечно-сосудистой, нервной системы, печени, почек лабораторных животных.

При анализе результатов биохимических показателей сыворотки крови, полученных к окончанию подострого эксперимента по изучению кожно-резорбтивного действия, определено (по сравнению с контрольными значениями) незначительное на 3,3 % снижение содержания общего белка ( $p < 0,05$ ), в 1,7 раза увеличение активности щелочной фосфатазы ( $p < 0,05$ ), снижение на 21 % содержания триглицеридов ( $p < 0,05$ ). В гемограмме выявлено уменьшение в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ) количества нейтрофилов по сравнению с контролем.

Статистически значимых отклонений при анализе других изучаемых биохимических показателей, являющихся маркерами функционального состояния сердечно-сосудистой системы, печени, почек, углеводного обмена, минерального обмена, обмена холестерина, билирубина, а также гематологических показателей, не выявлено.

Установленные отклонения биохимических показателей и содержания нейтрофилов не сопровождались значимыми изменениями других изученных в комплексе с биохимическими показателями, параметров, поэтому их можно отнести к функционально обратимым изменениям и/или вариантам физиологических колебаний.

*Изучение кумулятивной активности.* Изучение кумулятивных свойств фармацевтической субстанции азитромицин не приводило к гибели животных в опытной группе, а также не вызывало существенных клинических признаков интоксикации и других внешних объективных изменений состояния подопытных животных в течение всего эксперимента. Следовательно, рассчитать коэффициент кумуляции по смертельному эффекту не представилось возможным. В соответствии с классификацией Л. И. Медведя изучаемую фармацевтическую субстанцию по смертельным эффектам можно

отнести к веществам со слабой кумулятивной активностью ( $K_{cum} > 5,1$ ) [4].

Дозомонотонное воздействие азитромицина на уровне  $1/10$  от  $DL_{50}$  (224,4 мг/кг) не выявило статистически значимых различий физиологических показателей (прирост массы тела, изменение ректальной температуры), показателей функционального состояния нервной системы (суммационно-порогового показателя, показателей поведенческой реактивности: горизонтальная активность, «норковый» рефлекс, количество вертикальных стоек, количество эпизодов груминга, количество эпизодов фризинга, количество актов дефекаций), сердечно-сосудистой системы (частоты сердечных сокращений, артериального давления), почек (общий анализ мочи, биохимические показатели мочи и крови) у подопытных животных по сравнению с контрольными.

При анализе гематологических показателей периферической крови не обнаружено значимых изменений со стороны эритроцитарного, лейкоцитарного и тромбоцитарного ростков костного мозга и содержания форменных элементов крови у животных опытной группы по сравнению с контрольной группой.

При морфологическом изучении внутренних органов при внешнем осмотре не определялось макроскопических изменений сердца, печени, почек, легких, селезенки, и статистически значимых различий массы сердца, печени, почек, легких при инструментальном измерении, а также величин массовых коэффициентов этих органов по сравнению с контролем. Установлено снижение массы селезенки и относительного коэффициента массы селезенки (интегральный показатель) на 22,5–22,7 % соответственно ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем и тенденция к уменьшению относительного коэффициента массы печени, составившего 86,2 % ( $p > 0,05$ ) контрольного уровня.

При анализе клинико-лабораторных показателей, характеризующих функциональную составляющую, полученных по окончании субхронического эксперимента, было установлено, что основные изменения наблюдались среди биохимических показателей, которые позволили охарактеризовать выраженность и проявления токсических эффектов фармацевтической субстанции азитромицин.

Токсическое действие азитромицина у животных опытной группы проявлялось в некотором нарушении белкового обмена (установлено снижение на 4,9 % ( $p < 0,05$ ) содержания

общего белка и повышение на 9,5 % содержания альбуминов ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольным уровнем); липидного обмена (содержание холестерина в сыворотке крови превысило контроль на 14,0 % ( $p < 0,05$ )); в повреждении клеток печени по показателям активности АЛТ и щелочной фосфатазы, уровни которых превысили контроль в 1,4 ( $p < 0,05$ ) и в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно.

**Заключение.** Таким образом, изученная фармацевтическая субстанция азитромицин не оказывала раздражающего действия на кожные покровы и слизистые оболочки глаз у лабораторных животных в условиях острого эксперимента.

При интраназальном введении азитромицина в остром эксперименте установлена средняя смертельная концентрация в воздухе на уровне  $CL_{50} > 50\ 000$  мг/м<sup>3</sup>, что позволило отнести данную фармацевтическую субстанцию к 4 классу опасности по ГОСТ 12.1.007-76.

При изучении аллергенного (сенсibilизирующего) действия азитромицина в тесте опухания лапы мыши установлено, что азитромицин не вызывал у экспериментальных животных развития гиперчувствительности замедленного типа. Согласно классификационным критериям азитромицин отнесен к веществам со слабой сенсibilизирующей способностью (4-й класс аллергенной активности, слабые аллергены). Учитывая полученные

результаты аллергенного действия азитромицина в эксперименте, можно предположить, что данная фармацевтическая субстанция будет обладать малой потенциальной опасностью индукции аллергизирующего эффекта при контакте данного вещества с клетками-мишенями организма работающих в условиях производства.

При повторном эпикутанном воздействии фармацевтической субстанции азитромицин, проводимого с целью выявления кожно-резорбтивных свойств, не выявлено существенных сдвигов физиологических и морфофункциональных показателей состояния организма животных.

В условиях субхронического эксперимента при дозозмонотонном внутрижелудочном введении азитромицина в дозе 1/10  $DL_{50}$  установлена слабая степень кумулятивной активности изучаемой субстанции по смертельным эффектам ( $K_{cum}$  более 5,1). Изменение биохимических показателей в сыворотке крови (снижение содержания общего белка, повышение содержания альбуминов, холестеринемия, повышение активности АЛТ и щелочной фосфатазы) может свидетельствовать о наличии неблагоприятного общетоксического воздействия фармацевтической субстанции азитромицин с преимущественным преобладанием показателей, отражающих цитотоксическое действие на клетки печени.

### Список цитированных источников

1. Василькевич, В. М. Актуальные вопросы гигиенического регламентирования и создания безопасных условий труда на предприятиях по производству фармацевтических препаратов / В. М. Василькевич, Р. В. Богданов, Е. В. Дроздова // Медицина труда и промышленная экология. — 2020. — Т. 60, № 10. — С. 640–644.
2. Гигиенические критерии для обоснования необходимости разработки ПДК и ОБУВ (ОДУ) вредных веществ в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населенных мест, воде водных объектов : гигиенические нормативы 1.1.9-23-2002 / М-во здравоохран. Респ. Беларусь // Сб. гигиенич. нормативов по разделу коммунальной гигиены. — Минск, 2004. — С. 3–12.
3. Постановка исследований для обоснования предельно допустимых концентраций антибиотиков в воздухе рабочей зоны : методические указания / М-во здравоохранения СССР. — М., 1989. — 21 с.
4. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ : инструкция 1.1.11-12-35-2004 / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. — Минск, 2004. — 43 с.
5. Экспериментальная оценка острой токсичности фармацевтической субстанции азитромицин / В. Ю. Зиновкина [и др.] // Сб. материалов междунар. науч.-практ. конф. «Здоровье и окружающая среда», посвящ. 95-летию санитарно-эпидемиологической службы Республики Беларусь, Минск, 30 сент. — 1 окт. 2021 г. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Науч.-практ. центр гигиены ; редкол.: С. И. Сычик (гл. ред.) [и др.]. — Минск : Изд. центр БГУ, 2021. — С. 287–288.
6. Маркель, А. Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте «открытого поля» / А. Л. Маркель // Журн. высш. нерв. деятельности. — 1993. — № 1. — С. 150–156.
7. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности : ГОСТ 12.1.007-76. — Переизд. нояб. 2008 с Изм. 1, 2 (ИУС. 1981. № 12; ИУС. 1990. № 6). — Введ. 01.01.77. // Система стандартов безопасности труда. — Минск, 2008. — Ч. 1. — С. 183–187.



## The features of biological action of active ingredient azithromycin in a toxicological experiment

*Zinovkina V. Yu., Bogdanov R. V., Vasilkevich V. M., Ziamtsova V. O.*

*Republican unitary enterprise "Scientific practical centre of hygiene", Minsk, Republic of Belarus*

In conditions of acute, subacute and subchronic toxicological experiment, which was carried out for reclamation the active ingredient azithromycin in the air of the working area and atmospheric air, toxicity parameters were established and the nature of the biological action of the substance was studied. According to the parameter average lethal concentration in the air, azithromycin is classified as hazard class 4. With a single local exposure of azithromycin to the skin and mucous membranes of the eyes of laboratory animals, no irritant effect was detected in an acute experiment. Weak allergenic activity of the substance has been established. With repeated epicutaneous exposure in a subacute experiment, azithromycin did not cause irritation of the skin, significant shifts in physiological and morphofunctional indicators of the state of the organism of laboratory animals. In a subchronic experiment, a weak cumulative activity of the substance for lethal effects and a general toxic effect on changes in clinical and laboratory parameters were revealed.

**Keywords:** azithromycin, irritating effect, inhalation effect, skin-resorptive effect, sensitizing ability, cumulative activity.

*Поступила 17.05.2022*

УДК 57.085.1:615.277.3

## ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИКЛОФОСФАМИДА И ЗОЛЕДРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПОДОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*Лепешко П. Н.<sup>1</sup>, Соболев Ю. А.<sup>2</sup>, Семёнов И. П.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь*

*<sup>2</sup>Государственное учреждение «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Приведены результаты подострого эксперимента при пероральном введении лабораторным животным водных растворов фармацевтических субстанций циклофосамида и золедроновой кислоты. Установлено, что циклофосамид способен оказывать выраженные биологические эффекты на белых крыс и приводить к срыву адаптационных возможностей организма животных. Золедроновая кислота вызывала менее выраженные биологические ответы, которые характеризовались гемотоксическим и нефротоксическим действием.

**Ключевые слова:** токсикология, циклофосамид, золедроновая кислота, подострый эксперимент, биологическое действие.

**Введение.** Злокачественные новообразования являются глобальной проблемой современности не только в медицине и биологии, но и в социальной жизни общества. Проблема затрагивает интересы практически всех категорий населения. Из восьми смертей в мире одна

является следствием онкологических заболеваний, рак является причиной большего числа смертных случаев, чем СПИД, туберкулез и малярия вместе взятые. По данным Международного агентства по изучению рака (МАИР), ежегодно в мире регистрируется более 12 млн



новых случаев рака и около 6,2 млн смертей от него. Ежегодный темп прироста злокачественных новообразований составляет примерно 2 %, что превышает на 0,3–0,5 % рост численности населения мира [1].

Неутешителен прогноз экспертов ВОЗ: онкологическая заболеваемость во всем мире возрастет к 2050 г. до 24 млн случаев, а смертность до 16 млн ежегодно регистрируемых случаев [2]. Согласно расчетам МАИР (2005 г.), в Европе ежегодно следует ожидать 2,9 млн новых случаев заболевания раком и 1,7 млн смертельных случаев от него [3]. Но современная медицина стремительно развивается, и с каждым годом появляется все больше методов лечения злокачественных новообразований, а также купирования их развития. Одним из методов является химиотерапия лекарственными средствами, одним из которых является циклофосфамид.

При раке возможно метастазирование в кости, а также развитие злокачественной гиперкальциемии, для профилактики которых используется золедроновая кислота.

Внедрение в производство новых лекарственных средств требует создания безопасных в гигиеническом отношении рабочих мест, что, наряду с соблюдением требований техники безопасности, обеспечивается соблюдением содержания вредных химических веществ в воздухе рабочей зоны в определенных безопасных концентрациях. Следовательно, для химических веществ, используемых в производственном цикле фармацевтических производств, исходя из установленных критериев должны разрабатываться предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных химических веществ. Одним из этапов установления ПДК вредных химических веществ является проведение подострого эксперимента, который позволяет установить особенности биологического действия химических веществ при повторном пероральном поступлении, а также выявить различные органы-мишени и биологические маркеры, что позволяет установить критические точки при планировании дальнейших экспериментов по обоснованию ПДК.

**Цель работы** — установить в подостром эксперименте особенности биологического действия при пероральном пути поступления фармацевтических субстанций циклофосфамида и золедроновой кислоты.

**Материалы и методы.** Эксперименты с лабораторными животными проводились с соблюдением правил биоэтики, принципов над-

лежащей лабораторной практики и международных требований [4].

Токсиколого-гигиеническое изучение кумулятивных свойств фармацевтических субстанций циклофосфамида и золедроновой кислоты выполнено в соответствии с методическими требованиями инструкций 1.1.11-12-206-2003 «Гигиеническое нормирование лекарственных средств в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населенных мест и воде водных объектов», 1.1.11-12-35-2004 «Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ» [5, 6]. Токсикологические эксперименты проводились на лабораторных животных (нелинейные самки белых крыс, исходная масса 180–220 г). Перед проведением исследований лабораторные животные проходили двухнедельный карантин в условиях вивария и содержались на стандартных рационах. Экспериментальные группы животных формировали методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя, при этом разность в массе тела животных составляла не более 10 %. При проведении исследований ежедневно наблюдали за общим состоянием и поведением животных, потреблением корма и воды.

Изучение биологических эффектов при повторном алиментарном поступлении фармацевтических субстанций циклофосфамида и золедроновой кислоты проводилось на белых крысах путем ежедневного 5 раз в неделю в течение 4 недель перорального введения лабораторным животным водного раствора, циклофосфамида и золедроновой кислоты в дозах 20 мг/кг и 10 мг/кг (1/10 от  $DL_{50}$ ) соответственно; контрольной группе животных вводилась дистиллированная вода в эквивалентном объеме. В течение всего эксперимента проводили систематическое наблюдение за состоянием, поведением животных, потреблением ими корма и воды, отмечали возможные проявления токсичности, учитывали количество и сроки возможной гибели животных, регистрировали физиологические показатели. По окончании подострого эксперимента крыс выводили из эксперимента методом мгновенной декапитации, при этом собирали кровь из шейных сосудов; после вскрытия проводили макроскопию и определяли относительные коэффициенты масс (ОКМ) внутренних органов. Сыворотку крови отделяли от форменных элементов путем центрифугирования. Гемолизаты получали путем лизиса эритроцитов в дистил-

лированной воде или соответствующем буфере. Гемолизаты и пробы сыворотки крови исследовали немедленно после получения.

Для оценки токсического действия циклофосфида и золедроновой кислоты по окончании подострого эксперимента использовали комплекс общепринятых физиологических, общеклинических, гематологических и биохимических методов и тестов. Полученные результаты исследований подвергались статистической обработке с применением *U*-критерия Манна – Уитни.

**Результаты и их обсуждение.** Во время проведения эксперимента статистически значимых изменений со стороны физиологических по-

казателей (масса тела, суммационно-пороговой показатель, температура тела) по отношению к контрольной группе лабораторных животных выявлено не было как в группе животных, на которую воздействовал циклофосфамид, так и в группе действия золедроновой кислоты.

При ежедневном (5 раз в неделю) пероральном поступлении белым крысам циклофосфида были выявлены существенные статистически значимые изменения показателей периферического кровообращения. Так, содержание эритроцитов снизилось на 48 %, гемоглобина на 38 % и гематокрита на 32 % по отношению к контрольной группе лабораторных животных (таблица 1).

Таблица 1 — Показатели периферического кровообращения у белых крыс после 4-недельного перорального поступления циклофосфида и золедроновой кислоты в дозах 20 мг/кг и 10 мг/кг соответственно, Ме (P<sub>25</sub>–P<sub>75</sub>)

Показатель	Контроль	Циклофосфамид	Золедроновая кислота
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	7,34 (7,11–7,66)	3,84 (2,91–6,06)*	7,90 (7,51–8,03)
Гемоглобин, г/л	144,00 (135,50–148,50)	90,00 (63,00–120,00)*	154,50 (149,50–160,00)*
Гематокрит	0,37 (0,36–0,40)	0,25 (0,22–0,34)*	0,42 (0,40–0,43)*
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	11,98 (10,18–15,41)	15,92 (12,73–20,83)	14,78 (13,81–15,22)
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	717,50 (569,50–802,50)	548,00 (437,00–645,00)	809,50 (614,50–944,00)
Объем эритроцита, 10 <sup>-15</sup> /л	51,90 (50,25–52,90)	65,80 (55,10–69,50)*	52,70 (51,40–55,30)
Объем тромбоцита, 10 <sup>-15</sup> /л	5,85 (5,65–6,00)	5,90 (5,70–6,10)	5,60 (5,50–5,70)
Концентрация гемоглобина в эритроците	376,50 (370,00–379,50)	341,00 (303,00–355,00)*	375,50 (370,00–379,00)
Гемоглобин в эритроците	19,45 (18,80–20,15)	21,00 (18,80–21,70)	20,05 (19,20–20,50)
Нейтрофилы, %	18,60 (17,25–19,80)	55,30 (27,10–69,00)*	22,80 (20,35–25,10)
Нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /л	2,57 (1,84–2,94)	7,81 (4,52–11,52)*	3,53 (3,10–3,71)
Лимфоциты, %	71,20 (67,75–74,45)	34,20 (21,30–43,70)*	67,05 (65,65–72,05)
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	8,52 (6,86–11,08)	5,14 (3,34–7,12)	10,08 (8,25–10,20)
Моноциты, %	6,05 (4,55–8,90)	8,30 (8,00–19,30)	5,25 (4,70–6,10)
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,76 (0,62–1,16)	1,50 (0,99–4,41)*	0,81 (0,65–0,89)
Эозинофилы, %	3,15 (2,20–4,30)	2,20 (1,30–4,00)	3,40 (2,70–4,30)
Эозинофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,46 (0,27–0,61)	0,33 (0,21–0,50)	0,45 (0,38–0,64)
Базофилы, %	0,25 (0,20–1,00)	0,30 (0,10–0,50)	0,65 (0,35–0,80)
Базофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,03 (0,02–0,16)	0,05 (0,02–0,07)	0,10 (0,05–0,14)

\* Статистически значимые изменения по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

Кроме этого, циклофосфамид оказывал воздействие и на красный кровяной росток. Отмечалось статистически значимое увеличение объ-

ема эритроцита на 27 %, но при этом концентрация гемоглобина в эритроцитах снизилась на 9 % по отношению к контрольной группе.

Со стороны белого ростка кроветворения выявилось значительное статистически значимое увеличение как абсолютного, так и относительного количества нейтрофилов (в 3 раза) и абсолютного количества моноцитов (в 2 раза). На фоне этого у исследуемой группы лабораторных животных отмечалось снижение относительного количества лимфоцитов на 52 %. Указанные изменения позволяют заключить о способности циклофосфида вызывать анемические реакции у белых крыс в дозе 20 мг/кг при повторном пероральном введении, а также оказывать гемотоксическое действие как на красный, так и на белый росток кроветворения.

В отличие от циклофосфида золедроновая кислота в дозе 1/10 от DL<sub>50</sub> не обладает ярко выраженным гемотоксическим эффектом

при пероральном пути поступления. По окончании подострого эксперимента у исследуемой группы лабораторных животных отмечалось статистически значимое, однако не столь существенное увеличение содержания гемоглобина и показателя гематокрита на 7 и 14 % соответственно.

При проведении подострого исследования было установлено, что циклофосфамид в дозе, составляющей 1/10 от DL<sub>50</sub>, способен вызывать выраженные изменения функциональных показателей мочевыделительной системы. Спустя 4 недели перорального введения циклофосфида белым крысам установлено значительное увеличение содержания фосфора в моче лабораторных животных в 2,25 раза, магния в 2,3 раза, белка в 3,7 раза и мочевины в 1,9 раз (таблица 2).

Таблица 2 — Показатели функционального состояния мочевыделительной системы у белых крыс после 4-недельного перорального поступления циклофосфида и золедроновой кислоты в дозах 20 мг/кг и 10 мг/кг соответственно, Ме (P<sub>25</sub>–P<sub>75</sub>)

Показатель	Контроль	Циклофосфамид	Золедроновая кислота
Фосфор в моче, мМоль/л	16,72 (7,50–19,09)	37,64 (36,00–47,57)*	17,93 (14,39–24,91)
Магний в моче, мМоль/л	0,61 (0,57–0,76)	1,39 (1,06–1,80)*	0,89 (0,60–1,23)
Белок в моче, г/л	2,50 (0,00–4,85)	9,20 (2,90–13,20)*	6,70 (3,25–9,65)
Альбумин в моче, мМоль/л	11,60 (11,00–12,60)	11,30 (11,20–11,80)	11,85 (10,60–13,15)
Креатинин в моче, мМоль/л	27,38 (17,01–32,55)	25,13 (19,99–43,28)	24,06 (20,55–26,81)
Мочевина в моче, мМоль/л	134,85 (112,51–142,59)	257,87 (217,80–265,07)*	175,48 (151,56–197,09)*
Глюкоза в моче, мМоль/л	1,11 (1,06–1,14)	1,23 (1,05–1,24)	1,13 (1,09–1,20)

\* Статистически значимые изменения по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

Повышенное содержание фосфора в моче после воздействия циклофосфида свидетельствует о дисфункции почек и возможной гиперкальциемии у лабораторных животных, которую подтверждает и снижение реабсорбции магния. Протеинурия и увеличение содержания мочевины в моче также позволяет сделать вывод о способности циклофосфида оказывать влияние на функциональное состояние почек и азотистый баланс организма лабораторных животных.

При повторном воздействии при пероральном введении в дозе 10 мг/кг золедроновая

кислота также обладает нефротоксическим действием, что подтверждается статистически значимым увеличением содержания мочевины в моче исследуемой группы животных в 1,3 раза по сравнению с контрольной группой. Однако ее токсическое действие на органы мочевыделительной системы не так выражено по сравнению с воздействием циклофосфида.

При изучении биохимических показателей крови лабораторных животных было установлено, что циклофосфамид в дозе, составляющей 1/10 от среднесмертельной, оказывает комплексное токсическое действие практиче-

ски на все системы органов лабораторных животных. Так, в сыворотке крови белых крыс было выявлено статистически значимое снижение содержания креатинина на 16 %, альбуми-

на на 40 %, общего белка на 46 %, липопротеидов низкой и высокой плотности на 6 и 10 % соответственно, а также фосфора на 25 % (таблица 3).

