

ISSN 2519-2124

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ

«БЕЛАРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»



ВЫПУСК 14 ТОМ 2



БГМУ

В АВАНГАРДЕ МЕДИЦИНСКОЙ
НАУКИ И ПРАКТИКИ

МИНСК
2024

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

БГМУ
в авангарде медицинской науки
и практики

Рецензируемый ежегодный сборник
научных трудов

Выпуск 14

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,
профессора В. А. Филонюка

В двух томах

Том 2

Минск
2024

УДК 61(082)

ББК 5я43

Б34

БГМУ в авангарде медицинской науки и практики : рецензир. ежегод. сб. науч. тр. : в 2 т. / М-во здра- воохр. Респ. Беларусь, Бел. гос. мед. ун-т ; под ред. С. П. Рубниковича, В. А. Филонюка. – Минск : БГМУ 2024. – Вып. 14. – Т. 2: Профилактическая медицина. Фармация. Фундаментальная наука – медицина. – 270 с.

В сборнике представлены результаты многочисленных клинических и экспериментальных исследований и наблюдений, проводимых в БГМУ, других государственных медицинских, фармацевтических научных организациях Республики Беларусь 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, проф. В. А. Филонюк;
секретарь редакции – канд. хим. наук, доц. Ф. Ф. Лахвич

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. Волотовский; д-р мед. наук, проф. Ю. М. Гайн; д-р мед. наук, проф. В. Н. Гапанович; чл.-корр. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. М. А. Герасименко; д-р биол. наук, проф. Н. С. Гурина; д-р мед. наук, проф. Т. А. Имшенецкая; 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. В. С. Камышников; д-р мед. наук, проф. Н. Д. Коломиец; канд. хим. наук, доц. Ф. Ф. Лахвич; 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. М. С. Пристром; д-р мед. наук, проф. А. В. Прохоров; д-р мед. наук, проф. М. И. Римжа; д-р мед. наук, проф. О. Н. Романова; канд. мед. наук, проф. И. В. Романовский; акад. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. О. О. Руммо; д-р мед. наук, проф. О. А. Скугаревский; д-р мед. наук, проф. А. В. Солнцева; д-р биол. наук, проф. А. Н. Стожаров; д-р мед. наук, проф. В. В. Строгий; д-р мед. наук, проф. А. Д. Таганович; акад. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. С. И. Третьяк; д-р мед. наук, проф. А. С. Федулов; д-р биол. наук, доц. В. В. Хрусталев; д-р фарм. наук, проф. В. М. Царенков; канд. мед. наук, доц. Т. Л. Шевела; канд. мед. наук, доц. И. П. Щербинская

Рецензенты:

д-р мед. наук, проф. В. И. Аверин, д-р мед. наук, проф. С. А. Алексеев, канд. мед. наук, доц. Н. Л. Бацукова, д-р мед. наук, доц. А. В. Борисов, канд. мед. наук, доц. Т. С. Борисова, д-р мед. наук, доц. И. И. Бураков, канд. мед. наук, доц. И. Н. Вальчук, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Беларуси Ф. И. Висмонт, д-р мед. наук, проф. А. В. Волотовский, канд. мед. наук, доц. Н. В. Галькевич, д-р мед. наук, проф. М. Л. Доценко, д-р мед. наук, проф. Э. А. Доценко, канд. мед. наук, доц. С. А. Жадан, канд. мед. наук, доц. И. В. Жевнеронок, д-р мед. наук, доц. А. Г. Кадушкин, канд. мед. наук, доц. Т. А. Канацкова, канд. мед. наук, доц. С. В. Катацевич, д-р мед. наук, доц. Д. А. Клийко, канд. хим. наук, доц. О. Ф. Краецкая, д-р мед. наук, проф., акад. НАН Беларуси С. А. Красный, канд. мед. наук Э. Н. Кучук, канд. хим. наук, доц. Ф. Ф. Лахвич, канд. мед. наук, доц. Т. А. Летковская, канд. фарм. наук, доц. Р. И. Лукашов, канд. мед. наук, доц. С. В. Михалюк, д-р мед. наук, проф. Л. Ф. Можейко, д-р мед. наук, проф. Т. В. Мохорт, канд. фарм. наук, доц. О. В. Мушкина, канд. мед. наук, доц. Т. П. Павлович, канд. мед. наук, доц. И. И. Паюк, канд. мед. наук, доц. Е. В. Перевезева, канд. мед. наук, доц. Е. Б. Петрова, д-р мед. наук, проф. И. О. Походенько-Чудакова, д-р мед. наук, проф. А. В. Прохоров, д-р мед. наук, проф. О. Н. Романова, канд. мед. наук, доц. И. П. Семёнов, канд. фарм. наук, доц. О. Г. Сечко, канд. мед. наук, доц. Т. В. Статкевич, канд. мед. наук Е. В. Тихонович, канд. мед. наук, доц. Е. К. Филиппович, д-р мед. наук, проф. В. А. Филонюк, д-р биол. наук, проф. В. В. Хрусталёв, д-р мед. наук, проф. В. Я. Хрыщанович, канд. биол. наук, доц. Ж. Ф. Циркунова, канд. мед. наук С. Н. Чепелев, д-р мед. наук, проф. Н. В. Шаковец

Ответственный за выпуск – В. А. Филонюк

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 14

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., prof. V. A. Filanyuk

In two volumes

Volume 2

Minsk
2024

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. A. Filanyuk, MD, Ph.D. DSc., prof.;
Executive Secretary – F. F. Lakhvich, Ph.D., Associate prof.

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. Volotovski, MD, Ph.D. DSc., prof.; Y. M. Gayin, MD, Ph.D. DSc., prof.; V. N. Gapanovic, MD, Ph.D. DSc., prof.; M. A. Gerasimenko, Corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, MD, Ph.D. DSc., prof.; N. S. Gurina, Ph.D. DSc., prof.; T. A. Imshenetskaya, MD, 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.; V. S. Kamyshnikov, MD, Ph.D. DSc., prof.; N. D. Kolomiets, MD, Ph.D. DSc., prof.; T. T. Lakhvich, Ph.D., Associate 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.; M. S. Pristrom, MD, Ph.D. DSc., prof.; M. I. Rimzha, MD, Ph.D. DSc., prof.; O. N. Romanova, MD, Ph.D. DSc., prof.; I. V. Romanovsky, MD, Ph.D., prof.; O. O. Rummo, academician of the National Academy of Sciences of Belarus, MD, Ph.D. DSc., prof.; O. A. Skugarevsky, MD, Ph.D. DSc., prof.; A. V. Solntseva, MD, Ph.D. DSc., prof.; A. N. Stozharov, MD, Ph.D. DSc., prof.; V. V. Strogiy, 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.; A. S. Fedulov, MD, Ph.D. DSc., prof.; V. V. Khrustalev, MD, Ph.D., DSc., Associate prof.; V. M. Tsarenkov, MD, Ph.D. DSc., prof.; T. L. Shevela, Ph.D., Associate prof.; I. P. Shcherbinskaja, Ph.D., Associate prof.

Issue editor – V. A. Filanyuk

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.





Ректор учреждения образования
«Белорусский государственный
медицинский университет»
член-корреспондент Национальной академии
наук Беларуси, доктор медицинских наук,
профессор С. П. Рубникович

Развитие исследований в области медицины, фармации и смежных наук является важнейшей составляющей для построения эффективного социально ориентированного государства. Президент Республики Беларусь А. Г. Лукашенко, выступая на торжественной церемонии закладки капсулы на месте строительства новой гродненской городской больницы в апреле 2024 года, перед Министром здравоохранения А. В. Ходжаевым поставил задачу: «...Надо сделать медицину, как у нас раньше говорили, народной. Всем доступно, одинаково!». Выполнение этой задачи невозможно без разработки новых технологий в области практической медицины, рационального дизайна лекарственных средств и поиска экономически обоснованных подходов к синтезу импортозамещающих препаратов, развития системы превентивной медицины и обеспечения эффективного мониторинга качества среды обитания человека.

Сотрудники Белорусского государственного медицинского университета на протяжении более 100 лет активно участвуют в проведении фундаментальных и практико-ориентированных исследований в области медико-биологических и фармацевтических наук.