Таблица 3 — Биохимические показатели крови у белых крыс после 4-недельного перорального поступления циклофосамида и золедроновой кислоты в дозах 20 мг/кг и 10 мг/кг соответственно, Ме (P<sub>25</sub>–P<sub>75</sub>)

Показатель	Контроль	Циклофосфамид	Золедроновая кислота
Глюкоза в крови, мМоль/л	5,75 (4,88–6,90)	5,44 (4,95–7,20)	6,44 (4,80–7,04)
Мочевина в крови, мМоль/л	10,29 (10,15–10,42)	9,56 (9,01–10,21)	9,44 (9,02–10,55)
Креатинин в сыворотке крови, мкМоль/л	41,03 (38,57–42,23)	34,67 (33,67–35,32)*	41,44 (39,83–44,10)
Альбумин в сыворотке крови, мМоль/л	42,45 (38,00–48,50)	25,35 (23,40–29,10)*	40,00 (24,60–53,00)
Общий белок в сыворотке крови, г/л	54,85 (50,05–64,35)	29,8 (24,8–42,00)*	71,9 (59,8–82,6)
Активность АЛТ сыворотки крови, мкМоль/л	0,11 (0,10–0,12)	0,1 (0,07–0,11)	0,12 (0,09–0,13)
Активность АСТ сыворотки крови, мкМоль/л	0,16 (0,13–0,16)	0,16 (0,14–0,22)	0,13 (0,13–0,17)
Билирубин в сыворотке крови, мкМоль/л	8,50 (7,15–10,55)	8,90 (7,20–9,70)	14,50 (9,60–16,40)*
ЛПНП в сыворотке крови, мМоль/л	2,90 (2,87–2,95)	2,74 (2,73–2,80)*	2,93 (2,88–2,95)
ЛПВП в сыворотке в крови, мМоль/л	0,77 (0,77–0,80)	0,69 (0,67–0,72)*	0,79 (0,74–0,82)
Фосфор в сыворотке крови, мМоль/л	1,71 (1,66–1,95)	1,28 (1,15–1,45)*	1,89 (1,52 –2,52)
Магний в сыворотке крови, мМоль/л	0,66 (0,62–0,71)	0,63 (0,58–0,65)	0,69 (0,57–0,73)
Амилаза в сыворотке крови, Ед/л	784,30 (516,45–824,15)	414,15 (391,10–455,30)*	597,70 (470,10–942,30)

\* Статистически значимые изменения по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

Снижение содержания общего белка, альбумина, креатинина и амилазы позволяет сделать вывод о комплексном цитотоксическом действии циклофосамида на организм лабораторных животных по окончании 4-недельного эксперимента. Снижение содержания липопротеидов указывает на дисфункцию почек, печени и на возможное тиреотоксическое действие циклофосамида. Увеличение экскреции фосфора с мочой, снижение его содержания в крови также подтверждает возможное патологическое действие на эндокринную систему орга-

низма и срыв адаптационных резервов белых крыс по окончании подострого эксперимента.

При изучении биохимических показателей крови после перорального введения золедроновой кислоты в дозе 1/10 от DL<sub>50</sub> было выявлено статистически значимое увеличение только одного показателя у лабораторных животных, а именно, содержания билирубина в сыворотке крови в 1,7 раз, что может свидетельствовать о незначительном гепатотоксическом действии данной фармацевтической субстанции на организм белых крыс.



По окончании подострого эксперимента было проведено макроскопическое патоморфологическое исследование внутренних орга-

нов с их взвешиванием на аналитических весах и расчетом ОКМ внутренних органов (таблица 4).

Таблица 4 — Относительные коэффициенты массы внутренних органов у белых крыс после 4-недельного перорального поступления циклофосфамида и золедроновой кислоты в дозах 20 мг/кг и 10 мг/кг соответственно, Ме (P<sub>25</sub>–P<sub>75</sub>)

Показатель	Контроль	Циклофосфамид	Золедроновая кислота
ОКМ печени, кг <sup>-3</sup> /кг	34,29 (32,83–35,10)	38,99 (33,67–47,37)	35,68 (34,16–36,72)
ОКМ сердца, кг <sup>-3</sup> /кг	3,10 (2,77–3,37)	4,08 (3,82–4,21)*	3,41 (3,08–4,04)
ОКМ селезенки, кг <sup>-3</sup> /кг	5,14 (4,37–6,05)	7,04 (5,44–8,11)*	4,46 (3,73–6,05)
ОКМ почек, кг <sup>-3</sup> /кг	7,32 (6,78–7,94)	8,59 (8,16–9,41)*	8,14 (7,62–8,50)
ОКМ легких, кг <sup>-3</sup> /кг	7,74 (7,16–8,29)	13,99 (11,47–16,05)*	7,86 (6,70–8,71)

При проведении патоморфологического исследования внутренних органов лабораторных животных после 4-недельного перорального поступления в дозе 20 мг/кг циклофосфамида было выявлено статистически значимое увеличение относительных коэффициентов масс сердца, селезенки, почек и легких в 1,32, 1,37, 1,17 и 1,8 раз соответственно, что позволяет установить выраженное токсическое действие исследуемой субстанции на весь организм белых крыс. При этом наблюдается срыв адаптационных возможностей у лабораторных животных.

По окончании эксперимента статистически значимых изменений относительных коэффициентов масс внутренних органов лабораторных животных после перорального поступления золедроновой кислоты в дозе 10 мг/кг выявлено не было.

**Заключение.** Таким образом, по комплексу физиологических, общеклинических, гематологических и биохимических методов и тестов установлено, что циклофосфамид при подо-

стром алиментарном поступлении в дозе 20 мг/кг оказывает биологический эффект на уровне целостного организма лабораторных животных и обладает гемотоксическим, гепатотоксическим, нефротоксическим действиями, а также приводит к срыву адаптационных резервов у лабораторных животных. Золедроновая кислота при алиментарном поступлении в дозе 10 мг/кг оказывает менее выраженные биологические эффекты, однако способна вызывать определенные изменения со стороны печени, почек и крови лабораторных животных.

Так как случаев гибели лабораторных животных в течение всего эксперимента не было выявлено, то рассчитать коэффициент кумуляции и установить материальное кумулятивное действие нельзя, однако по комплексу указанных выше изменений можно установить, что циклофосфамид и золедроновая кислота в дозах 20 мг/кг и 10 мг/кг, соответственно, способны оказывать функциональное кумулятивное действие на организм лабораторных животных.

### Список цитированных источников

1. Cancer incidence in five continents. Vol. VIII / eds.: D. M. Parkin [et al.]. — Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2002. — 838 p. : tab. — (IARC Scientific Publication ; № 155).
2. World Cancer Report / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer / eds.: B. W. Stewart, P. Kleihues. — Lyon : IARC Press, 2003. — 351 p.
3. Boyle, P. Cancer incidence and mortality in Europe. 2004 / P. Boyle, J. Ferlay // Ann. Oncol. — 2005. — Vol. 16, № 3. — P. 481–488.
4. Надлежащая лабораторная практика : ТКП 125-2008 (02040) // М-во здравоохран. Респ. Беларусь. — Минск : РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении», 2008. — 34 с. — Введ. 01.05.2008.
5. Гигиеническое нормирование лекарственных средств в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населенных мест и воде водных объектов : инструкция 1.1.11-12-206-2003 // Сб. санитарных правил и норм по коммунальной гигиене / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. — Минск, 2005. — Ч. 2. — С. 13–63.
6. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ : инструкция 1.1.11-12-35-2004 / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. — Минск, 2004. — 43 с.

## Features of the biological action of cyclophosphamide and zoledronic acid in a subacute experiment

*Liapioshka P. N.<sup>1</sup>, Sobal Y. A.<sup>2</sup>, Siamionau I. P.<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;*

*<sup>2</sup>State institution "Scientific and Practical Center of the State Committee of Forensic Examinations of the Republic of Belarus", Minsk, Republic of Belarus*

The results of a subacute experiment with oral administration of aqueous solutions of active ingredient cyclophosphamide and zoledronic acid to laboratory animals are presented. It has been established that cyclophosphamide has pronounced biological effects on white rats and lead to disruption of adaptive capabilities of the animal organism. Zoledronic acid caused less pronounced biological responses, which were characterized by hemotoxic and nephrotoxic effects.

**Keywords:** Toxicology, cyclophosphamide, zoledronic acid, subacute experiment, biological effect.

*Поступила 27.09.2022*

УДК 613.632.2;613.633

## ОБОСНОВАНИЕ КЛАССА ОПАСНОСТИ И ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ БЕТАГИСТИНА ДИГИДРОХЛОРИД В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ И АТМОСФЕРЫ

*Гапанович В. Н., Власенко Е. К., Карпенко Е. А., Андреев С. В., Бердина Е. Л., Климович О. М., Мельник Д. К., Бартош М. А., Васильева Е. Н.*

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр ЛОТИОС», г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Выполнена токсикологическая оценка фармацевтической субстанции бетагистина дигидрохлорид, позволившая установить параметры ее токсичности, особенности биологической активности, проявляющейся отсутствием сенсibiliзирующего и кожно-раздражающего действий, слабыми кумулятивными и умеренными ирритативными свойствами на организм лабораторных животных. На основании установленных критериев вредного действия субстанции разработаны гигиенические нормативы содержания бетагистина дигидрохлорида в воздухе рабочей зоны и атмосферы, а также классы опасности вещества.

**Ключевые слова:** бетагистина дигидрохлорид, токсичность, опасность, воздух рабочей зоны, воздух атмосферный.

**Введение.** С целью обеспечения лекарственной безопасности страны и наполнения отечественного рынка высококачественными лекарственными препаратами (ЛП) с доказанной клинической эффективностью, снижения зависимости от их поставок по импорту фармацевтическая промышленность Республики Беларусь значительно расширяет ассортимент выпускаемой продукции, что обуславливает создание новых рабочих мест

с безопасными условиями труда работников отрасли.

Для организации фармацевтического производства в соответствии с требованиями GMP и обеспечения безопасных для персонала условий труда необходимо проведение всесторонней экспериментальной токсикологической оценки новых активных химических соединений (фармацевтических субстанций — ФС), с научным обоснованием их гигиенических нор-

мативов — предельно допустимых концентраций (ПДК) содержания ФС в воздухе рабочей зоны, а также прилегающих к производству территорий.

В действующем законодательстве нашей страны в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения гигиенический норматив ФС бетагистина дигидрохлорид (БГ) в воздухе рабочей зоны и атмосферы отсутствует. Необходимость гигиенического нормирования ФС обусловлена нахождением работающих в зоне воздействия вредного производственного фактора химического происхождения, а также проживанием населения в зоне возможного воздействия вредного химического фактора в составе выбросов предприятий, который способен оказывать неблагоприятное действие на здоровье человека при вдыхании и/или загрязнении кожных покровов. Для решения данной актуальной задачи по охране здоровья персонала фармацевтических производств государственным предприятием «НПЦ ЛОТИОС» разработаны ПДК ФС БГ в воздухе рабочей зоны и в атмосферном воздухе.

Существующая схема медико-биологических испытаний ЛП основана на результатах длительных наукоемких исследований и предусматривает поэтапную оценку их токсичности при различных путях и режимах воздействия на организм лабораторных животных [1]. Вместе с тем экспериментальные токсико-гигиенические исследования ФС БГ при ингаляционном поступлении в организм до последнего времени в Беларуси проведены не были.

В доступной литературе сведения о биологических свойствах ФС БГ при ингаляционном поступлении практически отсутствуют, а именно: не представлены данные об уровне токсичности и опасности, о токсикодинамике и возможных механизмах токсического действия при указанном пути воздействия. Все изложенное выше свидетельствует об актуальности комплексных токсиколого-гигиенических исследований по оценке степени токсичности и опасности ФС БГ, выявления лимитирующих показателей вредности с целью научного обоснования и разработки нормати-

вов безопасного содержания в объектах среды обитания человека — воздухе рабочей зоны и атмосферы.

**Материалы и методы.** Объект исследований — субстанция бетагистина дигидрохлорид (Betahistinum, N-метил-2-(пиридин-2-ил)этанамин дигидрохлорид), формула  $C_8H_{14}Cl_2N_2$ , молекулярная масса 209,1 г/моль, CAS № 5579-84-0; внешний вид — белый или слегка желтоватый кристаллический порошок; растворимость — растворим в воде и этаноле, практически нерастворим в изопропиловом спирте; температура плавления: 150–154 °С; преимущественное агрегатное состояние в воздухе — аэрозоль.

Экспериментальные исследования проведены на аутбредных мышах, белых крысах и кроликах с учетом требований Инструкции № 1.1.11-12-35-2004 [2]. Обращение с животными соответствовало этическим принципам Надлежащей лабораторной практики [1].

При проведении токсикологических исследований моделировали острые, субхронические и хронические формы отравлений. В острых опытах параметры токсикометрии субстанции определяли при однократном внутрижелудочном и ингаляционном путях (мыши — 2 ч, крысы — 4 ч) поступления в организм с последующим расчетом среднесмертельных доз  $LD_{50}$  и концентраций  $CL_{50}$  методом пробит-анализа.

Способность к кумуляции изучена в субхронических экспериментах на крысах при повторном внутрижелудочном (56 суток) введении.

Установление порога хронического действия ФС БГ проведено в эксперименте на крысах при ингаляционном воздействии в режиме 5 суток в неделю (ежедневно в течение 4 ч) в течение 120 суток.

Характер кожно-резорбтивного действия устанавливали при однократном нанесении исследуемой субстанции на кожу белых крыс на 4 ч.

Для оценки токсического действия ФС БГ использовали комплекс методов и методик с изучением морфофункциональных показателей организма (таблица 1).

Таблица 1 — Методы исследования токсических свойств ФС БГ

Методы	Показатель
Токсикологические	Острая, субхроническая и хроническая токсичность, местно-раздражающее, ирритативное, кожно-резорбтивное и сенсибилизирующее действие, масса тела, относительные коэффициенты массы (ОКМ) внутренних органов

Окончание табл. 1

Методы	Показатель
Гематологические	Количество эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в клетке, гемоглобин, средний объем эритроцита, гематокрит, количество лейкоцитов, лейкограмма, количество тромбоцитов, средний объем тромбоцита (анализатор клеток крови Celltac MEK6550K, Nihon Kohden Co, Япония)
Биохимические	Аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, креатинин, мочевины, общий холестерин, глюкоза, общий белок, альбумин, общий билирубин (автоматический биохимический анализатор марки А-25, BioSystems А25, Испания)
Гемостазиологические	Активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время, тромбиновое время, фибриноген (гемокоагулометр четырехканальный СТ 2410, SOLAR, Беларусь)
Общий анализ мочи	рН, удельный вес, глюкоза, общий белок, кетоновые тела, билирубин, уробилиноген, нитриты, лейкоциты, аскорбиновая кислота (экспресс-анализатор мочи АМ-2100, SOLAR, Беларусь)
Иммунологические	Сенсибилизирующая способность по тесту опухания лапы мыши (ТОЛМ)
Морфологические	Макроскопическое исследование и гистологический анализ внутренних органов

Полученные экспериментальные данные для оценки достоверности подвергали статистической обработке общепринятыми методами. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят  $p < 0,05$ .

Величины ПДК ФС МФ в воздухе рабочей зоны и в атмосферном воздухе рассчитаны в соответствии с рекомендациями, изложенными в инструкции 1.1.11-12-206-2003 [3].

**Результаты и их обсуждение.** При однократном внутрижелудочном введении и ингаляционном воздействии ФС БГ в опытах на белых мышах и крысах обоего пола установлены основные количественные параметры токсичности ( $LD_{50}$ ,  $LC_{50}$ ), которые не имеют

видовых (коэффициент видовой чувствительности КВЧ — менее 3,0) и гендерных различий и позволяют отнести субстанцию к 3 классу опасности (умеренно опасным) согласно ГОСТ 12.1.007-76 [4] (таблица 2).

При однократном внесении 100 мкг исследуемой субстанции в нижний конъюнктивальный свод правого глаза кроликов зарегистрированы признаки умеренного раздражения конъюнктивы, средний суммарный балл через час и 24 ч составил 4, что согласно Инструкции 1.1.11-12-35-2004 [2] позволяет отнести ФС БГ к веществам 2-го класса выраженности ирритативного действия (умеренное раздражающее действие).

Таблица 2 — Параметры токсичности субстанции ФС БГ в острых опытах

Параметр токсико-метрии	Вид животных				КВЧ	
	Мыши-самцы	Мыши-самки	Крысы-самцы	Крысы-самки	Самцы	Самки
$LD_{50}$ , мг/кг	2750,31	2709,33	2997,93	3108,20	1,09	1,15
$LC_{50}$ , мг/м <sup>3</sup>	7000,00	6702,87	8000,00	8000,00	1,14	1,19

При однократном нанесении ФС БГ на выстриженный участок кожи спины (размером 4×4 см) самцов белых крыс в дозе 20 мг/см<sup>2</sup> (320 мг/особь) не обнаружено проявлений раздражающих свойств (среднегрупповой суммарный балл выраженности отека и эритемы — 0 баллов, отсутствие местно-раздражающего действия), согласно Инструкции 1.1.11-12-35-2004 [2].

Исследование кожно-резорбтивных свойств ФС БГ после однократного эпикутанного воз-

действия в виде пастообразной массы (80 г исследуемой субстанции + 20 мл воды очищенной) в дозах 100 мг/кг, 500 мг/кг, 2500 мг/кг на выстриженный участок спины (4×5 см) белых крыс обоего пола не выявило внешних признаков раздражения (эритемы и отека), интоксикации и гибели животных, изменений динамики массы тела. При макроскопическом исследовании внутренних органов экспериментальных животных не обнаружено видимых патоморфологических изменений, также не



установлено различий в их ОКМ по сравнению с контрольной серией животных (интактные крысы). Эпикутанное воздействие ФС БГ не вызывало существенных сдвигов значений исследуемых клинико-лабораторных показателей, отмеченные колебания не выходили за пределы диапазона физиологической нормы для данного вида животных. В ходе исследования величина  $LD_{50cut}$  достигнута не была (более 2500 мг/кг), что соответствует 4 классу опасности (малоопасные, согласно ГОСТ 12.1.007-76 [4]).

Изучение сенсibiliзирующего действия ФС БГ на самцах белых мышей не выявило достоверных изменений среднегрупповых показателей ТОЛМ между животными опытной и контрольной серий, что свидетельствовало об отсутствии у нее сенсibiliзирующей способности.

Кумулятивные свойства изучены в субхроническом эксперименте при внутрижелудочном введении ФС БГ в дозе 300 мг/кг ( $1/10 LD_{50}$ ) самцам и самкам крыс на протяжении 56 дней (дозомонотонный эксперимент по методу Ю. С. Кагана и В. В. Станкевича [5]). По окончании эксперимента макроскопическое изучение внутренних органов животных опытной серии показало наличие у самок единичных случаев острой венозной гиперемии печени, вздутие петель тонкого кишечника, увеличение средостенного лимфоузла и солитарных фолликулов; у самцов — единичных случаев крупнокапельной жировой дистрофии печени. Изучение относительной массы внутренних органов крыс, получавших исследуемую субстанцию, выявило у самцов увеличение ОКМ надпочечников — на 17 %, у самок — сердца на 10 %, желудка на 9 % ( $p < 0,05$ ), по сравнению со значениями данных показателей у интактных животных.

Анализ результатов цитогематологического анализа периферической крови самцов крыс опытной серии показал статистически достоверное увеличение процентного содержания гранулоцитов — на 8,54 % и среднего объема тромбоцитов на — 2,87 %; снижение процентного содержания моноцитов — на 29,84 %, гемоглобина — на 5,86 и гематокрита — на 3,98 % по сравнению с показателями, зарегистрированными в серии интактных животных. У самок крыс опытной серии отмечалось снижение процентного содержания моноцитов и эозинофилов в крови — на 11,32 и 31,39 % соответственно; также отмечено незначительное уменьшение значения показателей гематокрита, среднего объема эритроцитов, тромбоцитов и среднего содержания гемоглобина в эритро-

ците по отношению к значениям, полученным в контроле.

Биохимический анализ сыворотки крови крыс по окончании субхронического внутрижелудочного введения ФС БГ выявил достоверное снижение содержания мочевины у самцов и самок относительно значений, зарегистрированных у интактных животных, на 17,21 и 10,60 % соответственно. Также у самок данной серии было обнаружено снижение уровня глюкозы на 11,82 % ( $p < 0,05$ ), повышение содержания общего билирубина на 390,24 % ( $p < 0,05$ ) и холестерина на 25,38 % ( $p < 0,05$ ), по сравнению с значениями в контрольной серии.

Анализ состояния плазменного звена гемостаза самцов крыс, получавших исследуемую субстанцию, выявил достоверное снижение значений протромбинового времени (ПВ) на 7,37 %, увеличение концентрации фибриногена в крови на 26,27 %, а у самок — увеличение содержания фибриногена на 42,11 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значениями, зарегистрированными в серии интактных животных. Изученные показатели общего анализа мочи не претерпевали изменений.

Величина среднесмертельной дозы ФС БГ в субхроническом опыте при внутрижелудочном введении  $LD_{50subchr}$ , рассчитанная методом пробит-анализа, составляет 27667,80 мг/кг. Величина коэффициента кумуляции  $K_{cum}$  составляет 9,22 (слабые кумулятивные свойства,  $K_{cum} > 5,1$ , согласно Инструкции 1.1.11-12-35-2004 [2]).

При изучении хронической токсичности ФС БГ при ингаляционном воздействии в концентрациях 25, 75 и 250 мг/м<sup>3</sup> гибели самцов и самок крыс и признаков интоксикации не зарегистрировано. Макроскопическое изучение и анализ относительной массы внутренних органов показали отсутствие достоверных изменений при межсерийном сравнении. При микроскопическом исследовании внутренних органов (сердце, тимус, почки, легкие, селезенка, печень, надпочечники, головной мозг, желудок) патоморфологических изменений не выявлено. Также не было зафиксировано существенных сдвигов значений цитогематологических показателей периферической крови у самцов. При этом в крови самок при ингаляционном воздействии исследуемой субстанции в дозах 75 и 250 мг/м<sup>3</sup> обнаружено достоверное увеличение содержания эритроцитов — на 4,27 и 7,21 %, показателя гематокрита — на 4,86 и 6,65 % соответственно, а в дозе 250 мг/м<sup>3</sup> — увеличение концентрации гемоглобина — на 5,25 %, по

сравнению со значениями данных показателей в серии интактных животных. Биохимический анализ сыворотки крови крыс-самцов выявил достоверное (по отношению к контролю) снижение уровней следующих показателей: при воздействии в дозе 25 мг/м<sup>3</sup> — концентрации креатинина на 18,31 %; общего белка на 13,43 %, мочевины на 19,24 %; 75 мг/м<sup>3</sup> — содержания общего белка на 11,24 %; мочевины — на 34,54 %; 250 мг/м<sup>3</sup> — концентрации мочевины — на 33,60 %. В сыворотке крови самок выявлено достоверное снижение: при ингаляционном поступлении ФС БГ в дозе 25 мг/м<sup>3</sup> — концентрации общего белка на 15,27 %, глюкозы на 19,40 %, холестерина на 23,80 %; в дозе 75 мг/м<sup>3</sup> — содержания общего белка — на 19,75 %, мочевины — на 33,75 %, глюкозы на — 19,40 %, холестерина — на 47,16 %; 250 мг/м<sup>3</sup> — концентрации мочевины на 165,52 %, холестерина — на 43,12 %, активности аланинаминотрансферазы на — 70,31 %, по сравнению с результатами, полученными в серии интактных животных. В ходе анализа показателей плазменного гемостаза и общего анализа мочи достоверных изменений по отношению к контролю не зарегистрировано.

В соответствии с поставленной целью проведено обоснование ПДК ФС БГ в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе в соответствии с методическими подходами, изло-

женными в Инструкции 1.1.11-12-206-2003 [3]. Величина ПДК рассчитана путем уменьшения порога хронического действия при ингаляционном пути воздействия на организм лабораторных животных ( $Lim_{chr}$ , мг/м<sup>3</sup>) на значение коэффициента запаса ( $K_{зап}$ ).

Величина  $Lim_{chr}$  ФС БГ в хроническом ингаляционном эксперименте на крысах составила 75,0 мг/м<sup>3</sup>, с учетом рассчитанного коэффициента запаса — 12, рекомендуется ПДК в воздухе рабочей зоны — 6,3 мг/м<sup>3</sup> (ПДК в.р.з., максимальная разовая — м.р.).

При обосновании ПДК ФС БГ в атмосферном воздухе использовали величину  $Lim_{chr}$  в условиях круглосуточного эксперимента, полученную на основании ПДК в.р.з. в соответствии с Инструкцией 1.1.11-12-206-2003 [3], значение которой составило 0,4 мг/м<sup>3</sup> или 400 мкг/м<sup>3</sup>. Таким образом, с учетом коэффициента запаса величина ПДК в атмосферном воздухе (среднесуточная — с.с.) составляет 0,0333 мг/м<sup>3</sup>, или 33,3 мкг/м<sup>3</sup>. Поскольку соотношение между максимально разовой (м.р.), среднесуточной (с.с.) и среднегодовой (с.г.) ПДК составляет 10:4:1, то ПДК м.р. = 82,5 мкг/м<sup>3</sup>, ПДК с.г. = 8,3 мкг/м<sup>3</sup>.

Обоснование классов опасности ФС БГ проведено при помощи комплексной токсиколого-гигиенической оценки, основные результаты которой представлены в таблице 3.

Таблица 3 — Токсиколого-гигиенические критерии обоснования класса опасности ФС БГ

Показатель	Величина показателя	Классификационная оценка критерия вредности
Средняя смертельная доза при введении в желудок, LD <sub>50</sub>	Мыши-самцы — 2750,31 мг/кг мыши-самки — 2709,33 мг/кг крысы-самцы — 2997,93 мг/кг крысы-самки — 3108,20 мг/кг	3-й класс опасности, умеренно опасные, согласно ГОСТ 12.1.007-76 [4]
Средняя смертельная доза при нанесении на кожу, LD <sub>50 cut</sub>	Превышает 2500 мг/кг (самцы и самки крыс)	4-й класс опасности (малоопасные), согласно ГОСТ 12.1.007-76 [4]
Средняя смертельная концентрация в воздухе, CL <sub>50</sub>	Мыши-самцы — 7000,00 мг/м <sup>3</sup> мыши-самки — 6702,87 мг/м <sup>3</sup> крысы-самцы — 8000,00 мг/м <sup>3</sup> крысы-самки — 8000,00 мг/м <sup>3</sup>	3-й класс опасности, умеренно опасные, согласно ГОСТ 12.1.007-76 [4]
Коэффициент видовой чувствительности (КВЧ)	1,15 (в/ж) 1,19 (инг.) (самки, крысы/мыши)	Видовая резистентность не выражена (<3), I ранг КВЧ, согласно Инструкции 1.1.11-12-35-2004 [2]
Гендерная чувствительность	Увеличение смертности особей одного пола на 20 % не зарегистрировано (в/ж, инг.)	Гендерная чувствительность не выражена согласно Инструкции 1.1.11-12-35-2004 [2]
Раздражающее действие на кожу при однократном воздействии	Признаков раздражающего действия (эритема, отек) не отмечено, I <sub>cut</sub> = 0 баллов (в эксперименте на крысах)	Отсутствие раздражающего действия — 0 класс, согласно Инструкции 1.1.11-12-35-2004 [2]

Окончание табл. 3

Показатель	Величина показателя	Классификационная оценка критерия вредности
Раздражающее действие на слизистые оболочки глаза при однократном воздействии	Отмечены умеренный отек век, минимальное количество жидкости в углу глаза, сосуды инъецированы (в эксперименте на кроликах)	Умеренное раздражающее действие — 2-й класс, согласно Инструкции 1.1.11-12-35-2004 [2]
Сенсибилизирующая способность	Не выявлена (ТОЛМ)	Отсутствие аллергенной активности, согласно Инструкции 1.1.11-12-35-2004 [2]
Кумулятивные свойства, $K_{cum}$	$K_{cum} = 9,22$ (крысы, в/ж, метод Ю. С. Кагана и В. В. Станкевича)	Слабые кумулятивные свойства, $K_{cum} > 5,1$ согласно Инструкции 1.1.11-12-35-2004 [2]
ПДК в воздухе рабочей зоны	м.р. — $6,3 \text{ мг/м}^3$ (коэффициент запаса $K_3=12$ )	3-й класс опасности, умеренно опасные, согласно ГОСТ 12.1.007-76 [4]
ПДК в атмосферном воздухе	м.р. — $82,5 \text{ мкг/м}^3$ , с.с. — $33,3 \text{ мкг/м}^3$ , с.г. — $8,3 \text{ мкг/м}^3$ (коэффициент запаса $K_3=12$ )	3-й класс опасности, умеренно опасные, согласно Приложения № 2 к пост. МЗ РБ от 21.12.2010 г. № 174

Таким образом, для ФС БГ установлен 3-й класс опасности (умеренно опасные, ГОСТ 12.1.007-76) для воздуха рабочей зоны (лимитирующие критерии — параметры острой токсичности и величина ПДК) и 3-й класс опасности (умеренно опасные, Приложение № 2 к постановлению МЗ РБ от 21.12.2010 г. № 174) для атмосферного воздуха (лимитирующие критерии — параметры острой токсичности и величина ПДК в.р.з.).

**Заключение.** В ходе комплексных экспериментальных токсикологических исследований ФС БГ получены новые данные по параметрам ее токсикометрии, критериям токсичности и опасности, на основании которых проведено обоснование ПДК и классов опасности в воздухе рабочей зоны и атмосферы.

Основные выводы работы:

1. Субстанция бетагистина дигидрохлорид по установленным параметрам острой токсичности в условиях внутрижелудочного введения и ингаляционного воздействия в эксперименте на белых мышах и крысах обоего пола отнесена к умеренно опасным соединениям (3-й класс опасности), не проявляет половой и видовой резистентности, не обладает сенсибилизирующей способностью по тесту опухания лапы мыши, не способна к индукции раздражения при однократном контакте с неповрежденными кожными покровами крыс и слизистыми оболочками глаз кроликов, не представляет опасности острых эпикутанных отравлений.

2. Изучение субхронической токсичности при повторном ингаляционном воздействии на самцах и самках белых крыс показало отсутствие гибели животных и проявлений признаков интоксикации, негативных изменений в приросте массы тела, макро- и микроскопическом строении основных органов жизнеобеспечения и их относительной массы, а также достоверных отклонений в значениях регистрируемых клинико-лабораторных показателей по сравнению с контролем, что характеризует исследуемую субстанцию как вещество со слабыми кумулятивными свойствами (величина коэффициента кумуляции составляет 9,22).

Величина порога хронического ингаляционного действия в эксперименте на крысах составила  $75 \text{ мг/м}^3$  (продолжительность 120 суток в режиме 5 дней в неделю) согласно установленным изменениям значений ряда регистрируемых цитогематологических показателей периферической крови. С учетом коэффициента запаса величина ПДК в воздухе рабочей зоны составила  $6,3 \text{ мг/м}^3$  (максимальная разовая), при этом для исследуемой субстанции установлен 3-й класс опасности (умеренно опасные). ПДК ФС бетагистина дигидрохлорид в атмосферном воздухе составляют: максимальная разовая —  $82,5 \text{ мкг/м}^3$ , средне-суточная —  $33,3 \text{ мкг/м}^3$ , среднегодовая —  $8,3 \text{ мкг/м}^3$ , при этом для воздуха атмосферы установлен 3-й класс опасности (умеренно опасные).

**Список цитированных источников**

1. Надлежащая лабораторная практика : ТКП 125-2008 : утв. постановлением М-ва здравоохранения Респ. Беларусь от 28.03.2008 № 56. — Введ. 01.05.2008. — Минск, 2008. — 35 с.
2. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ : инструкция № 1.1.11-12-35-2004 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 14.12.2004. — Минск, 2004. — 43 с.
3. Гигиеническое нормирование лекарственных средств в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населенных мест и воде водных объектов : инструкция 1.1.11-12-206-2003 : утв. постановлением Гл. гос. сан. врача Респ. Беларусь 30 декабря 2003 г. № 206 // Коммун. гигиена : сб. норм. док. / РЦГЭиОЗ. — Минск, 2003. — Ч. 2. — С. 13-63.
4. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности : ГОСТ 12.1.007-76. — Введ. 01.01.1977. — Минск : Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2008. — 8 с.
5. Каган, Ю. С. Коэффициент кумуляции как количественный критерий / Ю. С. Каган, В. В. Станкевич // Актуальные вопросы гигиены труда, промышленной токсикологии и профессиональной патологии в нефтяной и нефтехимической промышленности : сб. науч. тр. — Уфа, 1964. — С. 48-49.

**Justification of the class of hazard and threshold limit value of the active ingredient betahistine dihydrochloride in the air of the working area and atmosphere**

*Gapanovich V. N., Vlasenko E. K., Karpenko E. A., Andreev S. V., Berdina E. L., Klimovich O. M., Melnik D. K., Bartosh M. A., Vasilyeva E. N.,*

*Republican Unitary Enterprise "LOTIOS Scientific and Practical Center", Minsk, Republic of Belarus*

A toxicological assessment of the active ingredient betahistine dihydrochloride was performed, which made it possible to establish the parameters of toxicometry, the features of the biological activity, manifested by the absence of sensitizing and skin-irritating effects, weak cumulative and moderate irritative properties on the body of laboratory animals. Based on the established criteria for the harmful effect of the substance, hygienic regulations for the content of betahistine dihydrochloride in the air of the working area and atmosphere, as well as hazard classes of the substance, have been developed.

**Keywords:** betahistine dihydrochloride, toxicity, hazard, work area air, atmospheric air.

*Поступила 21.07.2022*

УДК 615.277.3:616-006.448:615.214.24

**ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ СРЕДСТВ С АНТИМИЕЛОМНОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ ТАЛИДОМИДА ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА**

*Ринейская О. Н., Баньковский А. А.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** В работе на основе молекулы талидомида выполнен дизайн различных его производных *in silico* и проведен молекулярный докинг с основным белком-мишенью — цереблном (CRBN). Выявлен наилучший лиганд, проанализированы пространственная структура и характер его взаимодействий на основании изменения энергии связывания и константы ингибирования. Полученные данные оценивались в сравнении с показателями талидомида и помалидомида. Последний известен как наиболее эффективное производное талидомида, применяющееся в клинике в лечении множественной миеломы.

**Ключевые слова:** множественная миелома, талидомид, цереблон, докинг, AutoDock.



**Введение.** Множественная миелома (ММ), представляет собой заболевание, характеризующееся малигнизацией плазматических клеток с последующей продукцией аномальных антител. На начальной стадии протекает бессимптомно, но по мере прогрессирования могут возникать гиперкальциемия, анемия, дисфункция почек и различного рода инфекции и др. В ряде случаев развивается амилоидоз. ММ является вторым по распространенности злокачественным заболеванием крови после неходжкинской лимфомы. Заболевание диагностируется преиму-

щественно в гериатрической популяции со средним возрастом при постановке диагноза около 70 лет и несколько чаще встречается у мужчин, чем у женщин (1,4:1) [1].

По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2020 г. во всем мире множественная миелома была диагностирована у 176 404 человек, в то время как умерло 117 077 человек (рисунки 1, 2). При современных методах лечения выживаемость обычно составляет 4–5 лет. Пятилетняя выживаемость составляет около 54 % [2].

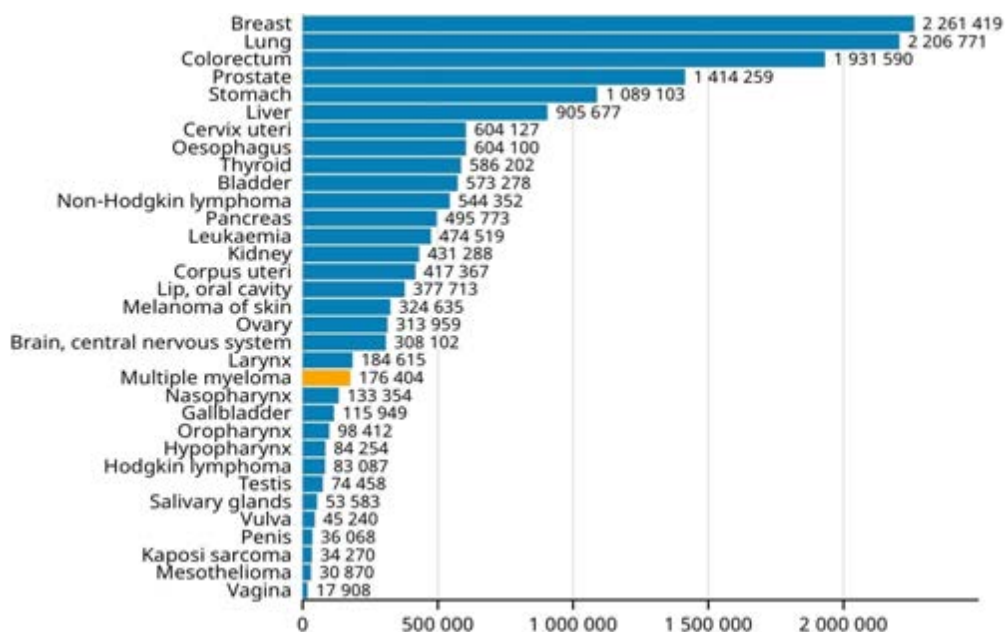


Рисунок 1 — Количество новых случаев онкологических заболеваний в 2020 г.

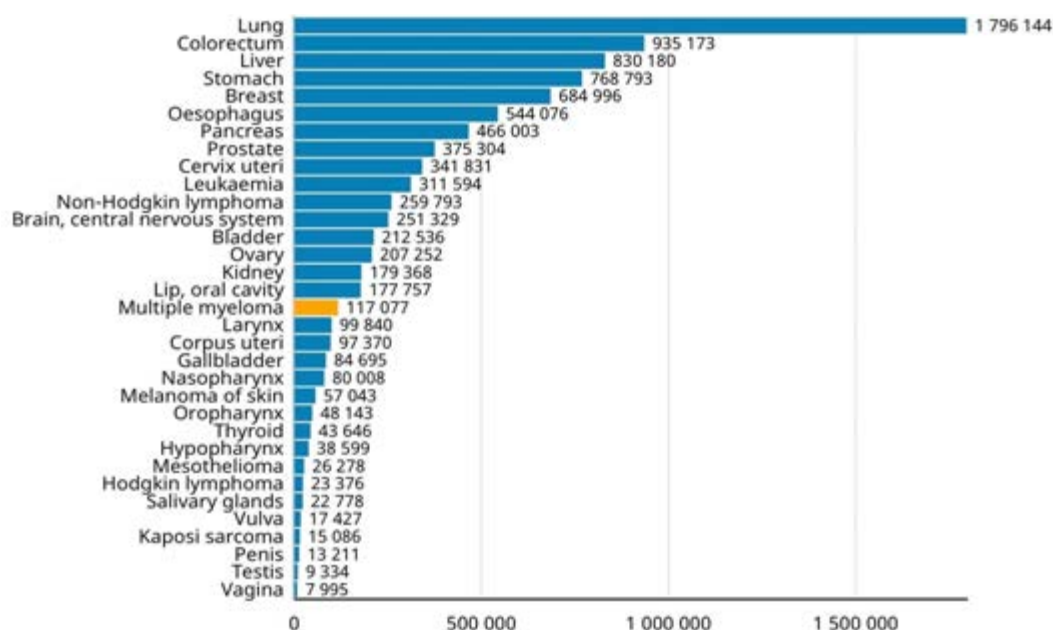


Рисунок 2 — Количество смертей от онкологических заболеваний в 2020 г.

Несмотря на то что ММ является далеко не самым распространенным злокачественным заболеванием все же на сегодняшний день оно остается неизлечимым и высоколетальным, поэтому вопрос о поиске более эффективных лекарств и схем комплексной терапии до сих пор остается крайне актуальным.

В 1999 г. было доказано, что талидомид эффективен в борьбе против ММ. Однако позже были разработаны структурные производные талидомида: леналидомид и помалидомид. Именно они в настоящее время применяются в клинической практике, а последний (помалидомид) зарекомендовал себя как наиболее терапевтически эффективный.

Несмотря на относительно простую химическую структуру, физико-химические свойства талидомида довольно сложны. Молекула талидомида содержит хиральный

центр. В соответствии с R/S-номенклатурой стереоизомеров различают правовращающий (R-) и левовращающий (S-) изомеры. В 1979 г. было обнаружено, что энантимеры проявляют разные биологические и физиологические свойства. Появилась теория о том, что именно (S)-энантиомер вызывает тератогенный эффект [3]. Впоследствии эта теория полностью подтвердилась.

Действующее вещество лекарственного средства представляло собой рацемат, в составе которого находился тератогенный (S)-изомер. Однако даже употребление (R)-изомера приводит к аномалиям развития плода. В настоящее время установлено, что энантимеры талидомида могут быстро рацемизироваться в растворе. Рацемизация происходит посредством keto-енольной таутомерии [4] (рисунок 3).

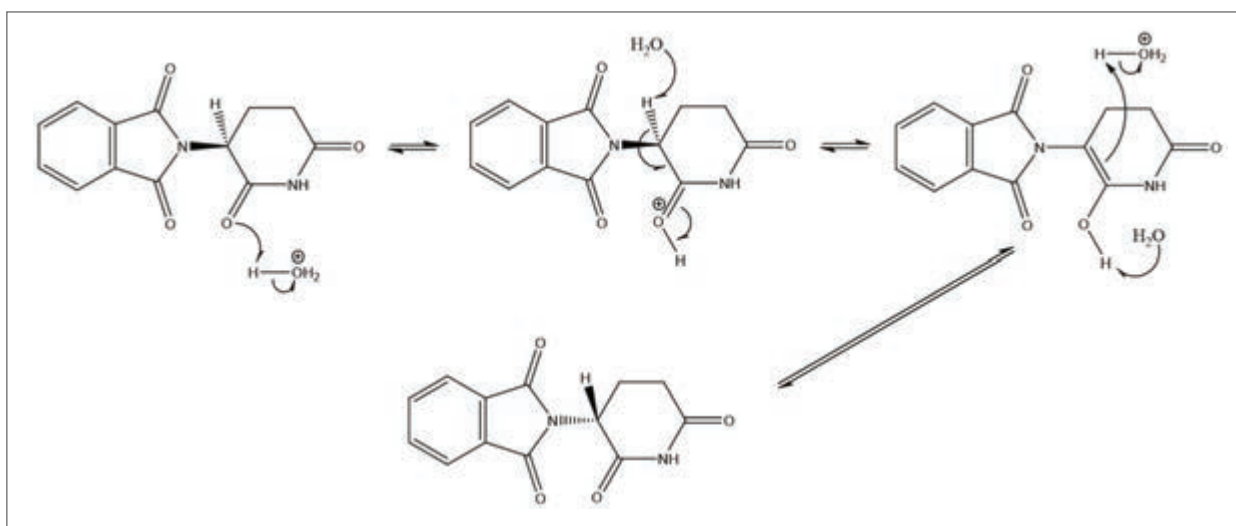


Рисунок 3 — Схема рацемизации талидомида в растворе

В 2010 г. было обнаружено, что единственным белком, связывающим талидомид, является цереблон (CRBN) [5]. Однако оказалось, что CRBN не был изолированным протеином. В действительности молекула талидомида связывается через CRBN с комплексом, в состав которого входит убиквитинлигаза, специфически «помечающая» определенные субстраты убиквитином, что необходимо для их деградации в протеасомах. Некоторые из субстратов продуцируются клетками ММ в избытке для их выживания. Они ответственны за такие важные для злокачественных клеток процессы, как неоангиогенез, адгезия, инвазия и метастазирование. Разрушение этих субстратов неизбежно

приводит к гибели клеток миеломы (рисунок 4).

С другой стороны, хорошо известно, что для корректной закладки органов и конечностей плода необходимо образование новых сосудов. Полностью механизмы действия талидомида и его ближайших производных до конца не изучены. В этом исследовании авторы опираются на наиболее достоверную теорию о том, что таргетное связывание талидомида с CRBN непосредственно коррелирует и с терапевтическими, и с тератогенными свойствами препарата. Следовательно, предстоит выявить с помощью методов молекулярного докинга более эффективно связывающийся с CRBN лиганд.

На основании полученных результатов можно предположительно судить о терапевтических эффектах и планировать дальнейшие исследования *in vitro* и *in vivo*. В контексте описанной

теории вопрос о снижении тератогенного действия потенциального препарата становится неуместным, поскольку белок-мишень является ответственным за оба эффекта.