Признанием их заслуг является избрание ведущих ученых БГМУ академиками и членами-корреспондентами Национальной академии наук Беларуси и иностранных академий. Но главное — это благодарность пациентов, жителей Беларуси и гостей нашей страны, которые получили шанс на здоровье и достойное качество жизни благодаря применению новых методов лечения, фундамент которых — разработки ученых нашего университета.

2024 год стал годом формирования новой структуры университета: реорганизация Белорусской академии последипломного образования путем включения ее подразделений в состав БГМУ стала мощным толчком для интенсификации научных исследований в области медицины и фармации. БГМУ и БелМАПО всегда сотрудничали для достижения наилучших результатов исследований, но объединение двух организаций дало новый импульс и отмечено ростом числа совместных научно-исследовательских проектов и публикаций их результатов. Сборник научных трудов «БГМУ в авангарде медицинской науки и практики» на протяжении многих лет освещает результаты исследований не только сотрудников БГМУ, но и ученых других белорусских университетов, Национальной академии наук Беларуси, а также врачей-специалистов организаций здравоохранения.

В сборнике неоднократно печатались статьи с участием зарубежных ученых.

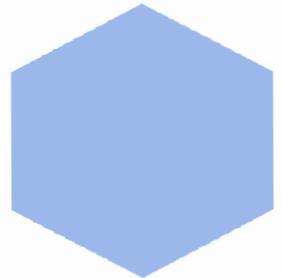
Он привлекает авторов возможностью опубликовать результаты исследований, которые проводятся на стыке научных областей: фундаментальной, прикладной и превентивной медицины, фармации, биологии, химии... Признанием значимости сборника является его включение в Перечень изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Беларусь для опубликования результатов докторских исследований по медицинской отрасли наук. Но, что еще более важно, именно такой междисциплинарный подход может обеспечить прорыв в поиске новых высокоеффективных методов оказания медицинской помощи и сделать отечественную медицину одинаково доступной для каждого гражданина нашей страны, истинно народной, как об этом говорил Президент Республики Беларусь. БГМУ и далее будет проводить самые современные исследования в области медицины, фармации и смежных наук, являясь центром притяжения и консолидации ученых и практиков со всей Беларуси, чтобы создать условия для повышения качества и доступности медицинских услуг для пациентов.

С пожеланиями успехов в проведении самых современных исследований и с уверенностью в значимости достижений белорусских ученых в развитии системы здравоохранения,

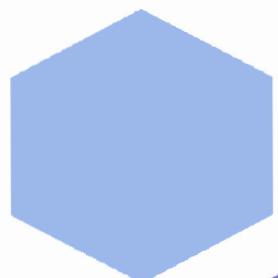
С. П. Рубникович



ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА



ФАРМАЦИЯ



ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА - МЕДИЦИНЕ



**ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ
МЕДИЦИНА**

**PREVENTIVE
MEDICINE**



УДК 614.876.06:621.039.586(450)(047.31)

ОЦЕНКА РИСКА РАЗВИТИЯ НЕСТОХАСТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРИ ПРОЖИВАНИИ НА ЗАГРЯЗНЕННЫХ РАДИОНУКЛИДАМИ ТЕРРИТОРИЯХ

Аветисов А. Р., Стожаров А. Н., Сосновский А. В.

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

Реферат. В данной работе рассмотрена процедура и результаты оценки риска развития тканевых реакций в ответ на облучение при проживании на загрязненных радионуклидами территориях. Исследование проведено в Лунинецком районе Брестской области. Обнаружено зависимое от дозы увеличение риска развития таких заболеваний, как ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, инфаркты и инсульты мозга, транзиторные ишемические атаки. В то же время риски развития катараракты и некоторых других заболеваний не показали достоверную положительную зависимость риска от дозы облучения. Обнаруженные факты позволяют рекомендовать применение утвержденных в медицине мер профилактики развития заболеваний сердца и сосудов на загрязненных территориях.

Ключевые слова: облучение, тканевые реакции, риск.