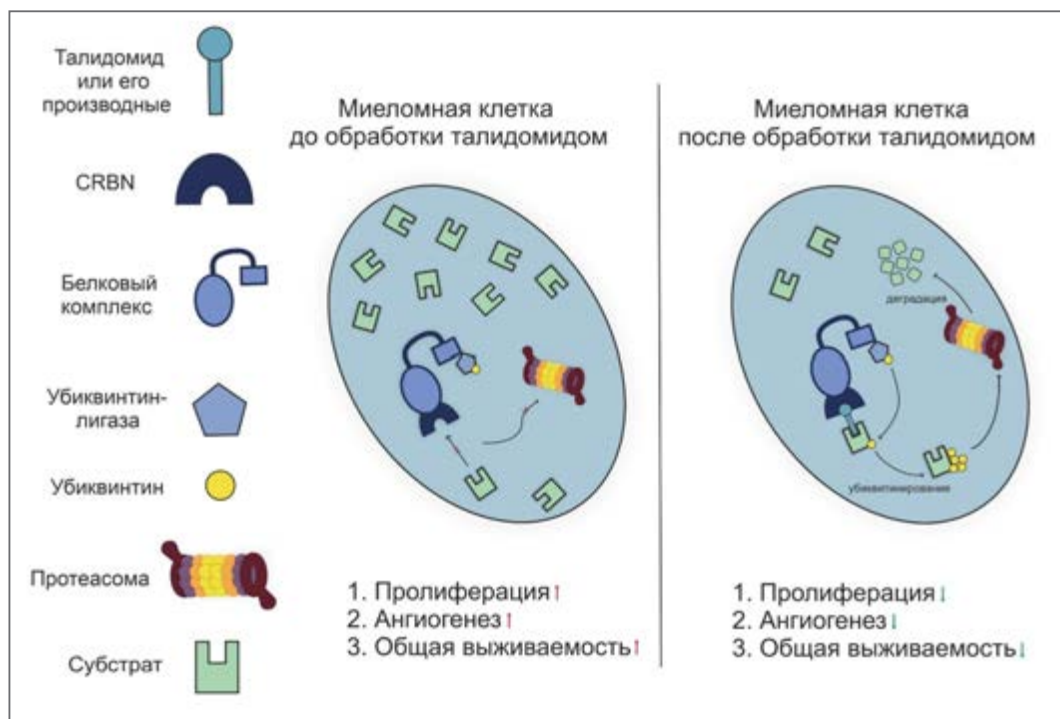


Рисунок 4 — CRBN-опосредованный механизм действия талидомида и его производных

**Цель работы** — моделирование и анализ *in silico* эффективности связывания талидомида и ряда его производных с протеином CRBN для выявления наиболее успешных образцов, перспективных в отношении антимиеломной активности.

В рамках данного исследования необходимо было повести молекулярный докинг, показать характеристики связывания различных производных талидомида с цереблном; выявить наиболее перспективное производное талидомида в отношении антимиеломной активности; проанализировать структуру сайта связывания лиганда с рецептором, оценить характер их взаимодействия.

**Материалы и методы.** Дизайн производных талидомида выполнен с помощью пакета программ ChemOffice. Трехмерная структура цереблона (ID 7bqu) была получена из базы данных Protein Data Bank (PDB) [6]. Для молекулярного докинга *in silico* использовался ряд специализированных программ:

AutoDock 4 [7] — для подготовки к стыковке рецептора, расчета сетки потенциалов и непосредственно лиганд-белковых взаимодействий;

при помощи онлайн-сервера Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) был изучен характер взаимодействий потенциального препарата, произведен анализ архитектуры комплекса в сравнении с комплексом талидомида;

программа OpenBabelGUI использовалась в качестве конвертера различных форматов, требуемых программой AutoDock 4.

При стыковке с целью оптимизации процесса в Autodock использовался алгоритм поиска глобального минимума LGA (Ламаркианский генетический алгоритм). Взаимодействие лиганда и белка (аффинность) оценивалось при помощи характеристик, полученных в результате докинга: энергия связывания (изменение энергии Гиббса) и константа ингибирования.

**Результаты и их обсуждение.** В работе произведено конструирование и последующий анализ 17 структур, являющихся производными талидомида, полученными путем введения или удаления отдельных функциональных групп в пиперидиновый или изоиндолиновый фрагменты. Для удобства была составлена таблица лигандов (таблица 1)

Таблица 1 — Характеристики взаимодействия (энергия связывания  $E_b$  и константа ингибирования  $K_i$ ) лиганд-рецептор производных

А									
№	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$	$R_6$	$R_7$	$E_b$ , ккал/моль	$K_i$
1	-	O	CO	H	H	H	H	-9,28	157,64 nM
2	CH <sub>3</sub> (R-)	O	CO	H	H	H	H	-9,08	219,44 nM
3	CH <sub>3</sub> (S-)	O	CO	H	H	H	H	-8,57	522,40 nM
4	H	CH <sub>2</sub>	CO	H	H	H	H	-8,95	274,62 nM
5	H	CH <sub>2</sub>	C = CH <sub>2</sub>	H	H	H	H	-9,16	192,48 nM
6 (R-)	H	O	COOH	H	H	H	H	-7,71	2,23 μM
7 (S-)	H	O	COOH	H	H	H	H	-8,18	1,16 μM
8	H	O	CO	F	F	F	F	-8,56	533,86 nM
9	H	O	CO	F	F	H	F	-8,56	535,78 nM
10	H	O	CO	F	F	F	H	-8,52	566,03 nM
11	H	O	CO	F	H	H	F	-8,71	411,26 nM
12	H	O	CO	F	F	H	H	-8,64	461,06 nM
13	H	O	CO	F	H	F	H	-8,61	484,73 nM
14	H	O	CO	F	H	H	H	-8,71	409,41 nM
15	H	O	CO	H	H	F	H	-8,61	488,3 nM
Б									
№	$Z_1$		$E_b$ , ккал/моль	$K_i$					
16			-6,14	31,49 μM					
17			-6,34	22,6 μM					

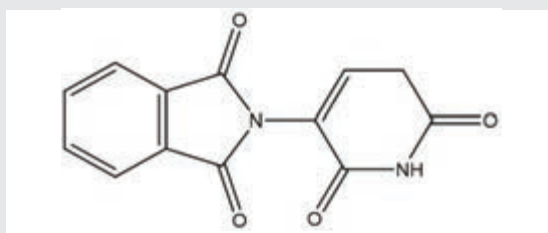


Рисунок 5 — Структурная формула 2-(2,6-ди-оксо-1,2,5,6-тетрагидропиридин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона

В результате проведенного эксперимента *in silico* выявлен лиганд, наиболее эффективно связывающийся с CRBN, — 2-(2,6-диоксо-1,2,5,6-тетрагидропиридин-3-ил)изоиндолин-1,3-дион (рисунок 5, лиганд 1).  $K_i$  составила 157,64 nM при энергии связывания  $E_b = -9,28$  ккал/моль (у талидомида  $K_i = 330,95$  nM при  $E_b = -8,84$  ккал/моль).

При этом он продемонстрировал более высокую аффинность к CRBN даже по сравнению с наиболее эффективным среди произво-



дных талидомида, применяющихся в клинике — помалидомидом ( $K_i = 268,9$  нМ при  $E_b = -8,97$  ккал/моль).

Характеристики отдельных видов взаимодействий 2-(2,6-диоксо-1,2,5,6-тетрагидропи-

ридин-3-ил)изоиндолин-1,3-диона — лиганда 1 — с рецептором (гидрофобных, водородных и  $\pi$ -стэкинговых) представлены в таблицах 2, 3, 4.

Таблица 2 — Гидрофобные взаимодействия лиганда 1 с рецептором

№	Код аминокислотного остатка	Аминокислота	Расстояние между взаимодействующими атомами углерода, Å	Код атома лиганда	Код атома белка
1	352A	PRO	3,22	1059	317
2	380A	TRP	3,95	1056	589
3	386A	TRP	3,75	1058	655
4	386A	TRP	3,84	1055	648
5	402A	PHE	3,11	1055	811
6	402A	PHE	3,64	1056	809

Таблица 3 — Водородные связи лиганда 1 с рецептором

№	Код аминокислотного остатка	Аминокислота	Расстояние между водородом и акцепторным атомом, Å	Расстояние между донорным и акцепторным атомами, Å	Угол между донором, акцептором и атомом водорода	Код акцептора	Код донора
1	351A	ASN	1,94	2,87	156,04	308 [Nam]	1062 [Nam]
2	377A	GLU	2,18	2,72	112,73	556 [O2]	1049 [O2]
3	378A	HIS	2,77	3,35	105,91	569 [Npl]	1049 [O2]
4	386A	TRP	2,19	3,20	130,71	652 [Nar]	1049 [O2]
5	400A	TRP	1,75	2,57	146,62	780 [Nar]	1052 [O2]

Таблица 4 —  $\pi$ -стэкинговые взаимодействия лиганда 1 с рецептором

№	Код аминокислотного остатка	Аминокислота	Расстояние между центрами колец, Å	Углы между кольцами	Тип стэкинг-взаимодействия	Коды атомов лиганда
1	380A	TRP	4,05	28,22	Параллельное	1046, 1047, 1053, 1054, 1055, 1056
2	386A	TRP	3,53	14,01	Параллельное	1046, 1047, 1053, 1054, 1055, 1056
3	400A	TRP	4,66	87,19	Перпендикулярное	1046, 1047, 1053, 1054, 1055, 1056
4	400A	TRP	5,06	87,12	Перпендикулярное	1046, 1047, 1053, 1054, 1055, 1056

Важной особенностью этого комплекса по сравнению с комплексами талидомида и помалидомида является наличие  $\pi$ -стэкинговых взаимодействий между изоиндолиновым ядром лиганда с одной стороны и индольным фрагментом триптофана с другой. Причем

можно наблюдать 2 вида  $\pi$ -стэкинговых взаимодействий: параллельное и перпендикулярное. Молекула данного лиганда не имеет хиральных центров в отличие от остальных образцов. Молекула 2-(2,6-диоксо-1,2,5,6-тетрагидропиридин-3-ил)изоиндолин-1,3-дио-

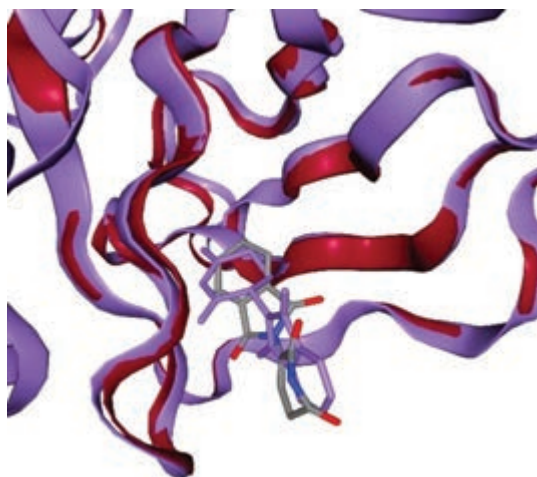


Рисунок 6 — Наложение друг на друга лиганда 1 и талидомида в активном сайте (серого и фиолетового цветов соответственно)

на погружается в структуру CRBN своим ароматическим фрагментом, что вероятно связано с меньшей конформационной подвижностью (рисунок 6), чего нельзя сказать о молекуле талидомида.

Именно этот факт обуславливает появление  $\pi$ -стэкинг-взаимодействий в архитектуре комплекса белка с лигандом. Возможно это объясняет более высокую аффинность данного лиганда по сравнению с талидомидом.

**Заключение.** Полученные результаты дают основание для прогнозирования более высокой терапевтической активности в отношении множественной миеломы у 2-(2,6-диоксо-1,2,5,6-тетрагидропиридин-3-ил)изоиндоллин-1,3-диона и позволяют планировать дальнейшие исследования данного образца *in vitro*.

#### Список цитированных источников

1. Mateos, M. V. MGUS and Smoldering Multiple Myeloma: Diagnosis and Epidemiology / M. V. Mateos, O. Landgren // Cancer Treat Res. — 2016. — Vol. 169. — P. 3–12.
2. Multiple myeloma Source: Globocan 2020 [Electronic resource] / World Health Organization. — Mode of access: [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en). — Date of access: 20.05.2022.
3. Blaschke, G. Chromatographische Racemattrennung von Thalidomid und teratogene Wirkung der Enantiomere [Chromatographic separation of racemic thalidomide and teratogenic activity of its enantiomers (author's translation)] / G. Blaschke, H. Kraft, K. Fickentscher, F. Kähler // Arzneimittelforschung. — 1979. — Vol. 29, № 10. — P. 1640–1642.
4. Enantiomerization mechanism of thalidomide and the role of water and hydroxide ions / C. Tian [et al.] // Chemistry. — 2012. — Vol. 18, № 45. — P. 14305–14313.
5. Ito, T. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity / T. Ito [et al.] // Science. — 2010. — Vol. 327, № 5971. — P. 1345–1350.
6. The Protein Data Bank / H. M. Berman [et al.] // Nucleic Acids Research. — 2000. — Vol. 28. — P. 235–242.
7. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility / G. M. Morris [et al.] // Computational Chemistry. — 2009. — № 16. — P. 2785–2791.

## Search for effective medicines with antimyeloma activity based on thalidomide using molecular docking methods

Ryneiskaya O. N., Bankovsky A. A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Based on the thalidomide molecule, various thalidomide derivatives were designed *in silico*. Molecular docking was carried out with the main target protein, cereblon (CRBN). The best ligand was found, the spatial structure and nature of its interactions were analyzed based on the Binding energy change and the inhibition constant. The obtained data were evaluated in comparison with the indicators of thalidomide and pomalidomide. The latter is known as the most effective thalidomide derivative used clinically in the treatment of multiple myeloma.

**Keywords:** multiple myeloma, thalidomide, cereblon, docking, AutoDock.

Поступила 29.06.2022

УДК 577.175.62:796.071

## ПОЛУЧЕНИЕ 6 $\beta$ -ГИДРОКСИПРОИЗВОДНЫХ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ СИСТЕМЫ СУР3А4 ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ДОПИНГ-КОНТРОЛЯ

Бакакина Ю. С.<sup>1</sup>, Бабарико Д. В.<sup>1</sup>, Ефимович Д. Д.<sup>1</sup>, Шкель Т. В.<sup>2</sup>, Свирид А. В.<sup>2</sup>,  
Кисель М. С.<sup>2</sup>, Походня Ю. Г.<sup>1</sup>, Гилеп А. А.<sup>2</sup>, Сяхович В. Э.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория»,  
аг. Лесной, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии  
Национальной академии наук Беларуси»,  
г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** Применение спортсменами анаболических андрогенных стероидов (ААС) является наиболее значимой проблемой допинг-контроля. ААС практически полностью метаболизируются в организме человека в результате фазы I и фазы II биотрансформации, в том числе при участии ферментов семейства цитохромов P450 (СУР). Наличие стандартных веществ или сертифицированных референсных образцов метаболитов ААС является обязательным для определения спектра запрещенных препаратов в биологических жидкостях спортсменов. В рамках данной работы был разработан метод получения 6 $\beta$ -гидроксипроизводных значимых в допинг-контроле ААС с использованием рекомбинантной ферментативной системы СУР3А4 человека и подобраны условия для детекции синтетических ААС и их метаболитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

**Ключевые слова:** рекомбинантный СУР3А4 человека, синтетические анаболические андрогенные стероиды, метаболиты, жидкостная хромато-масс-спектрометрия.

**Введение.** Анаболические андрогенные стероиды относятся к группе S1 запрещенного списка веществ Всемирного антидопингового агентства (ВАДА) и находятся под полным запретом применения как в соревновательный, так и внесоревновательный периоды [1]. В связи с этим определение ААС относится к приоритетному направлению в допинг-контроле, а разработка и обновление аналитических подходов для надежного обнаружения их злоупотребления имеет важное значение.

Несмотря на этот факт, а также на принимаемые меры по улучшению методов детек-

ции данных соединений, пропаганду чистого спорта и другие мероприятия ВАДА, количество выявленных положительных проб остается высокой, а данная группа занимает первое место среди всех классов запрещенных веществ (47 % от всех выявленных неблагоприятных аналитических результатов в 2020 г.). В таблице приведены первые 10 позиций неблагоприятных аналитических результатов (*Adverse Analytical Finding*) в группе S1 запрещенного списка веществ ВАДА, выявленных лабораториями, аккредитованными ВАДА, в 2020 г. [2].

Таблица — Неблагоприятные аналитические результаты в группе S1 запрещенного списка веществ ВАДА, выявленных лабораториями, аккредитованными ВАДА

Анаболический стероид	Количество выявленных случаев	Случаи в группе S1, %
1. Станозолол	86	14
2. Оралтуринабол	76	13
3. Дростанолон	62	10
4. Метандиенон	56	9
5. 19-норандростерон	50	8
6. Оксандролон	47	8

Окончание табл. 1

Анаболический стероид	Количество выявленных случаев	Случаи в группе S1, %
7. Тренболон	37	6
8. Болденон	36	6
9. Метенолон	28	5
10. Местеролон	23	4

ААС в большинстве своем практически полностью биотрансформируются в организме человека. ААС метаболизируются в основном в печени, некоторые метаболические реакции также происходят в почках и коже [3]. В результате фазы I и фазы II биотрансформации ААС образуется серия метаболитов.

Одним из требований ВАДА к антидопинговым лабораториям является использование для анализа только стандартных веществ или сертифицированных референсных образцов метаболитов ААС для рассмотрения полученных положительных результатов тестирования. В связи с этим одной из главных особенностей подхода к анализу проб спортсменов на присутствие ААС является необходимость детекции продуктов I или II фазы метаболизма.

Таким образом, для успешного определения спектра запрещенных препаратов, относящихся к списку S1, в биологических жидкостях атлетов необходимо разработать эффективный алгоритм получения стандартных веществ метаболитов таких препаратов.

Ферменты семейства цитохромов P450 (CYP) участвуют в I фазе биотрансформации ААС и катализируют гидроксирование стероидного кольца [4]. Гидроксирование ААС по  $\beta$ -положению с участием CYP3A является одним из главных метаболических путей I фазы биотрансформации стероидов *in vivo*. В связи с этим использование ферментов CYP450 представляет значительный интерес для решения задачи биотехнологического синтеза метаболитов I фазы биотрансформации ААС.

**Цель работы** — разработка метода получения  $\beta$ -гидроксипроизводных синтетических ААС с использованием рекомбинантной ферментативной системы CYP3A4 человека.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлось получение  $\beta$ -гидроксипроизводных синтетических ААС с использованием рекомбинантной ферментативной системы CYP3A4 человека.

**Получение CYP3A4 человека.** Клетки *E. coli* DH5 $\alpha$  трансформировали плазмидой pCW\_CYP3A4, несущей последовательность кодирующей ДНК CYP3A4 человека, и культивировали при 26 °С в течение 48 ч с момента

индукции синтеза белка 0,5 мМ изопропил- $\beta$ -тиогалактопиранозидом (ИПТГ).

Выделение и очистку рекомбинантного белка CYP3A4 проводили при комбинации аффинной и ионообменной хроматографии. Выделение белка проводили на хроматографической колонке с Ni-NTA<sup>2+</sup>-агарозой, а очистку — на колонке с гидроксапатитом в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Окрашенные белковые фракции собирали и хранили при -75 °С.

**Получение НАДФН-цитохром P450 редуктазы.** Клетки *E. coli* DH5 $\alpha$  трансформировали плазмидой pRatCPR(Lys56Gln), несущей последовательность кодирующей ДНК НАДФН-цитохром P450 редуктазы крысы (Lys56Gln мутант), и культивировали при 26 °С в течение 48 ч с момента индукции синтеза белка 1 мМ ИПТГ.

Выделение и очистку рекомбинантного белка НАДФН-цитохром P450 редуктазы проводили при комбинации аффинной и ионообменной хроматографии. Выделение белка проводили на хроматографической колонке с DEAE-агарозой, а очистку — на колонке с 2,5-АДФ-агарозой в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Белковую фракцию хранили при -75 °С.

**Получение микросомального цитохрома  $b_5$  ( $b_5$ ).** Компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) трансформировали плазмидной ДНК pT7\_Mcb5\_human, несущей кодирующую ДНК микросомального цитохрома  $b_5$  человека, и культивировали при 37 °С в течение 4 ч с момента индукции синтеза белка 1 мМ ИПТГ.

Процедура выделения микросомального цитохрома  $b_5$  состояла в комбинации аффинной хроматографии и адсорбционной хроматографии смешанного типа.

Поскольку часть цитохрома  $b_5$  человека экспрессируется в апоформе (без гема), необходимо перевести его в холоформу (с гемом). Для этого к супернатанту при постоянном перемешивании добавляли по каплям раствор геминхлорида (50 мг геминхлорида в 1 мл 0,1 Н NaOH) при 4 °С. Титрование геминхлоридом продолжали до достижения максимального значения оптической плотности на



414 нм. Далее проводили выделение белка на хроматографической колонке с DE-52-целлюлозой и очистку — на хроматографической колонке с Ni-NTA<sup>2+</sup>-агарозой, а затем на колонке с гидроксипатитом в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Окрашенные белковые фракции собирали и хранили при -75 °С.

**Получение β-гидроксипроизводных ААС.** Реакционная смесь для получения β-гидроксипроизводных ААС включала ферментативный комплекс, состоящий из СУР3А4, СРР и цитохрома b5 в соотношении 1:2:2, 50 мМ калий-фосфатного буфера (КФБ, рН 7,4), 30 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкг/мл смеси фосфолипидов (L-α-дилаурил-sn-глицеро-3-фосфохолина, L-α-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина, L-α-фосфатидил-L-серина), 750 нг/мл холата натрия, 3 мМ восстановленного глутатиона и 100 мкМ ААС в конечном объеме 250 мкл. Реакцию запускали внесением 10 мМ НАДФН и инкубировали в течение 60 мин при 37 °С. В качестве контроля использовали образцы, не содержащие НАДФН. Реакцию останавливали внесением 50 % ацетонитрила.

Образование продуктов реакции определяли с помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа с применением обращенно-фазной колонки Hypersil Gold C18 (150×2,1 мм, размер частиц 5 мкм, Thermo Scientific, США) с использованием сверхвысокоэффективного жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США). Масс-спектрометрическую детекцию проводили на масс-спектрометре высокого разрешения Q Exactive Plus (Thermo Scientific, США). В качестве внутреннего стандарта использовали синтетический ААС — метилтестостерон. Данные обрабатывали с помощью программы XCalibur (Thermo Scientific, США).

**Результаты и их обсуждение.** В недавнем прошлом газовая хроматография (ГХ) в сочетании с масс-спектрометрией (МС) являлась основным методом для определения и скрининга ААС и их метаболитов в моче человека [5]. Однако для анализа ААС с помощью ГХ-МС требуется проведение предварительного ферментативного гидролиза и длительных этапов дериватизации для получения летучих производных. При анализе ААС с использованием ГХ-МС остается проблема с чувствительностью и селективностью для определения некоторых стероидов, присутствующих в моче в очень низких количествах. В последние годы все большее значение в допинг-контроле приобретает метод ВЭЖХ в сочетании с тандемной МС (МС/МС),

поскольку для его проведения не требуется стадия дериватизации, возможно определение термолabileльных и плохо дериватирующихся ААС. В литературе имеется ряд работ по анализу ААС в биологических жидкостях человека с использованием ВЭЖХ-МС/МС [6].

На первом этапе выполнения работы были подобраны параметры хроматографического разделения и детекции методом ВЭЖХ-МС целевых соединений на основе стандартных веществ тестируемых ААС и их метаболитов.

Для работы были выбраны значимые в допинг-контроле ААС: станозолол, оралтуринабол, метандиенон, оксандролон, оксиметолон, которые имеют разные структурные характеристики, в частности, количество двойных связей, положение и количество функциональных групп.

В качестве внутреннего стандарта был выбран синтетический ААС — метилтестостерон. Несмотря на то что данное соединение относится к группе S1 запрещенного списка веществ ВАДА, известно, что оно полностью метаболизируется в организме человека и в исходном виде не экскретируется. Хроматограмма и масс-спектр внутреннего стандарта приведены на рисунке 1.

Было рассмотрено несколько вариантов содержания ацетонитрила в элюирующей системе — от 5 до 30 %. Показано, что заметного влияния на качество хроматографического разделения ААС и их метаболитов в условиях масс-спектрометрической детекции данный параметр не оказывает.

В связи с тем, что при масс-спектрометрической детекции имеется возможность селективного выделения соединений с разной молекулярной массой даже в случае совпадающего времени выхода, особое внимание при подборе хроматографических параметров было уделено возможности разделения изомерных форм стероидов. В связи с этим, исходное содержание ацетонитрила в элюирующей системе было выбрано минимально возможным — 5 %. Кроме того, было рассмотрено влияние хроматографических параметров (режим элюирования) на разделение метаболитов ААС с несколькими вариантами гидроксирования стероидной структуры на примере метаболитов станозолола — 3'-гидрокси-, 4β-гидрокси- и 16β-гидроксистеранозолола (рисунок 2). В результате был подобран метод с 25-минутным градиентом от 5 до 95 % ацетонитрила (с 0,1%-й муравьиной кислотой) в воде при скорости потока 0,25 мл/мин. В качестве базового раствора использовали 0,1%-ю муравьиную кислоту в воде.

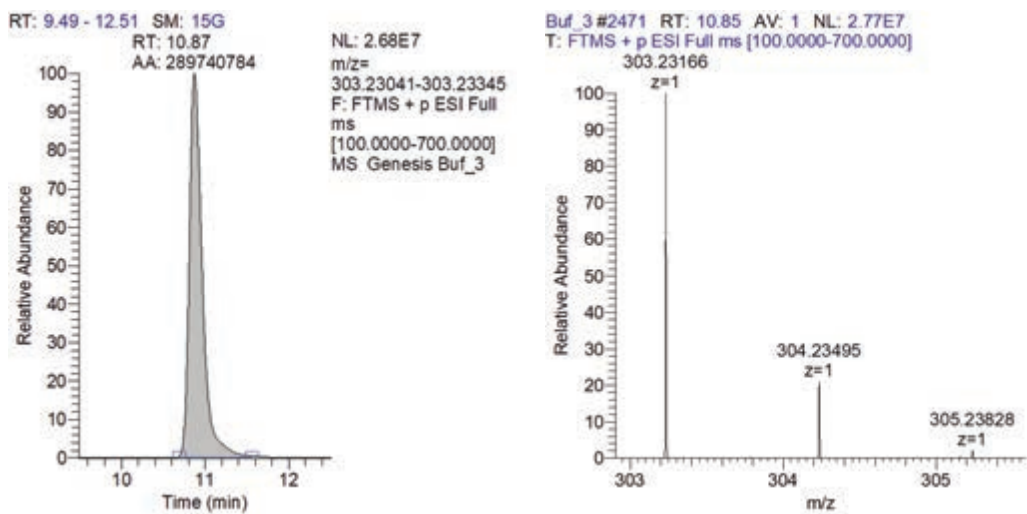


Рисунок 1 — Хроматограмма и масс-спектр внутреннего стандарта (метилтестостерона), полученные методом ВЭЖХ-МС

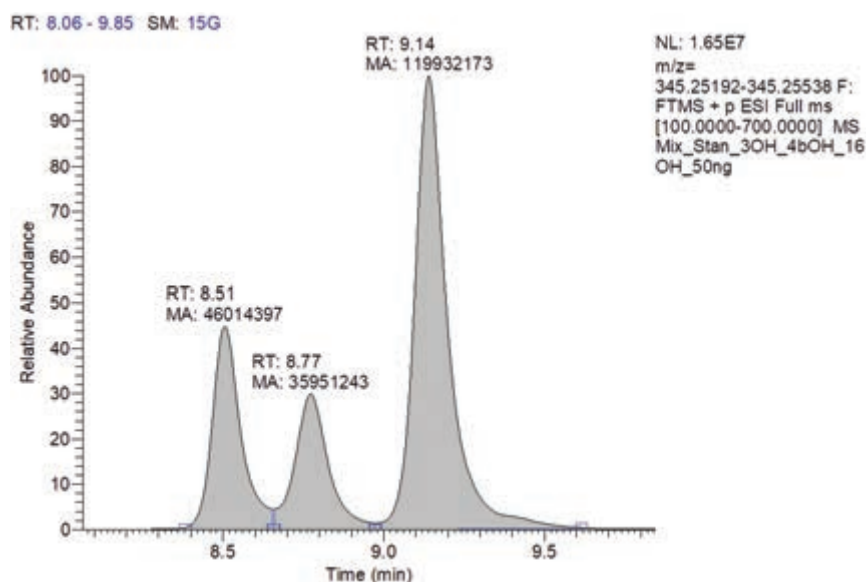


Рисунок 2 — Хроматограмма разделения смеси 3'-гидрокси-, 4β-гидрокси- и 16β-гидроксистераноизола (50 нг/мл каждого соединения) при градиенте от 5 до 95 % ацетонитрила методом ВЭЖХ

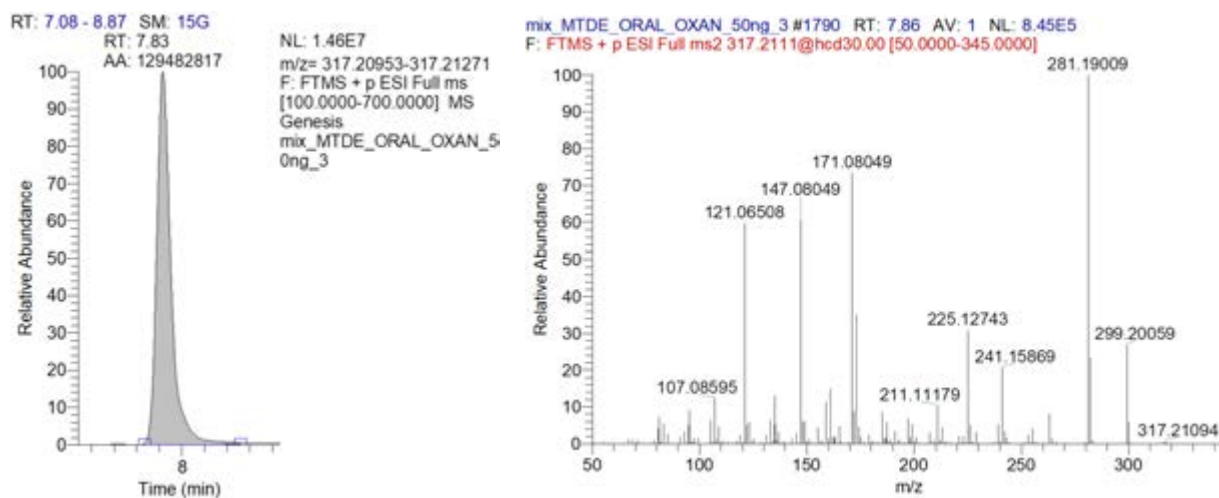
С целью оптимизации МС/МС-распада был проведен анализ в МС/МС-режиме детекции целевых ионов с коллизионными энергиями 15–70 эВ и охарактеризованы полученные МС/МС-спектры ААС и их метаболитов. Для исследованных в работе ААС были получены масс-спектры с удовлетворительными параметрами распада как по степени деградации материнского иона, так и образованию дочерних ионов при коллизионной энергии 30 эВ.

На рисунке 3 в качестве примера представлены хроматограммы и МС/МС-спектры

6β-гидрокси-метандиенона и 6β-гидроксиоралтуринабола, демонстрирующие наличие характерической фрагментации данных соединений.

Таким образом, были подобраны условия для хроматографического разделения (содержание ацетонитрила в элюирующей системе, режим элюирования) и масс-спектрометрической детекции (коллизионная энергия) синтетических ААС и их метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС.

а



б

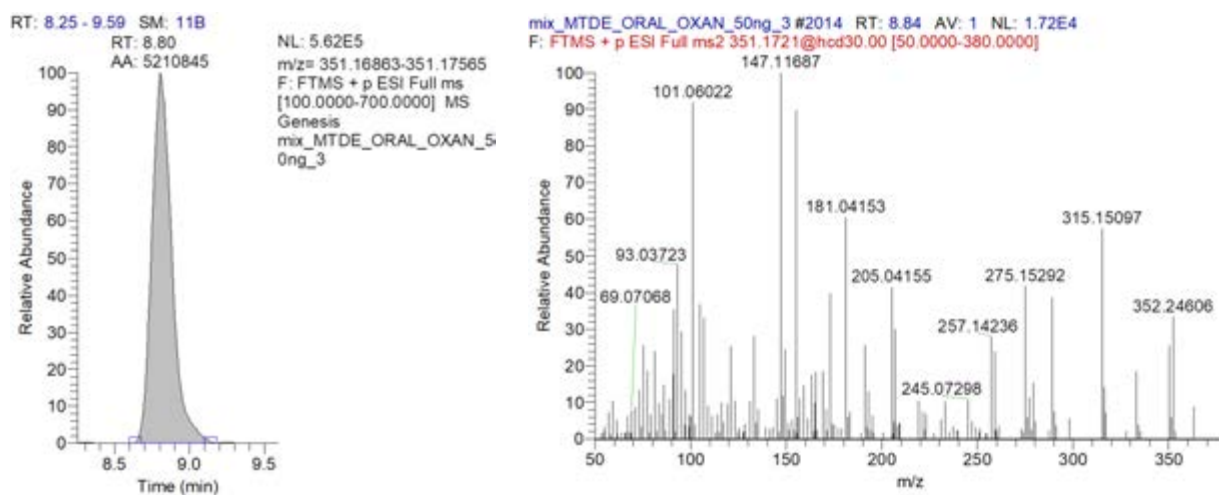


Рисунок 3 — Хроматограммы разделения и МС/МС-спектры  $\beta$ -гидроксиметандиенона (а) и  $\beta$ -гидроксиоралтуринабола (б), полученные методом ВЭЖХ-МС/МС

Для исследования метаболизма лекарственных средств с помощью стероидгидроксилазы СYP3A4 в экспериментах *in vitro* необходимо проведение реакции  $\beta$ -гидроксилирования тестостерона в соответствии с рекомендациями по применению новых лекарственных средств, регулируемых Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), Европейским агентством лекарственных средств (EMA) и Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии (MHLW) [7]. Тестостерон — типичный андроген, гидроксилирование которого в  $\beta$ -положении преимущественно катализируется подсемейством СYP3A [3].

Таким образом, на втором этапе выполнения работы с целью исследования возможно-

сти получения гидроксипроизводных ряда синтетических ААС с использованием  $\beta$ -стероидгидроксилазы СYP3A4 была осуществлена постановка данной реакции в отношении эндогенного ААС — тестостерона. В работе для исследования метаболизма ААС *in vitro* использовали очищенный рекомбинантный СYP3A4 человека.

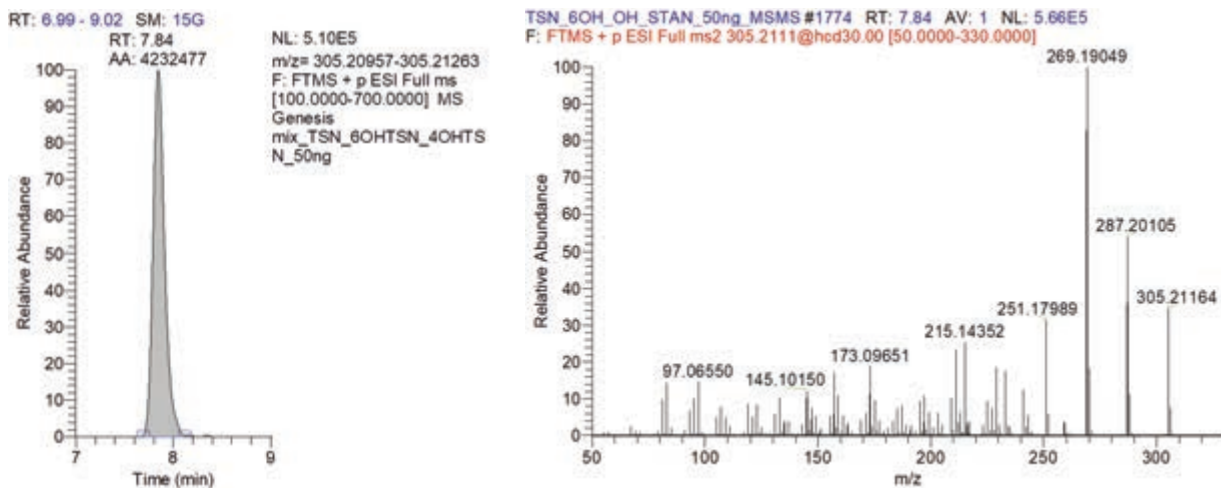
СYP3A4 катализирует реакцию  $\beta$ -гидроксилирования эндогенных стероидов и нуждается в электронах, поступающих от окислительно-восстановительных партнеров — НАДФН-цитохром Р450 редуктазы (CPR) и цитохрома *b5*. В работе были использованы рекомбинантные препараты данных белков (чистота > 95 % по гель-электрофорезу в денатурирующих условиях): микросомальный цитохром *b5* (*b5*) и CPR.

В результате проведения реакции гидроксирования тестостерона с участием ферментативной системы СУР3А4 было выявлено образование четырех моногидроксированных метаболитов, в том числе  $\beta$ -гидрокситестостерона. Для установления структуры ААС и определения сайтов гидроксирования был проведен МС/МС анализ образцов. Подтверж-

дение наличия гидроксирования по  $\beta$ -положению осуществлялось по дочерним ионам стандарта метаболита тестостерона.

Как видно из данных, представленных на рисунке 4, СУР3А4 катализирует гидроксирование тестостерона с образованием  $\beta$ -гидрокситестостерона (время удерживания 7,8 мин) в качестве основного метаболита.

а



б

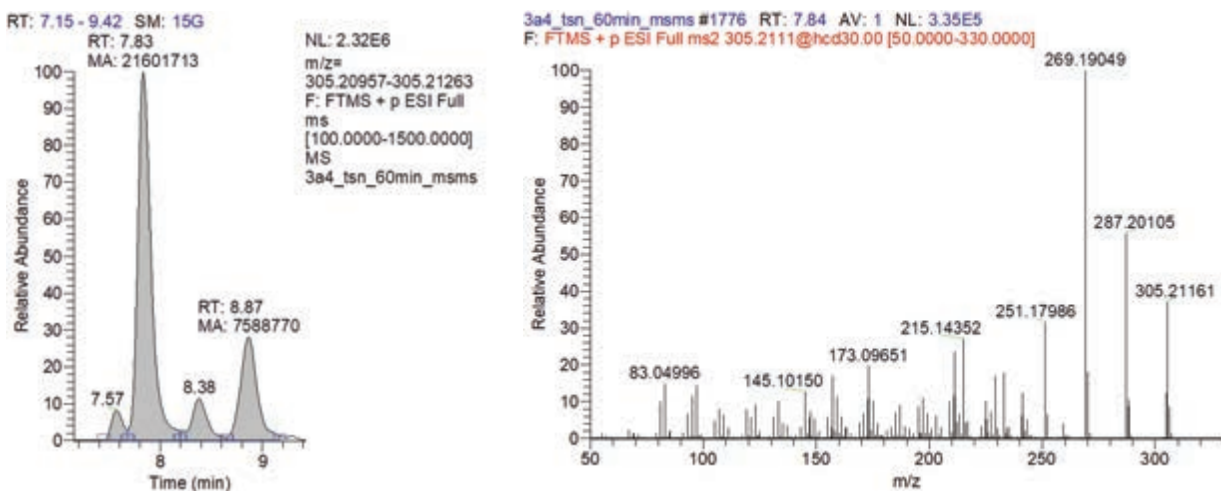


Рисунок 4 — Хроматограммы и МС/МС-спектры стандарта  $\beta$ -гидрокситестостерона (время удерживания 7,8 мин) (а) и моногидроксипроизводных тестостерона, полученных при протекании реакции с участием ферментативной системы СУР3А4 (б)

На третьем этапе выполнения работы с целью получения  $\beta$ -гидроксипроизводных ряда синтетических ААС (станозолол, оралтуринабол, метандиенон, оксандролон, оксиметолон) с использованием  $\beta$ -стероидгидроксилазы СУР3А4 была осуществлена апробация работы ферментативной системы в отношении данных ААС.

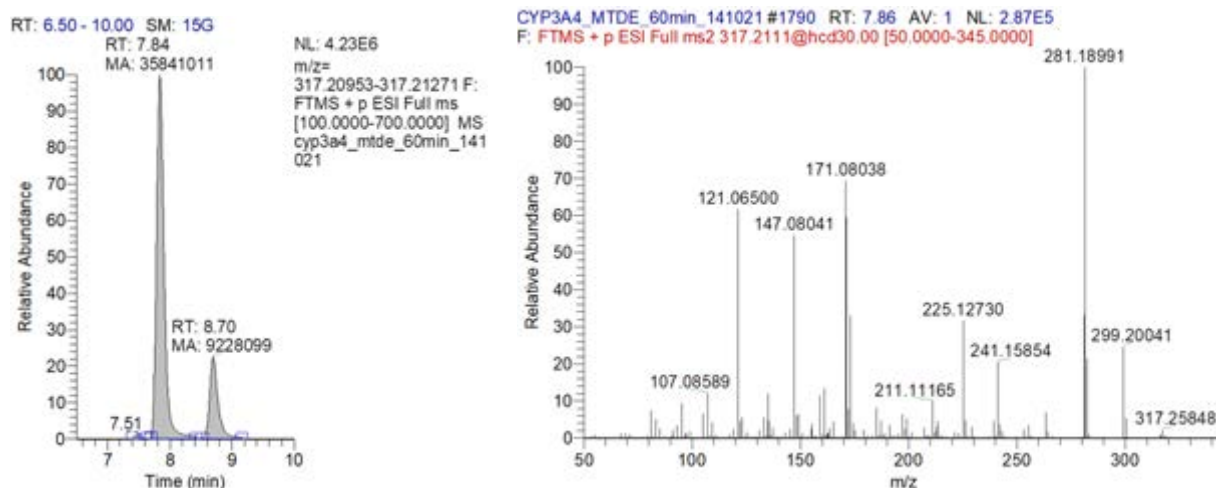
Образование  $\beta$ -гидроксипроизводных метандиенона и оралтуринабола в результате проведения реакций с участием СУР3А4 было подтверждено при сравнении с имеющимися стандартами метаболитов. Подтверждение идентичности продуктов реакций целевым  $\beta$ -гидроксипроизводным станозолола, оксандролона и оксиметолон было получено при



сравнении МС/МС-спектров продуктов реакций гидроксилирования с участием СУР3А4 с МС/МС-спектрами исходных ААС и данными по МС/МС-распаду данных соединений, имеющих в литературе.

На рисунке 5 представлена хроматограмма и МС/МС-спектр моногидроксипроизводных метандиенона, полученных из метандиенона в результате реакции, катализируемой

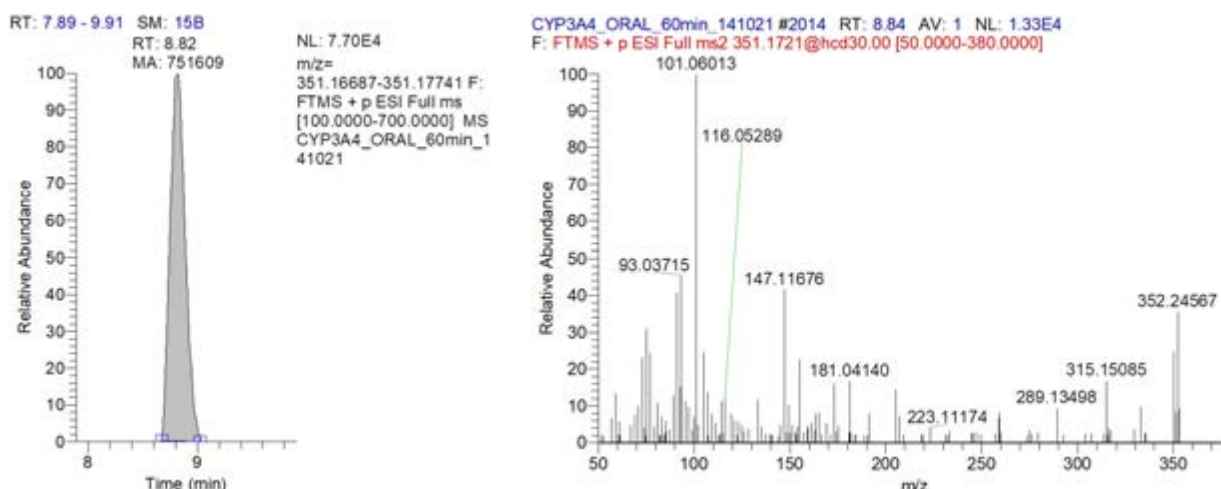
СУР3А4. Продемонстрировано точное совпадение времени удерживания стандарта β-гидроксиметандиенона и одного из метаболитов метандиенона, полученных в результате проведения реакции. Следует отметить, что СУР3А4 катализирует гидроксилирование метандиенона с образованием β-гидроксиметандиенона в качестве основного метаболита.



**Рисунок 5 — Хроматограмма двух моногидроксипроизводных метандиенона (время удерживания β-гидроксиметандиенона — 7,8 мин) и МС/МС-спектр β-гидроксиметандиенона, полученных из метандиенона при протекании реакции с участием ферментативной системы СУР3А4**

На рисунке 6 приведены хроматограмма и МС/МС-спектр β-гидроксиоралтуринабола, полученного из оралтуринабола в результате реакции, катализируемой СУР3А4.

Сходные данные были получены в реакциях гидроксилирования станозолола, оксандролона и оксиметолонна с участием ферментативной системы СУР3А4.



**Рисунок 6 — Хроматограмма и МС/МС-спектр β-гидроксиоралтуринабола, полученного из оралтуринабола при протекании реакции с участием ферментативной системы СУР3А4**

Таким образом, в результате проведенной работы были получены 6 $\beta$ -гидроксипроизводные исследованных в работе синтетических ААС (станозолол, оралтуринабол, метандиенон, оксандролон, оксиметолон). Следует отметить, что для двух из них (метандиенон, оралтуринабол) имеются стандарты 6 $\beta$ -гидроксипроизводных, что позволяет точно оценить их образование в реакции. Так, процентные значения количества метаболитов, образовавшихся в реакции с участием СУР3А4, относительно количества ААС, взятого для проведения реакции (25 нмоль), для 6 $\beta$ -гидроксиметандиенона составило 16 %, для 6 $\beta$ -гидроксиоралтуринабола — 25 %.

**Заключение.** В ходе выполнения работы разработан метод получения 6 $\beta$ -гидроксипроизводных значимых в допинг-контроле ААС с использованием рекомбинантной ферментативной системы СУР3А4 человека и подобраны условия для хроматографического разделения и масс-спектрометрической детекции синтетических ААС и их метаболитов с использованием ВЭЖХ-МС/МС. Была осуществлена постановка реакции гидроксилирования ряда синтетических ААС (станозолол, оралтуринабол, метандиенон, оксандролон, оксиметолон),

различающихся по структурным характеристикам, с участием СУР3А4 и показано образование 6 $\beta$ -гидроксипроизводных данных соединений.

В исследованиях по экскреции ААС с мочой после однократного приема было показано, что 6 $\beta$ -гидроксилирование В-кольца является основным путем метаболизма ААС, в частности для оралтуринабола, метандиенона и станозолола. Однако окно обнаружения данных метаболитов было довольно небольшим — до 5 дней. Следует отметить, что 6 $\beta$ -гидроксипроизводные ААС не являются конечными продуктами метаболизма ААС. Дальнейшие метаболические пути фазы I биотрансформации ААС включают восстановление А-кольца и гидроксилирование по С11-, С12- и С16-положениям. Данные метаболиты обнаруживаются в биологических жидкостях в течение длительного промежутка времени — до 50 дней. В связи с этим исследования, которым посвящена данная статья, являются частью комплексной научно-практической работы по получению долгоживущих метаболитов ААС с участием ферментов семейства цитохромов Р450, в частности гидроксистероид дегидрогеназ и стероидгидроксилаз.

### Список цитированных источников

1. World Anti-Doping Agency. The 2021 prohibited list [Electronic resource]. — Mode of access: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list_en.pdf). — Date of access: 10.05.2022.
2. Anti-doping testing figures report — executive summary. 2020 [Electronic resource]. — Mode of access: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020\\_anti-doping\\_testing\\_figures\\_executive\\_summary\\_final.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020_anti-doping_testing_figures_executive_summary_final.pdf). — Date of access: 10.05.2022.
3. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: a comprehensive review / L. Schiffer [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 2019. — Vol. 194. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105439.
4. Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited / L. Schiffer [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* — 2018. — Vol. 465. — P. 4–26.
5. Sensitivity of GC-EI/MS, GC-EI/MS/MS, LC-ESI/MS/MS, LC-Ag(+) CIS/MS/MS, and GC-ESI/MS/MS for analysis of anabolic steroids in doping control / E. Cha [et al.] // *Drug Test. Anal.* — 2015. — Vol. 7. — P. 1040–1049.
6. Dried urine microsampling coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the analysis of unconjugated anabolic androgenic steroids / M. Protti [et al.] // *Molecules.* — 2020. — Vol. 25. — DOI: 10.3390/molecules25143210.
7. U.S. Food and Drug Administration, Drug development and drug interactions: table of substrates, inhibitors and inducers. 2020 [Electronic resource]. — Mode of access: <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm#4>. — Date of access: 10.05.2022.

## Preparation of 6 $\beta$ -hydroxy derivatives of anabolic steroids using human recombinant CYP3A4 enzyme system for doping control purposes

*Bakakina Y. S.<sup>1</sup>, Babaryko D. V.<sup>1</sup>, Efimovich D. D.<sup>1</sup>, Shkel T. V.<sup>2</sup>, Svirid A. V.<sup>2</sup>, Kisel M. S.<sup>2</sup>, Pakhadnia Y. G.<sup>1</sup>, Gilep A. A.<sup>2</sup>, Syakhovich V. E.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Health Care Institution "National Anti-Doping Laboratory", Lesnoy, Republic of Belarus;*

<sup>2</sup>*The State Scientific Institution "The Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus", Minsk, Republic of Belarus*

The use of anabolic androgenic steroids (AAS) by athletes is the most significant problem in doping control. AAS are almost completely metabolized in the human body as a result of phase I and phase II biotransformation reactions, including the participation of cytochrome P450 (CYP) enzyme family. The presence of standard substances or certified AAS metabolites reference materials is obligatory for determining the spectrum of prohibited substances in the body fluids of athletes. Within the framework of this work, the method for the preparation of 6 $\beta$ -hydroxy derivatives of significant in doping control AAS was developed using human recombinant CYP3A4 enzyme system and parameters for synthetic AAS and their metabolites detection were selected using high-performance liquid chromatography mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

**Keywords:** human recombinant CYP3A4, synthetic anabolic-androgenic steroids, metabolites, liquid chromatography-mass spectrometry.

*Поступила 09.06.2022*

УДК 577.112.389: 616.341

## СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В МИКРОБНО-ТКАНЕВОМ КОМПЛЕКСЕ И ПЕЙЕРОВЫХ БЛЯШКАХ ПОСЛЕ КУРСОВОГО ВВЕДЕНИЯ ТРИПТОФАНА

*Шейбак В. М.<sup>1</sup>, Николаева И. В.<sup>1</sup>, Павлюковец А. Ю.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Республика Беларусь;*

<sup>2</sup>*Государственное учреждение здравоохранения «Гродненский областной центр трансфузиологии», г. Гродно, Республика Беларусь*

**Реферат.** Экзогенное пероральное введение триптофана посредством воздействия на клетки кишечника (энтерохромовые, эндокринные, клетки иммунной системы и др.), а также катаболизируясь микробиотой может оказывать влияние на гомеостаз не только в желудочно-кишечном тракте, но всего организма. Целью исследования явился анализ спектра свободных аминокислот и их азотосодержащих метаболитов в микробно-тканевом комплексе и пейеровых бляшках крыс после курсового введения триптофана. Животным внутрижелудочно вводили триптофан в дозе 40 мг/кг массы в течение 10 дней.

В результате исследования установлено, что курсовое внутрижелудочное введение триптофана не приводит к изменению структуры пула свободных аминокислот в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника и пейеровых бляшках крыс, что свидетельствует о сохранении аминокислотного баланса. Тем не менее, в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника снижались concentra-

ции ряда ключевых для энергетического обмена клеток кишечника свободных аминокислот (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота).

**Ключевые слова:** микробно-тканевой комплекс тонкого кишечника, Пейеровы бляшки, свободные аминокислоты, триптофан.

**Введение.** Кишечный барьер, обеспечивающий первую линию защиты организма от патогенных факторов внешней среды, состоит из кишечной микробиоты, эпителиальных клеток кишечника и иммунных клеток слизистой оболочки, которые тесно связаны через сложную сеть цитокинов, антимикробных пептидов и продуктов метаболизма [1]. Кишечная микробиота включает миллионы микроорганизмов, колонизирующих желудочно-кишечный тракт, большинство из которых являются бактериями. Это большое количество микроорганизмов противостоит негативным факторам внешней среды благодаря их симбиотическим отношениям с организмом человека. Эти симбиотические взаимоотношения хозяина и комменсала развиваются после рождения и обеспечивают метаболические, иммунные и антиинфекционные процессы, посредством которых микробиота способствует гомеостазу кишечника и организма в целом.

Молекулярные методы позволили выявить разнообразную экосистему, содержащую девять бактериальных типов, из которых четыре являются доминирующими: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria и Proteobacteria [2], которые благодаря симбиотическим взаимоотношениям с организмом обеспечивают кишечное доминирование специфических комменсалов («симбионтов»), относящихся к типу Firmicutes и Bacteroidetes или Bifidobacteriales. Симбионты должны конкурировать с патогенными микроорганизмами или потенциальными патогенами («патобионтами») за существующие ранее ниши кишечника («конкуренция ниш»), а также за питательные вещества кишечника («конкуренция питательных веществ»). Это обеспечивает структурную стабильность микробиоты и называется «устойчивостью к колонизации». Для формирования устойчивости к колонизации используется репертуар специфических молекул с критическими антиинфекционными функциями, среди которых молекулы с важной метаболической и антимикробной и сигнальной ролью, такие как короткоцепочечные жирные кислоты, триптофан и его производные, а также бактериоцины.

Микробы-симбионты должны быть приняты иммунологически, тогда как кишечные патогены должны быть устранены. Эта дифференциация требует активации чрезвычайно хо-

рошо скоординированной и эффективной иммунной системы. Микробиота развивает взаимовыгодные отношения с организмом путем взаимодействия с кишечным эпителием и кишечной лимфоидной тканью (GALT). Эти симбиотические отношения облегчаются наличием специфических рецепторов и иммуномодулирующей способностью с помощью антигенных структур, экспонируемых кишечной микробиотой.

Ассоциированная с кишечником лимфоидная ткань включает изолированные или агрегированные лимфоидные фолликулы (бляшки Пейера), внутриэпителиальные лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, брыжеечные ганглии, секреторные клетки IgA (sIgA) и лимфатические клетки. Пейеровы бляшки, локализованные в слизистой и подслизистой оболочках кишечника, покрыты «эпителием, ассоциированным с фолликулами», содержащим специализированные «М-клетки». Эти клетки поглощают и транспортируют антигены из просвета кишечника в кишечные дендритные клетки и Т-клетки. В то же время М-клетки инициируют продуцирование sIgA в слизистой оболочке и гуморальные реакции [3]. Таким образом, Пейеровы бляшки непосредственно опосредуют взаимодействие между кишечной флорой и гуморальным или клеточным иммунным ответом.

Микробно-тканевой комплекс кишечника фактически осуществляет антигенную и метаболическую интеграцию микробиоты кишечника с гомеостазом организма человека — фактор, претендующий на одну из ключевых ролей в патогенезе практически всех заболеваний. Между колониями микроорганизмов и подлежащими структурами имеется тесная структурная и функциональная взаимосвязь, что позволяет их объединить в единый микробно-тканевой комплекс (МТК). Таким образом, МТК образуют: 1) микроколонии бактерий и продуцируемые ими метаболиты; 2) муцины; 3) эпителиальные клетки слизистой оболочки; 4) клетки стромы слизистой оболочки (фибробласты, нейроэндокринные клетки, клетки микроциркуляторного русла). Метаболический, иммунологический и нейрогенный компоненты обеспечивают экзогенные нутриенты и продукты метаболизма и деградации микробиома.



Следовательно, анализ влияния на гомеостаз макроорганизма экзогенных соединений, поступающих через желудочно-кишечный тракт и, возможно, модулирующих состояние иммунной системы, необходимо сочетать с рассмотрением изменений интегральных показателей, характеризующих как состояние МТК, так и GALT, в форме пейеровых бляшек.

Триптофан — незаменимая аминокислота, которая содержится в основном в белковой пище и его доступность во многом зависит от рациона питания. Содержание триптофана в белках и плазме крови ниже, чем остальных 20 протеиногенных аминокислот. Следовательно, доступность триптофана ниже для макроорганизма, чем других аминокислот, и по этой причине, и вследствие наличия своих специфических физико-химических свойств, он играет лимитирующую роль во время синтеза белка. Кроме того, триптофан является предшественником множества биологически активных соединений, включая серотонин, мелатонин, триптамин, хинолиновую кислоту и кинуреновую кислоту, одновременно внося вклад в обеспеченность организма коферментами НАД и НАДФ [4, 5].

В отличие от периферических лимфатических узлов пейеровы бляшки конститутивно формируют ответ на комменсальные микроорганизмы и антигены пищевого происхождения, поглощаемые М-клетками. Пролиферация лимфоцитов и синтез цитокинов требуют адекватного потребления аминокислот из просвета кишечника. Поскольку транспорт триптофана обеспечивают семейства переносчиков, акцептирующих большие нейтральные аминокислоты, остается открытым вопрос о возможном дисбалансе обеспеченности свободными аминокислотами лимфоцитов бляшек в условиях поступления избыточного количества триптофана. Известно, что хотя триптофан хорошо всасывается, его всасывание снижается в присутствии других аминокислот.

С другой стороны катаболиты триптофана могут выполнять иммуномодулирующие функции, например, через кинурениновый или серотониновый пути. Показано, что добавление триптофана к пище не приводило к значительным изменениям концентрации цитокинов в сыворотке. Пероральное введение триптофана в количестве от 1,0 до 5,0 г/сут в течение 21 суток не влияло на потребление пищи, массу тела, общие биомаркеры и аминокислотный состав крови и мочи [6].

Значительная часть триптофана метаболизируется в желудочно-кишечном тракте микро-

биотой кишечника, образующей ряд биологически активных молекул, включая кинуренины и лиганды арилуглеводородного рецептора. Скорость-лимитирующими ферментами в этих процессах являются индоламин-2,3-диоксигеназа-1, а продукция серотонина (5-гидроксиทริปтамин) особенно интенсивно идет в энтерохромаффинных клетках с участием триптофангидроксилазы-1.

Индоламин-2,3-диоксигеназа (ИДО) экспрессируется в некоторых субпопуляциях миелоидных клеток, включая CD11c+, CD8+, дендритные клетки мышей и CD123+ дендритные клетки у человека. Основной функцией ИДО считается подавление микробной инфекции путем снижения доступности триптофана в инфицированной ткани. Экспрессия ИДО в антигенпрезентирующих клетках коррелирует со слабой пролиферацией Т-лимфоцитов, увеличивая апоптоз и ослабляя иммунные ответы *in vivo*. Недостаточность триптофана блокирует активацию Т-лимфоцитов. Триптофан стимулирует фагоцитарную активность макрофагов [7].

Таким образом, экзогенное пероральное введение триптофана посредством воздействия на клетки кишечника (энтерохромаффинные, эндокринные, клетки иммунной системы и др.), а также катаболизируясь микробиотой может оказывать влияние на гомеостаз не только в желудочно-кишечном тракте, но всего организма.

**Цель работы** — анализ спектра свободных аминокислот и их азотосодержащих метаболитов в микробно-тканевом комплексе и пейеровых бляшках крыс после курсового введения триптофана.

**Материалы и методы.** Эксперимент проведен на беспородных белых крысах-самках, массой 120–140 г, при свободном доступе животных к пище и воде. Животные были разделены на 2 группы: 1-я группа (контрольная) — внутрижелудочно в течение 10 дней вводили физраствор; 2-я группа — внутрижелудочно триптофан в дозе 40 мг/кг массы в течение 10 дней. Декапитацию животных осуществляли на 11-е сутки через 24 ч после последнего введения аминокислоты. Все манипуляции с животными проведены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Для анализа использовали безбелковые экстракты микробно-тканевого комплекса кишечника и пейеровых бляшек крыс. Определение свободных аминокислот производили методом обращеннофазной ВЭЖХ с о-фталевым альдегидом и 3-мер-

каптопро-пионовой кислотой с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм). Определение ароматических аминокислот (тирозина и триптофана) проводили методом ион-парной ВЭЖХ с детектированием по природной флуоресценции (280/320 нм для тирозина и 280/340 нм — для триптофана). Все определения проводили с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработка данных — с помощью программы Agilent ChemStation A10.01. Математическая обработка данных проведена с помощью программы Statistica 6.0.

**Результаты и их обсуждение.** Микробно-тканевой комплекс кишечника содержит свободные аминокислоты, которые поступают в клетки из просвета кишечника в процессе рас-

щепления пищевых и эндогенных белков, а также в некоторой степени синтезированные местной микробиотой. Взаимодействие между энтероцитами и микрофлорой (включая ее метаболиты) оказывает определяющее влияние на метаболизм интестинальных клеток и гомеостаз всего организма [9]. Внутривентрикулярное введение животным триптофана снижало в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника содержание протеиногенных аминокислот: аспарагиновой кислоты (на 32,2 %), глутаминовой кислоты (на 23 %), аспарагина (на 18 %) и глицина (на 17 %). Уменьшалось содержание азотосодержащих производных аминокислот — таурина (на 31 %) и  $\alpha$ -аминомасляной кислоты (на 41 %) (таблица 1).

Таблица 1 — Изменения концентраций свободных аминокислот в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника крыс, получавших триптофан (40 мг/кг массы, 10 дней)  $M \pm m$ , нмоль/г.

Исследуемый показатель	Контроль	Триптофан
Аспарагиновая кислота	917 $\pm$ 91	621 $\pm$ 51*
Глутаминовая кислота	1693 $\pm$ 112	1308 $\pm$ 55*
Аспарагин	726 $\pm$ 119	598 $\pm$ 52*
Глицин	4734 $\pm$ 291	3936 $\pm$ 188*
Таурин	4686 $\pm$ 541	3219 $\pm$ 196*
$\alpha$ -аминомасляная кислота	34 $\pm$ 3,7	20 $\pm$ 3,9*

\* Статистически значимо относительно контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

Известно, что большая часть глутамин и почти весь глутамат и аспарат, поступающий в энтероциты, катаболизируется. Слизистая оболочка тонкого кишечника также играет важную роль в утилизации аргинина, пролина и аминокислот с разветвленной цепью, а также глицина и серина, поступающих перорально, только 30–50 % экзогенных аминокислот попадают в портальную вену.

Аминокислоты являются основным источником энергии для слизистой оболочки тонкого кишечника и являются предшественниками

глутатиона, оксида азота, полиаминов, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, а также предшественниками в метаболических циклах (аланин, цитруллин и пролин). Треонин и аргинин являются ключевыми в поддержании целостности слизистой оболочки кишечника.

В пейеровых бляшках уровни протеиногенных аминокислот не изменялись, однако наблюдали повышение уровня цитруллина (в 1,3 раза), снижение концентрации  $\beta$ -аминомасляной (на 16,7 %) и  $\alpha$ -аминомасляной кислот (на 30 %) (таблица 2).

Таблица 2 — Изменений концентраций азотосодержащих метаболитов аминокислот в пейеровых бляшках крыс, получавших триптофан (25 мг/кг, 10 дней)  $M \pm m$ , нмоль/г.

Исследуемый показатель	Контроль	Триптофан
Цитруллин	136 $\pm$ 8,2	169 $\pm$ 12,9*
$\beta$ -аминомасляная кислота	18 $\pm$ 0,9	15 $\pm$ 0,5*
$\alpha$ -аминомасляная кислота	50 $\pm$ 4	35 $\pm$ 5,7*

\* Статистически значимо относительно контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

**Заключение.** Таким образом, в данных экспериментальных условиях курсовое внутриве-

нтривентрикулярное введение триптофана не приводит к изменению структуры пула свободных аминокис-

кислот в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника и пейеровых бляшках крыс, что свидетельствует о сохранении аминокислотного баланса. Тем не менее, в микробно-тканевом комплексе тонкого кишечника снижались концентрации ряда ключевых для энергетического обмена клеток кишечника свободных аминокислот (аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота). Аспарагин и глицин могут быть востребованы в синтезе азотистых оснований, необходимых в процессах пролиферации клеток кишечника.

Известно, что основную часть триптофана, попадающего в ЖКТ утилизирует микробиота кишечника, образуя ряд биологически активных молекул (в основном кинуренины, в

том числе лиганды арилуглеводородного рецептора, а также серотонин). Многие гомеостатически значимые эффекты в метаболических осях кишечник–печень и кишечник–мозг метаболитов триптофана могут быть реализованы путем воздействия на все многообразие клеток кишечника и рецепторы блуждающего нерва. Следовательно, метаболические эффекты аминокислот, в данном случае перорально введенного триптофана, на организм необходимо рассматривать не только как поддержание целостности барьера слизистой оболочки кишечника, нормального функционирования лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой кишечника, но и для гомеостаза организма в целом.

### Список цитированных источников

1. Takiishi, T. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life / T. Takiishi, C. I. M. Fenero, N. O. S. Cvmara // *Tissue Barriers*. — 2017. — Vol. 5, № 4. — P. 13–20.
2. Rajilić-Stojanović, M. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. / M. Rajilić-Stojanović, H. Smidt, W.M. De Vos, // *Environ Microbiol*. — 2007. — Vol. 9. — P. 2125–2136.
3. Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria / D. Rios [et al.] // *Mucosal Immunol*. — 2016. — Vol. 9, № 4. — P.907–916.
4. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration / M. Lesurtel [et al.] // *Science*. — 2006. — Vol. 312. — P. 104–107.
5. Friedman, M. Analysis, Nutrition, and Health Benefits of Tryptophan / M. Friedman // *Int. J. Tryptophan Res*. — 2018. — Vol. 11. — P. 86–91.
6. Wells, G. Investigating the Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review / G. Wells, P. T. Kennedy, L. N. Dahal // *Front. Immunol*. — 2021. — Vol. 12. — P. 651–687.
7. Appleton, J. The Gut-Brain Axis: Influence of Microbiota on Mood and Mental Health / J. Appleton // *Int. Med. (Encinitas)*. — 2018. — Vol. 17, № 4. — P. 28–32.

## Free amino acids in the microbial tissue complex and Peyer's patches after triptofan course introduction

*Sheybak V. M.<sup>1</sup>, Nikolaeva I. V.<sup>1</sup>, Pavlyukovets A. Yu.<sup>2</sup>*

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

<sup>2</sup> *Grodno Regional Center for Transfusiology, Grodno, Republic of Belarus*

The aim of the study was to analyze the spectrum of free amino acids and their nitrogen-containing metabolites in the microbial-tissue complex and Peyer's patches of rats after a course of administration of tryptophan. The animals were intragastrically injected with tryptophan at a dose of 40 mg/kg body weight for 10 days. Course intragastric administration of tryptophan does not lead to a change in the structure of the pool of free amino acids in the microbial-tissue complex of the small intestine and Peyer's patches of rats, which indicates the preservation of the amino acid balance. However, in the microbial-tissue complex of the small intestine, the concentrations of a number of free amino acids key for the energy metabolism of intestinal cells (aspartic acid, glutamic acid) decreased.

**Keywords:** microbial-tissue complex of the small intestine, Peyer's patches, free amino acids, tryptophan.

*Поступила 08.06.2022*

УДК 612.79:[615.28:663.51]

## ХАРАКТЕРИСТИКА ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БЕЗОПАСНОСТИ СПИРТСОДЕРЖАЩИХ СРЕДСТВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ АНТИСЕПТИКИ КОЖИ

Миклис Н. И., Бурак И. И.

Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

**Реферат.** Используемые в практическом здравоохранении антисептики должны быть качественными и эффективными. Целью работы было изучение адекватности композиций спирта этилового 72 % с бриллиантовым зеленым 0,05 %, с йодом кристаллическим 0,25 %, с хлоргексидина биглюконатом 0,1 %, а также спирта этилового 72 % для профилактической антисептики кожи по токсикологическим показателям безопасности. Разработанные композиции спирта этилового 72 % с бриллиантовым зеленым 0,05 %, с йодом кристаллическим 0,25 % визуализируют обрабатываемую кожу, с хлоргексидина биглюконатом 0,1 % — вызывают липкость кожи, по показателям острой токсичности, кожно-раздражающего и кожно-резорбтивного действий в лабораторных условиях являются малоопасными веществами, не обладают кожно-раздражающими и кожно-резорбтивными свойствами, соответствует требованиям СанПиН 21-112-99 и не отличаются от спирта этилового 72 %.

Композиции спирта этилового 72 % с бриллиантовым зеленым 0,05 % и с хлоргексидина биглюконатом 0,1 % в клинико-лабораторных исследованиях на волонтерах в «капельном» и «лоскутном» методах не обладают раздражающим и сенсибилизирующим действием и их можно применять для периодического разового применения и многократного и длительного контакта с кожей. Спирт этиловый 72 % с йодом кристаллическим 0,25 %, не обладающий раздражающим действием в «капельном» методе и вызывающий раздражение кожи у 13,3 % волонтеров в «лоскутном» методе можно применять для периодического разового применения и с осторожностью для многократного и длительного контакта с кожей, особенно у чувствительных лиц.

**Ключевые слова:** спиртосодержащие средства, антисептика, токсикологические показатели, сенсибилизирующая способность.

**Введение.** Для медицинской профилактики инфекционных заболеваний, в том числе инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в организациях здравоохранения широко используются преимущественно для наружного применения антисептические лекарственные препараты, обладающие противомикробным, противовирусным, противопаразитарным и противогрибковым действием. В этом плане проводится гигиеническая и хирургическая антисептика рук, обработка операционного и инъекционного полей антисептическими средствами, разрешенными к применению для этих целей в соответствии с законодательством Республики Беларусь. Для обработки кожи операционного и инъекционного полей рекомендованы антисептические препараты класса А, обработки рук хирургов и других медицинских работников, участвующих в выполнении оперативных и иных инвазивных вмешательств — класса Б, гигиенической обработки кожных покровов — класса В [1].

В качестве антисептических препаратов широко применяется спирт этиловый (СЭ) 70 %, в частности, СЭ 70 %, производимый ОАО «Бобруйский завод биотехнологий» из СЭ ректифицированного марки «Люкс» 96,3 % [2]. СЭ марки «Люкс» получают в процессе ферментативного брожения смеси зерновых культур, картофеля и других пищевых продуктов. Массовая концентрация альдегидов, сивушного масла, эфиров, свободных кислот в указанном спирте составляет десятитысячные доли процента, метилового спирта — 0,03 %. Спирт «Люкс» не содержит фурфурола, органических примесей и является чистым в пробе с серной кислотой. СЭ 70 % при частом нанесении на влажную кожу может вызывать ее раздражение и сухость, при частичном всасывании через кожу приводит к угнетению ЦНС. В последнее время более эффективной считается обработка кожи СЭ 72 % по объему (65 % по массе) [3].

При антисептической обработке кожи в последнее время предпочтение отдается ком-



позиционным (комбинированным) препаратам, в состав которых входят два и более действующих вещества [4], которые при применении обуславливают синергидный аддитивный или потенцирующий эффект и затрудняют выработку резистентности у микробов.

Для создания композиционных препаратов на основе СЭ используются трехатомные и четырехатомные спирты, красители, галогены, гуанидины и другие действующие вещества [3]. Из группы красителей применяется анилиновый краситель трифенилметанового ряда бриллиантовый зеленый (БЗ), галогенов — йод кристаллический (ИК), гуанидинов — хлоргексидина биглюконат (ХБ). В композиционных препаратах антимикробное действие указанных средств усиливается СЭ. Необходимо подчеркнуть, что БЗ из применяемых для антисептической обработки 0,05–2-процентных растворов частично всасывается через кожу, при хорошей визуализации обрабатываемой кожи не сушит ее, стимулирует регенерационные процессы и показан для обработки чувствительной кожи. При нанесении на кожу 0,1–10-процентных йодных растворов ИК испаряется со специфическим запахом и частично всасывается в организм, в концентрациях до 10 % обладает кожно-раздражающими, выше 10 % — дубящими и прижигающими свойствами. Добавление СЭ снижает раздражающее действие ИК. При длительном применении препаратов йода возможно развитие йодизма с насморком, кожными высыпаниями по типу крапивницы, слюнотечением, слезотечением и другими симптомами. ХБ в 0,05–5-процентных концентрациях является эффективным антисептиком вследствие содержания гуанидина и хлора, при нанесении на кожу не всасывается в системный кровоток, медленно испаряется и вызывает липкость кожи [10]. С учетом указанного нами были получены инновационные композиционные поликомпонентные и полиингредиентные средства, содержащие СЭ 72 % марки «Люкс» с бриллиантовым зеленым 0,05 %, с йодом кристаллическим 0,25 %, с хлоргексидина биглюконатом 0,1 %.

Используемые в практическом здравоохранении антисептики должны быть качественными и эффективными. Качество лекарственного препарата — это совокупность его характеристик, обеспечивающая соответствие целевому назначению для медицинского применения, а эффективность — совокупность характеристик, обеспечивающая достижение профилактического, диагностического или лечебного эффекта либо восстановление, коррек-

цию или изменение физиологических функций организма человека. Одним из основных требований к антисептикам является их безопасность при многократном использовании, под которой понимается отсутствие недопустимого риска, связанного с возможностью причинения вреда здоровью человека при соблюдении требований по медицинскому применению, транспортировке и хранению, однако безопасность разработанных средств окончательно не определена.

**Цель работы** — изучение адекватности композиций спирта этилового 72 % с бриллиантовым зеленым 0,05 %, с йодом кристаллическим 0,25 %, с хлоргексидина биглюконатом 0,1 %, а также спирта этилового 72 % для профилактической антисептики кожи по токсикологическим показателям безопасности.

**Материалы и методы.** Работа выполнена в рамках НИР «Разработать и внедрить в Республике Беларусь рациональные методы комплексной терапии наиболее распространенных инфекционных заболеваний» № ГР 20073717, «Разработать эффективные методы диагностики, лечения и профилактики наиболее социально значимых инфекционных заболеваний» № ГР 20130899, «Разработка и совершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных болезней человека» № ГР 20191502 на базе кафедры экологической и профилактической медицины и НИЛ УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (ВГМУ).

Для проведения исследований в соответствии с лабораторными регламентами получали композиционные средства СЭ 72 % с бриллиантовым зеленым 0,05 % (средство 1), с йодом кристаллическим 0,25 % (средство 2), с хлоргексидина биглюконатом 0,1 % (средство 3). В качестве основы композиций испытывали СЭ 72 %, стандартного антисептика — СЭ 70 %. Композиционные средства и спирты характеризовали по химико-аналитическим показателям качества, которые включали органолептические (запах, вкус, цветность, прозрачность), физико-химические (плотность, подлинность, массовая доля действующего вещества) в соответствии с Государственной фармакопеей Республики Беларусь [5]. Так, стандартный СЭ 70 % был подлинным, прозрачным, бесцветным, со специфическим слабым спиртовым запахом без посторонних запахов, плотностью  $0,885 \pm 0,0003$  г/см<sup>3</sup>, содержанием СЭ  $70,2 \pm 0,14$  %, спиртовая основа композиций СЭ 72 % — подлинным, прозрачным, бесцветным, со специфическим слабым

спиртовым запахом, без посторонних запахов, плотностью  $0,880 \pm 0,0004$  г/см<sup>3</sup>, содержанием СЭ  $72,2 \pm 0,13$  %. Средство 1 было подлинным, прозрачным, темно-бирюзового цвета, со специфическим слабым спиртовым запахом без посторонних запахов, плотностью  $0,880 \pm 0,0004$  г/см<sup>3</sup>, содержанием СЭ  $72,2 \pm 0,13$  %, бриллиантового зеленого —  $0,5 \pm 0,02$  г/дм<sup>3</sup>, средство 2 — подлинным, прозрачным, оранжево-коричневого цвета со специфическим слабым спиртовым запахом и слабым запахом йода, плотностью  $0,880 \pm 0,0004$  г/см<sup>3</sup>, содержанием СЭ  $72,2 \pm 0,13$  %, йода кристаллического —  $2,5 \pm 0,1$  г/дм<sup>3</sup>, средство 3 — подлинным, прозрачным, бесцветным, со специфическим слабым спиртовым запахом без посторонних запахов, плотностью  $0,880 \pm 0,0004$  г/см<sup>3</sup>, содержанием СЭ  $72,2 \pm 0,13$  %, хлоргексидина биглюконата —  $1,0 \pm 0,1$  г/дм<sup>3</sup>.

Токсикологические показатели безопасности: острую токсичность композиций — при однократном нанесении, кожно-раздражающее и кожно-резорбтивное действия — при повторных аппликациях определяли на сухой коже хвостов лабораторных белых крыс, гистологическая структура которых близка к коже человека, кожно-раздражающее и sensibilizing действие — на сухой коже человека в клинико-лабораторных исследованиях на волонтерах.

Выполнено две серии опытов. В 1-й серии в лабораторных условиях на подопытных белых крысах-самцах массой  $250 \pm 25$  г, содержащихся в стандартных условиях, определяли острую токсичность композиционных средств при нанесении и втирании стеклянной палочкой легкими массирующими движениями в кожу 2/3 хвостов из расчета 2560 мг/кг массы животного, кожно-раздражающее действие — при повторном 10-кратном нанесении на кожу 2/3 хвостов в течение двух недель по 5 дней в неделю из расчета 20 мг/см<sup>2</sup>, кожно-резорбтивное действие — при повторном 20-кратном погружении в течение четырех недель по 5 раз в неделю 2/3 длины хвостов подопытных животных в пробирочном методе. Ежедневная экспозиция составляла 4 ч. Контрольным крысам в той же дозе наносили и втирали воду очищенную, хвосты контрольных животных погружали в пробирки с водой очищенной.

Наблюдение за опытными и контрольными животными при изучении острой токсичности проводили в течение 8 часов ежедневно после нанесения и в последующие 2 недели

ежедневно утром, кожно-раздражающее действие — через 1, 4 и 16 часов после аппликации в течение 2 недель, кожно-резорбтивное действие — через 4 и 16 часов после каждого эпикутанного воздействия в течение 4 недель, при этом регистрировали общее состояние животных и клинические симптомы интоксикации, а также признаки раздражения кожи хвостов и смертельные эффекты [6]. На время экспозиции по 4 ч крысы находились в специальных индивидуальных домиках с отверстиями для хвостов. Полученные результаты также сравнивали со стандартным СЭ 70 % и основой композиций СЭ 72 %.

Во 2-й серии в клинико-лабораторном исследовании определяли раздражающее и sensibilizing действие на человека указанных композиций в разведении 1:1 методом первичной и вторичной открытой эпикутанной «капельной» пробы и закрытой эпикутанной «лоскутной» (компрессной) пробы на 15 волонтерах соответственно по методике испытания спиртсодержащей продукции парфюмерно-косметической [7]. Волонтеров, не имеющих противопоказаний по состоянию здоровья, добровольно изъявивших согласие на участие в испытаниях и подписавших информированное согласие на основании разрешения этического комитета ВГМУ информировали о сути и потенциальном риске исследований и включали в исследования.

При постановке первичной «капельной» эпикутанной аппликации средства втирали в кожу внутренней поверхности предплечья волонтеров диаметром 2 см в объеме 0,05 см<sup>3</sup> и оставляли до полного высыхания, первичной «лоскутной» — на кожу внутренней поверхности предплечья, предварительно обработанную СЭ 60 %, накладывали марлевый тампон диаметром 2 см с 0,05 см<sup>3</sup> средства под окклюзией (покрытие полиэтиленовой накладкой и фиксация к коже полосками лейкопластыря) и через 1, 24 и 48 ч отмечали наличие и интенсивность эритемы. В контроле использовали воду очищенную. Полученные результаты также сравнивали с СЭ 70 % и СЭ 72 %.

Оценку выраженности эритематозной реакции кожи проводили в соответствии со специальной шкалой, а оценку раздражающего действия средства — по индексу раздражающего действия ( $I_{\text{cut}}$ ) в баллах, который рассчитывали как среднее арифметическое разницы выраженности эритематозной реакции кожи на участке первичной аппликации в опыте и контроле 15 волонтеров с учетом величины дове-

рительной границы  $L$  при уровне вероятности  $p = 0,99$  [7].

При отсутствии субъективных симптомов и объективных признаков раздражающего действия средств после первичной аппликации через 24 ч проводили постановку провокационной (вторичной) эпикутанной аппликации «капельным» и «лоскутным» методами аналогично первичной аппликации, нанося средства на «чистый» участок неповрежденной кожи в 2 см от предыдущей аппликации. В контроле использовали воду очищенную. Сенсибилизирующее действие средств также сравнивали с СЭ 70 % и СЭ 72 %. Провокационную эпикутанную аппликацию снимали через 24 ч, остатки средств с кожи смывали ватным тампоном, смоченным раствором с объемной долей этилового спирта 20 %, и после этого через 1, 24, 48 и 72 ч одновременно на опытных и контрольном кожных участках аппликаций 13 волонтеров визуально регистрировали характер и выраженность объективных кожных симптомов и учитывали выраженность субъективных симптомов сенсибилизирующего действия.

Оценку выраженности объективных кожных и субъективных клинических симптомов сенсибилизирующего действия проводили в соответствии со специальной шкалой, а оценку сенсибилизирующей способности средств — по индексу сенсибилизирующей способности ( $I_s$ ) в баллах, который рассчитывали как среднее арифметическое разницы выраженности объективных кожных и субъективных клинических симптомов сенсибилизирующего действия на участке провокационной аппликации в опыте и контроле 13 волонтеров с учетом величины доверительной границы  $L$  при уровне вероятности  $p = 0,99$  [7].

Полученные результаты исследования обрабатывали статистически с помощью пакета прикладных программ Statistica, Excel, достоверность сдвигов учитывали при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  — среднее арифметическое,  $m$  — стандартная ошибка среднего.

**Результаты и их обсуждение.** В 1-й серии опытов после однократного нанесения на кожу хвостов средств 1–3 из расчета 2560 мг/кг массы животного в течение 8 ч после втирания в кожу, а также в последующие 2 недели наблюдения поведение, внешний вид, наличие аппетита, уровень водопотребления, дефекация, мочеиспускание, степень проявления реакции на внешние раздражители у опытных животных не отличались от контрольных, срыгивание пищи, кровянистые выделения из носа и

глаз, мышечные подергивания, тремор, судороги, парезы, параличи, наркотического и коматозного состояния не отмечалось, частота пульса, окраска ушей, конечностей и глаз не изменялась, все крысы выживали. Эритема, отек, трещины, изъязвления на коже хвостов отсутствовали. Следует отметить, что однократное нанесение на кожу хвостов СЭ 70 % или СЭ 72 % из расчета 2560 мг/кг массы животного также не вызывало признаков отравления и раздражения кожи хвостов, обработанную кожу не визуализировало.

Композиционные средства при повторном 10-кратном нанесении на кожу 2/3 хвостов из расчета 20 мг/см<sup>2</sup> через 1, 4 и 16 ч после аппликации и смыва остатков антисептиков и в последующие 12 дней эксперимента не вызывали изменения общего состояния животных и клинические признаки интоксикации. Эритема, отек, трещины, изъязвления отсутствовали после нанесения всех средств. Кожно-раздражающее действие у СЭ 70 % и СЭ 72 % также не было выявлено.

При повторном 20-кратном погружении по 5 раз в неделю 2/3 длины хвостов в пробирочном опыте в средства 1–3 у подопытных животных через 4 и 16 ч после аппликации и в последующие 4 недели эксперимента клинические признаки интоксикации отсутствовали. На коже хвостов эритема, отек, трещины, изъязвления отсутствовали. Клинические признаки интоксикации и изменения кожи хвостов у подопытных крыс в пробирочном опыте под влиянием СЭ 70 и 72 % также не отмечены. Вместе с тем через 4 ч после погружения хвостов в композиционные средства и спирты у единичных подопытных крыс отмечалось сонливое состояние в отличие от контрольных животных.

Следует подчеркнуть, что во всех опытах средство 1 окрашивало кожу хвостов в бледно-бирюзовый цвет, средство 2 — в бледно-желтый цвет, средство 3 кожу не окрашивало. В отличие от средства 1 и средства 2 СЭ 70 % и СЭ 72 % кожу не визуализировали.

Результаты исследования острой токсичности в 1-й серии опытов позволяют заключить, что композиции 1–3 после однократной эпикутанной аппликации в дозе 2560 мг/кг массы животного, не вызывающие клинические признаки интоксикации и гибель подопытных крыс, относятся к IV классу — вещества малоопасные с  $LD_{50}$  при нанесении на кожу в дозе более 2500 мг/кг в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества.

Классификация и общие требования безопасности». СЭ 73 % и СЭ 70 % по показателям острой токсичности при нанесении на кожу также относятся к малоопасным веществам.

Доказано, что при изучении кожно-раздражающего действия по выраженности раздражающих свойств (эритема 0 баллов, отек — 0 баллов, среднегрупповой суммарный балл выраженности отека и эритемы 0 баллов) при повторном 10-кратном нанесении на кожу хвостов в течение двух недель из расчета 20 мг/см<sup>2</sup> через 1, 4 и 16 ч после аппликации и в последующие 12 дней эксперимента изученные композиционные средства относятся к нулевому классу с отсутствием раздражающего действия. Отсутствие местно-раздражающего действия на кожу в режиме применения 10 аппликаций соответствует требованиям СанПиН 21-112-99 «Нормативные показатели безопасности и эффективности дезинфекционных средств» по токсикологическим показателям безопасности антисептиков. СЭ 72 % и СЭ 70 % также относятся к веществам нулевого класса с отсутствием раздражающего действия.

При исследовании кожно-резорбтивного действия по клиническим признакам интоксикации и изменениям кожи хвостов при повторном 20-кратном погружении по 5 раз в неделю 2/3 длины хвостов в пробирочном опыте через 4 и 16 ч после аппликации и в последующие 4 недели эксперимента средства 1, 2, 3 не обладали кожно-резорбтивными свойствами, вместе с тем сонливость у единичных животных указывает на наличие у изученных средств слабого кожно-резорбтивного действия за счет СЭ.

Результаты определения раздражающего действия средств 1–3 «капельным» методом на 15 волонтерах во 2-й серии показали, что на участках аппликаций средств 1–3 через 1, 24 и 48 ч эритема отсутствовала (0 баллов). У всех волонтеров на опытном участке кожи в период «капельной» аппликационной экспозиции субъективных симптомов раздражающего действия даже слабой переносимой интенсивности не отмечалось и необходимости снимать аппликацию и повторять ее на другом участке кожи не было. У композиционного средства 1 выраженность эритематозной реакции не отличалась в опыте и контроле, разница между ними в баллах у всех волонтеров была равна нулю и индекс раздражающего действия также равнялся нулю ( $I_{cut1} = 0$ ). У средств 2, 3 разница между выраженностью эритематозной реакции в опыте и контроле у всех волонтеров

была равна нулю и индексы раздражающего действия равнялись нулю ( $I_{cut2} = 0$ ;  $I_{cut3} = 0$ ). Доверительная граница L равнялась нулю, и сумма индексов раздражающего действия с величиной доверительной границы у всех средств и спиртов также равнялась нулю ( $I_{cut1} + L = 0$ ;  $I_{cut2} + L = 0$ ;  $I_{cut3} + L = 0$ ).

При изучении раздражающего действия композиционных средств и спиртов «лоскутным» методом на 15 волонтерах установлено, что на участках аппликаций средств 1, 3 через 1, 24 и 48 ч эритема отсутствовала (0 баллов). Выраженность эритематозной реакции у волонтеров не отличалась в опыте и контроле, разница между ними в баллах у всех волонтеров была равна нулю и индексы раздражающего действия равнялись нулю баллов ( $I_{cut1} = 0$ ;  $I_{cut3} = 0$ ). Доверительная граница L равнялась нулю, и сумма индексов раздражающего действия с величиной доверительной границы у средств 1, 3 составила 0 баллов ( $I_{cut1} = 0$ ;  $I_{cut3} = 0$ ).

На опытном участке кожи в период «лоскутной» аппликационной экспозиции средства 2 у двух волонтеров (13,3 %) появились субъективные симптомы слабого раздражающего действия, слабая эритема (1 балл). Поэтому аппликацию немедленно сняли и повторили на другом участке кожи. Субъективные симптомы раздражения и слабая эритема (1 балл) у этих волонтеров появились и при повторной первичной аппликации и их исключили из дальнейших исследований вследствие повышенной чувствительности к данному средству. Индекс раздражающего действия в данном случае равнялся 0,133 балла ( $I_{cut2} = 0,133$ ). Доверительная граница L равнялась 0,426, и сумма индекса раздражающего действия с величиной доверительной границы у средства 2 составила 0,559 баллов ( $I_{cut2} + L = 0,559$ ).

СЭ 70 % и СЭ 72 % также не вызывали объективных кожных и субъективных клинических симптомов в «капельном» и «лоскутном» методах у всех волонтеров, индекс раздражающего действия у них равнялся нулю ( $I_{cut70} = 0$ ;  $I_{cut72} = 0$ ), и сумма индексов раздражающего действия с величиной доверительной границы составила 0 баллов ( $I_{cut70} + L = 0$ ;  $I_{cut72} + L = 0$ ).

Результаты исследования сенсibilизирующей способности композиционного средства 1 «капельным» методом на 13 волонтерах показали, что на участках повторных аппликаций через 1, 24 и 48 ч у волонтеров субъективные (зуд, жжение, болезненность) и объективные (эритема, отек, высыпания, некроз) сим-



птомы отсутствовали, их выраженность не отличалась в опыте и контроле, разница между ними в баллах у всех волонтеров была равна нулю и индекс сенсibilизирующей способности также равнялся нулю ( $I_{s1} = 0$ ). У средств 2, 3 разница между выраженностью объективных кожных и субъективных клинических симптомов в опыте и контроле у всех волонтеров также была равна нулю и индексы сенсibilизирующей способности равнялись нулю ( $I_{s2} = 0$ ;  $I_{s3} = 0$ ). Доверительная граница L равнялась нулю, и сумма индексов сенсibilизирующего действия с величиной доверительной границы составила 0 баллов ( $I_{s2} + L = 0$ ;  $I_{s3} + L = 0$ ).

При определении сенсibilизирующей способности композиционных средств и спиртов «лоскутным» методом на волонтерах выявлено, что на участках повторных аппликаций средств 1, 2, 3 через 1, 24, 48 и 72 ч у волонтеров субъективные (зуд, жжение, болезненность) и объективные (эритема, отек, высыпания, некроз) симптомы отсутствовали, их выраженность не отличалась в опыте и контроле, разница между ними в баллах у всех волонтеров была равна нулю и индексы сенсibilизирующей способности также равнялись нулю ( $I_{s1} = 0$ ;  $I_{s2} = 0$ ;  $I_{s3} = 0$ ). Доверительная граница L равнялась нулю, и сумма индексов сенсibilизирующего действия с величиной доверительной границы составила 0 баллов ( $I_{s1} + L = 0$ ;  $I_{s2} + L = 0$ ;  $I_{s3} + L = 0$ ).

СЭ 70 % и СЭ 72 % также не вызывали объективных кожных и субъективных клинических симптомов в «капельном» и «лоскутном» методах у всех волонтеров, индекс сенсibilизирующей способности у них равнялся нулю ( $I_{s70} = 0$ ;  $I_{s72} = 0$ ), и сумма индексов сенсibilизирующего действия с величиной доверительной границы составила 0 баллов ( $I_{s70} + L = 0$ ;  $I_{s72} + L = 0$ ).

Следует отметить, что в «капельном» и «лоскутном» методах при первичных и провокационных кожных аппликациях средство 1 окрашивало кожу волонтеров в бледно-бирюзовый цвет, средство 2 — в бледно-желтый цвет, средство 3 придавало коже липкость в отличие от СЭ 70 % и СЭ 72 %, которые не визуализировали обрабатываемую кожу.

Результаты исследования 2-й серии опытов позволяют заключить, что композиционные средства и спирты не вызывают видимых изменений кожи и субъективных симптомов при первичном эпикутанном нанесении в «капельном» методе на волонтерах, что указывает на отсутствие у них раздражающего действия при однократном контакте с кожей ( $I_{cut} = 0$  бал-

лов), поскольку значение индексов раздражающего действия у всех средств равнялось нулю, а сумма соответствующих индексов с величиной доверительной границы составила 0 баллов ( $I_{cut} + L = 0$ ). В связи с указанным все изученные композиции и спирты можно использовать для периодического разового применения.

При первичном эпикутанном нанесении в «лоскутном» методе на волонтерах средства 1, 3 и спирты не вызывают видимые изменения кожи и субъективные симптомы, что указывает на отсутствие у них раздражающего действия при многократном контакте с кожей ( $I_{cut} = 0$  баллов), поскольку значение индексов раздражающего действия равнялось нулю, а сумма соответствующих индексов с величиной доверительной границы составила 0 баллов ( $I_{cut} + L = 0$ ). В связи с указанным средства 1, 3, СЭ 72 %, СЭ 70 % можно использовать для многократного и длительного контакта с кожей.

При первичном эпикутанном нанесении в «лоскутном» методе на волонтерах средства 2 у 13,3 % волонтеров отмечалось раздражающее действие при контакте с кожей с индексом раздражающего действия 0,133 балла ( $I_{cut2} = 0,133$ ), а сумма соответствующего индекса с величиной доверительной границы составила 0,559 баллов ( $I_{cut2} + L = 0,559$ ). Поскольку индекс раздражающего действия оказался меньше 1 балла и сумма соответствующего индекса с величиной доверительной границы также меньше 1 балла, средство 2 необходимо использовать для многократного и длительного контакта с кожей с осторожностью, особенно у лиц с повышенной чувствительностью к компонентам средства — йоду кристаллическому.

Композиционные средства 1, 3, СЭ 72 %, СЭ 70 % не вызывали видимые изменения кожи и субъективные симптомы при повторном эпикутанном нанесении в «капельном» и «лоскутном» методах на волонтерах, что указывает на отсутствие у них сенсibilизирующей способности при разовом и многократном контакте с кожей, поскольку значение индексов у всех средств равнялось нулю баллов ( $I_s = 0$ ), и сумма соответствующих индексов с величиной доверительной границы составила 0 баллов ( $I_s + L = 0$ ). В связи с изложенным их можно использовать для периодического разового применения и многократного и длительного контакта с кожей без вероятности побочных аллергических реакций и шока. Средство 2, вызывающее раздражение кожи у 13,3 % волонтеров при первичной аппликации, для много-

кратного и длительного контакта с кожей следует применять с осторожностью.

Следует отметить, что окрашивающие кожу средства 1 и 2 целесообразно использовать для обработки кожи операционного поля, а не визуализирующие обрабатываемую кожу средство 3, СЭ 72 % и СЭ 70 % — для обработки кожи инъекционного поля, гигиенической и хирургической антисептики рук медицинских работников.

**Заключение.** На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Спирт этиловый 72 % не отличается от спирта этилового 70 % по токсикологическим показателям безопасности (острая токсичность, кожно-раздражающее действие, кожно-резорбтивное действие) в лабораторных условиях на белых крысах-самцах, относится к IV классу — вещества малоопасные с ЛД<sub>50</sub> при нанесении на кожу в дозе более 2500 мг/кг, по выраженности раздражающих свойств при повторном 10-кратном нанесении на кожу хвостов — к нулевому классу с отсутствием раздражающего действия, по выраженности кожно-резорбтивного действия при повторном 20-кратном погружении хвостов — к веществам, не обладающим кожно-резорбтивными свойствами в плане интоксикации и изменения кожи хвостов, соответствует требованиям Сан-ПиН 21-112-99 по токсикологическим показателям безопасности антисептиков. Он также не обладает раздражающим действием и сенсибилизирующей способностью в клинико-лабораторных исследованиях на волонтерах, является безопасным и может быть использован вместо спирта этилового 70 % для периодического разового применения и многократного и длительного контакта с кожей.

2. Разработанные композиции спирта этилового 72 % с бриллиантовым зеленым 0,05 %, с йодом кристаллическим 0,25 % визуализируют обрабатываемую кожу, с хлоргексидина биглюконатом 0,1 % — вызывают липкость кожи, по показателям острой токсичности, кожно-раздражающего и кожно-резорбтивного действия в лабораторных условиях являются ма-

лоопасными веществами, не обладают кожно-раздражающими и кожно-резорбтивными свойствами, соответствует требованиям Сан-ПиН 21-112-99 и не отличаются от спирта этилового 72 %.

Композиции спирта этилового 72 % с бриллиантовым зеленым 0,05 %, с хлоргексидина биглюконатом 0,1 % в клинико-лабораторных исследованиях на волонтерах в «капельном» и «лоскутном» методах не обладают раздражающим действием и их можно применять для периодического разового применения и многократного и длительного контакта с кожей. Спирт этиловый 72 % с йодом кристаллическим 0,25 %, не обладающий раздражающим действием в «капельном» методе и вызывающий раздражение кожи у 13,3 % волонтеров в «лоскутном» методе можно применять для периодического разового применения и с осторожностью для многократного и длительного контакта с кожей, особенно у чувствительных лиц.

3. Композиции спирта этилового 72 % с бриллиантовым зеленым 0,05 %, с хлоргексидина биглюконатом 0,1 % в клинико-лабораторных исследованиях на волонтерах не обладают сенсибилизирующими свойствами в «капельном» и «лоскутном» методах и их можно использовать для однократной и многократной обработки кожи без вероятности возникновения побочных аллергических реакций.

4. Спирт этиловый 72 % с бриллиантовым зеленым 0,05 % как средство, визуализирующее кожу, можно рекомендовать для периодической разовой антисептики операционного поля, спирт этиловый 72 % с хлоргексидина биглюконатом 0,1 %, а также спирт этиловый 72 % — для многократной обработки инъекционного поля, гигиенической и хирургической антисептики рук медицинского персонала. Спирт этиловый 72 % с йодом кристаллическим 0,25 % можно применять для разовой обработки операционного поля и с осторожностью для многократной обработки инъекционного поля, гигиенической и хирургической антисептики рук медицинского персонала, особенно у чувствительных лиц.

### Список цитированных источников

1. Методы лабораторных исследований и испытаний медико-профилактических дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство. — М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. — 615 с.

2. Инструкция по применению лекарственного средства «Этанол, раствор для наружного применения, 70 % во флаконах 100 мл, в бутылках 500 мл, 1000 мл»: утв. М-вом здравоохран. Респ. Беларусь 8 июля 2009 г. / И. И. Бурак [и др.] // УО «Витебский государственный медицинский университет», ОАО «Бобруйский завод биотехнологий». — Минск, 2009. — 10 с.

3. Шестопапов, Н. В. Антимикробная активность и минимальные эффективные концентрации химических соединений, входящих в состав дезинфекционных средств / Н. В. Шестопапов, Л. С. Фёдорова, А. Ю. Скопин // Гигиена и санитария. — 2019. — № 98 (10). — С. 1031–1036.

4. Федеральные клинические рекомендации по выбору химических средств дезинфекции и стерилизации для использования в медицинских организациях / Н. В. Шестопапов [и др.]. — М., 2015. — 67 с.

5. Государственная фармакопея Республики Беларусь: разработана на основе Европ. Фармакопеи : в 2 т. / под общ. ред. А. А. Шерякова. — Молодечно : Победа, 2012. — Т. 1: Общие методы контроля качества лекарственных средств. — 1220 с.

6. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ : инстр. 1.1.11-12-35-2004, утв. пост. Гл. гос. сан. врача Респ. Беларусь 14.12.2004, № 131. — Минск, 2004. — 41 с.

7. Продукция парфюмерно-косметическая. Методы определения и оценки клинико-лабораторных показателей безопасности : ГОСТ 33483-2015. — Введ. 01.09.2016. — Минск: Белорус. гос. нн-т стандартизации и сертификации, 2016. — 16 с.

## Characteristics of toxicological safety indicators of alcohol-containing medicines for preventive skin antisepsis

*Miklis N. I., Burak I. I.*

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

Antiseptics used in practical health care must be of high quality and effective. The purpose of this work was to study the adequacy of the compositions of ethyl alcohol 72 % with brilliant green 0.05 %, with crystalline iodine 0.25 %, with chlorhexidine bigluconate 0.1 %, as well as ethyl alcohol 72 % for preventive skin antisepsis in terms of toxicological safety indicators. The developed compositions of ethyl alcohol 72 % with brilliant green 0.05 %, with crystalline iodine 0.25 % visualize the treated skin, with chlorhexidine bigluconate 0.1 % — cause stickiness of the skin, in terms of acute toxicity, skin-irritating and skin-resorptive effect in laboratory conditions, they are low-hazard substances, do not have skin-irritating and skin-resorptive properties, meet the requirements of Sanitary rules 21-112-99 and do not differ from ethyl alcohol 72 %.

Compositions of ethyl alcohol (72 %) with brilliant green (0.05 %) and chlorhexidine bigluconate 0.1 % in clinical and laboratory studies on volunteers do not have an irritating and sensitizing effect and can be used for periodic single usage and multiple and prolonged skin contact. Ethyl alcohol (72 %) with crystalline iodine (0.25 %), which does not have an irritating effect in the “drip” method and causes skin irritation in 13.3 % of volunteers in the “patchwork” method can be used for periodic single usage and with caution for repeated and prolonged contact with the skin, especially in sensitive persons.

**Keywords:** alcohol-containing agents, antiseptics, toxicological indicators, sensitizing ability.

*Поступила 01.06.2022*



## Содержание

### ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА – МЕДИЦИНЕ

<b>ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАСНОГО И СИНЕГО СПЕКТРАЛЬНЫХ ДИАПАЗОНОВ В ПРИСУТСТВИИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА «ФОТОЛОН» НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК HeLa</b> <i>Церковский Д. А., Александрова Е. Н., Протопович Е. Л., Шелкович С. Е., Швец Е. В., Литвинова Т. М.</i> .....	8
<b>ВЛИЯНИЕ ГЕННОГО ПОЛИМОРФИЗМА НА РАЗВИТИЕ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ</b> <i>Медведева Л. М., Королькова Н. К., Яроцкая Н. Н.</i> .....	14
<b>ВЫЯВЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ПРИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ У ЖИТЕЛЕЙ ГОМЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ</b> <i>Суханова Л. Л., Калинин А. Л., Яцук М. Н.</i> .....	19
<b>ДИПЕПТИД Pro-Gly ОБЛЕГЧАЕТ АДАПТИВНУЮ РЕАКЦИЮ У КРЫС W1STAR, ПОДВЕРГШИХСЯ ДЕПРИВАЦИИ ПАРАДОКСАЛЬНОЙ ФАЗЫ СНА</b> <i>Кравченко Е. В., Саванец О. Н., Бизунок Н. А., Дубовик Б. В.</i> .....	25
<b>ЗНАЧИМОСТЬ АКТИВНОСТИ <math>\alpha</math>1-АНТИТРИПСИНА КРОВИ В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ, МЕХАНИЗМАХ ПОДДЕРЖАНИЯ ТЕМПЕРАТУРНОГО ГОМЕОСТАЗА И ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА ПРИ ПЕРЕГРЕВАНИИ</b> <i>Висмонт Ф. И., Жадан С. А., Висмонт А. Ф., Шуст Л. Г., Ткаченко Н. В., Яковлев Ф. Д., Абакумова Т. В.</i> .....	30
<b>КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ РЕЦЕПТОРА CD44v6, HIF-1<math>\alpha</math> И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО</b> <i>Мурашко Д. И., Таганович А. Д., Ковганко Н. Н., Можяева А. А.</i> .....	37
<b>МЕТОДИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ВЫЯВЛЕНИЮ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРЕДИКТОРОВ СУИЦИДАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ</b> <i>Глинкина Т. В., Костюк С. А., Давидовский С. В., Ибрагимова Ж. А., Руденкова Т. В., Полуян О. С., Костюк Д. Д., Марчук С. И.</i> .....	44
<b>МОДЕЛИРОВАНИЕ ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ</b> <i>Матлакова М. А., Павлов К. И., Метелица Т. Г., Курклинская Г. А., Наборовская А. М., Хватова Л. А., Кундельская Л. М., Чегодаева Е. В.</i> .....	50
<b>МОДЕЛИРОВАНИЕ ХИРУРГИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЙ ПРИ БОЛЕЗНИ ГИРШПРУНГА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИХ НЕДОСТАТКОВ</b> <i>Новицкая С. К., Дегтярев Ю. Г.</i> .....	58
<b>МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕОАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ В СТЕНТИРОВАННЫХ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЯХ</b> <i>Владимирская Т. Э., Адзерицо И. Э., Швед И. А., Михневич Д. Л., Жилкевич А. В.</i> .....	64



<b>МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТенок ВНУТРЕННИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ИЗВИТОСТИ</b> <i>Трисветова Е. Л., Апинон О. В., Юдина О. А.</i> .....	69
<b>МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ СТЕНКИ АОРТЫ У ЛИЦ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА</b> <i>Валуженич Я. И., Юдина О. А., Рудой А. С.</i> .....	75
<b>НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ЛОВУШКИ КОЖИ КРЫС ПРИ НОРМОТЕРМИИ И ОБЩЕЙ ГЛУБОКОЙ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ГИПОТЕРМИИ</b> <i>Мяделец О. Д., Мяделец Н. Я.</i> .....	80
<b>ОБ УЧАСТИИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ И КЛЕТОК КУПФЕРА В РЕГУЛЯЦИИ СОДЕРЖАНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА В ПЕЧЕНИ И ЛИПОПРОТЕИНАХ КРОВИ, УРОВНЯ ЙОДСОДЕРЖАЩИХ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПЕРИТОНИТОМ</b> <i>Чепелева Е. Н., Висмонт Ф. И.</i> .....	87
<b>ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КРОВИИ ЕЕ КОМПОНЕНТОВ: КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ</b> <i>Лямцева А. К., Костюк С. А., Жевнеронок И. В., Полуян О. С., Руденкова Т. В., Глинкина Т. В.</i> .....	95
<b>ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СОЧЕТАНИЙ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ CYP1A2 И CYP2D6 НА ФОРМИРОВАНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ТИПА ОПУХОЛИ И НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ЛЕГКОГО</b> <i>Шепетько М. Н., Карапетян Г. М., Косик И. И., Ермаков В. В., Шевчук Т. А., Захарова В. А.</i> ...	101
<b>ОЦЕНКА РЕЦЕПТОРНОГО АППАРАТА ЛИМФОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ ПРИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ С МИКРООРГАНИЗМАМИ</b> <i>Тонко О. В., Нижегородова Д. Б., Коломиец Н. Д., Ханенко О. Н.</i> .....	107
<b>СОДЕРЖАНИЕ МОНООКСИДА АЗОТА И КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПОКСИИ/РЕОКСИГЕНАЦИИ</b> <i>Акулич Н. В., Походня Ю. Г., Костин Д. Г., Сяхович В. Э., Зинчук В. В.</i> .....	115
<b>СОДЕРЖАНИЕ СЫВОРОТОЧНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ПЛАЗМОКЛЕТОЧНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ</b> <i>Козич Ж. М., Мартинков В. Н., Пугачева Ж. Н., Коротаева Л. Е., Близин Д. А., Климкович Н. Н.</i> .....	122
<b>СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОСТНОГО ВОЗРАСТА</b> <i>Багинский В. А., Денисов С. Д.</i> .....	129
<b>ТОПОГРАФИЧЕСКАЯ АНАТОМИЯ И МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАРУЖНЫХ И ВНУТРЕННИХ СОСЦЕВИДНЫХ ОТВЕРСТИЙ</b> <i>Татур А. А., Денисов С. Д., Лёвина Д. И.</i> .....	136
<b>ТРЕХЭТАПНАЯ МОДЕЛЬ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ФЕТАЛЬНОЙ МАКРОСОМИИ</b> <i>Виктор С. А., Курлович И. В., Ващилина Т. П., Прилуцкая В. А.</i> .....	143
<b>УРОВЕНЬ РЕЦЕПТОРОВ ЛЕЙКОЦИТОВ И ИХ ЛИГАНДОВ В ДИАГНОСТИКЕ АДЕНОКАРЦИНОМЫ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО</b> <i>Мурашко Д. И., Таганович А. Д., Ковганко Н. Н.</i> .....	152



**УЧАСТИЕ М-ХОЛИНОРЕАКТИВНЫХ СИСТЕМ В РЕАЛИЗАЦИИ  
КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ  
С ПОМОЩЬЮ L-ЛАКТАТА ПРИ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ МИОКАРДА  
У МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС**

*Чепелев С. Н., Висмонт Ф. И., Губкин С. В., Висмонт А. Ф., Юшкевич П. Ф. ....* 163

**ЭКСПРЕССИЯ CD106 И КОИНГИБИТОРНЫХ МОЛЕКУЛ CD273, CD274, CD276  
НА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ПЛАЦЕНТЫ**

*Лях Е. Г., Шитикова М. Г., Исайкина Я. И., Новикова М. А. ....* 170

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ  
НАНОЧАСТИЦ УГЛЕРОДА УДАЛЯТЬ БИЛИРУБИН ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

*Макаревич Д. А., Рябцева Т. В., Ковганко Н. Н., Жалейко Г. А., Штемплук Р. Г. ....* 176

**ФАРМАЦИЯ**

**АНТИГИПОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗОХИНОНА  
В УСЛОВИЯХ ГИПЕРКАПНИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ**

*Рашкевич О. С., Волчек А. В. ....* 184

**ВЛИЯНИЕ 1,4-БЕНЗОХИНОНА И ТИМОХИНОНА НА КАРРАГЕНИНОВОЕ  
ВОСПАЛЕНИЕ У МЫШЕЙ**

*Рашкевич О. С., Волчек А. В. ....* 189

**ВОЗМОЖНОСТИ ФОТОИНДУЦИРОВАННОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ  
В ХИРУРГИИ СУХОЖИЛИЙ СГИБАТЕЛЕЙ ПАЛЬЦЕВ КИСТИ**

*Титова А. Д., Волотовский А. И., Довгалевиц И. И., Людчик А. В. ....* 195

**ИССЛЕДОВАНИЕ IN SILICO ЗАВИСИМОСТИ СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ  
ОКСАЗОЛИДИНОВ В ПОИСКЕ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ  
СРЕДСТВ**

*Лахвич Ф. Ф., Борова М. И., Ринейская О.Н. ....* 200

**ИССЛЕДОВАНИЕ ХРОНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ НОВЫХ АНАЛОГОВ АРГИНИН-  
ВАЗОПРЕССИНА**

*Саванец О. Н., Кравченко Е. В., Ольгомец Л. М., Пилюцкая А. А., Бородина К. В.,  
Пустюльга Е. С., Голубович В. П., Бизунок Н. А. ....* 205

**ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ  
СУБСТАНЦИИ АЗИТРОМИЦИН В ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

*Зиновкина В. Ю., Богданов Р. В., Василькевич В. М., Земцова В. О. ....* 210

**ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИКЛОФОСФАМИДА  
И ЗОЛЕДРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПОДОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

*Лепешко П. Н., Соболь Ю. А., Семёнов И. П. ....* 216

**ОБОСНОВАНИЕ КЛАССА ОПАСНОСТИ И ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ  
КОНЦЕНТРАЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ СУБСТАНЦИИ БЕТАГИСТИНА  
ДИГИДРОХЛОРИД В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ И АТМОСФЕРЫ**

*Гапанович В. Н., Власенко Е. К., Карпенко Е. А., Андреев С. В., Бердина Е. Л.,  
Климович О. М., Мельник Д. К., Бартош М. А., Васильева Е. Н. ....* 222

<b>ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ СРЕДСТВ С АНТИМИЕЛОМНОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ ТАЛИДОМИДА ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА</b>	
<i>Ринейская О. Н., Баньковский А. А. ....</i>	228
<b>ПОЛУЧЕНИЕ 6<math>\beta</math>-ГИДРОКСИПРОИЗВОДНЫХ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ СИСТЕМЫ СУРЗА4 ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ДОПИНГ-КОНТРОЛЯ</b>	
<i>Бакакина Ю. С., Бабарико Д. В., Ефимович Д. Д., Шкель Т. В., Свирид А. В., Кисель М. С., Походня Ю. Г., Гилеп А. А., Сяхович В. Э. ....</i>	235
<b>СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В МИКРОБНО-ТКАНЕВОМ КОМПЛЕКСЕ И ПЕЙЕРОВЫХ БЛЯШКАХ ПОСЛЕ КУРСОВОГО ВВЕДЕНИЯ ТРИПТОФАНА</b>	
<i>Шейбак В. М., Николаева И. В., Павлюковец А. Ю. ....</i>	243
<b>ХАРАКТЕРИСТИКА ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БЕЗОПАСНОСТИ СПИРТСОДЕРЖАЩИХ СРЕДСТВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ АНТИСЕПТИКИ КОЖИ</b>	
<i>Миклис Н. И., Бурак И. И. ....</i>	248

Научное издание

**БГМУ**  
в авангарде медицинской  
науки и практики

Рецензируемый ежегодный сборник научных трудов

Выпуск 12

Том 2

Редакторы: *В. А. Захарычева* (тексты на русском языке),  
канд. хим. наук, доц. *Ф. Ф. Лахвич* (тексты на английском языке)  
Дизайн обложки *Н. П. Засулевич*  
Компьютерная верстка *Е. А. Титовой, Н. П. Засулевич*

Подписано в печать 23.11.2022. Формат 60×84/8.  
Бумага офсетная. Печать цифровая.  
Усл. печ. л. 30,23. Уч.-изд. л. 20,22. Тираж 115 экз. Заказ 536.

Республиканское унитарное предприятие  
«Информационно-вычислительный центр  
Министерства финансов Республики Беларусь».  
Свидетельства о государственной регистрации издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий  
№ 1/161 от 27.01.2014, № 2/41 от 29.01.2014.  
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.