Международные данные о рисках облучения относятся к публикациям МКРЗ 60 и 103 [1, 2]. Первая обзорная публикация о тканевых реакциях появилась еще в 2009 г. [3], а систематизированные данные появились в публикации 118 МКРЗ в 2012 г. [4].

Известно, что сердечно-сосудистая система в целом устойчива к облучению [5]. Но статистически значимые риски развития сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний, связанных с малыми дозами облучения, показали результаты в широком диапазоне от 0,01 до 1,3 Гр [6], что требует изучения влияния других факторов риска [7]. Не исключается, что любые экстремальные ситуации способны со временем перерости в психосоматические заболевания, среди которых сердечно-сосудистая патология является одной из ведущих [8].

Хрусталик глаза признан довольно радиочувствительной частью не только глаза, но и организма человека в целом. Сегодня порог развития катараракты оценен в 0,5 Гр, а надпороговый катарактогенез может быть описан линейной беспороговой моделью [9].

Кроветворная система, невзирая на относительно высокую радиочувствительность, может спонтанно регенерировать при дозах острого однократного облучения до 8 Гр [10]. При этом хроническое радиационное воздействие кроветворная система переносит легче, что характеризуется

гибкостью и способностью к адаптации [11]. Новых сведений об отдаленных эффектах облучения кроветворной системы пока не обнаружено.

Известно, что степень тяжести поражения желудочно-кишечного тракта при остром облучении далеко не всегда зависит только от гибели стволовых клеток или клеток-предшественников эпителия [4]. При этом информация по хроническому низкодозовому облучению кишечника в доступной литературе отсутствует либо представлена фрагментарно.

Известно, что респираторная система в целом достаточно радиорезистентна. Дозы облучения, вызывающие клеточную гибель в других, более чувствительных тканях, обычно не вызывают морффункциональных изменений в альвеолоцитах.

Например, пролиферация альвеолоцитов второго типа возможна даже при интенсивности облучения на уровне 0,5 Гр/сутки [12]. В то же время было установлено, что у лиц, пострадавших от бомбардировки Хиросимы и Нагасаки, однократное облучение в диапазоне доз от 0,5 до 2,5 З увеличивает пожизненный риск смертности от заболеваний респираторной системы примерно на 18 % [13]. В этом же исследовании отмечены повышенные риски облучения для болезней сердца, инсультов и некоторых других заболеваний, то есть тканевых реакций в ответ на облучение.

Исследования показали, что дозы острого облучения гонад в диапазоне 0,1–0,3 Гр вызывают олигоспермию, а полное восстановление сперматогенеза занимает до 3 лет [14]. Зрелые яйцеклетки также весьма чувствительны к облучению: ЛД₅₀ составляет не более 2 Гр [15].

Обзорные публикации оценки риска последствий облучения после аварии на Фукусимской АЭС показали, что моделирование методом Монте-Карло способно дать приемлемую точность вычислений [16].

Существенно более низкие в сравнении с аварией на ЧАЭС дозы облучения населения позволяют спрогнозировать лишь риски онкологических заболеваний без учета соматической патологии.

Пока найдены лишь отличия в заболеваемости раком щитовидной железы у детей вследствие аварии на Фукусимской АЭС [17]. На территории Российской Федерации оценка доз облучения вследствие аварии на ЧАЭС обсуждается регулярно, но проблема оценки рисков развития неонкологической заболеваемости в этой связи либо не обсуждается, либо носит описательный характер [18].

Учитывая то, что сегодня не существует международных и национальных рекомендаций по использованию моделей оценки рисков развития тканевых реакций, мы предлагаем использование трех наиболее распространенных и традиционных моделей:

1. Модель пропорциональных рисков Кокса:

$$\Phi(z, \beta) = e^{\beta_1 \cdot z_1 + \dots + \beta_k \cdot z_k},$$

где $\Phi(z, \beta)$ – функция риска; $\beta_1 \dots \beta_k$ – коэффициенты объясняющих переменных (параметры модели); $z_1 \dots z_k$ – вектор объясняющих переменных (например, пол, возраст и так далее).

2. Линейная модель оценки избыточного относительного риска (ERR):

$$\Phi(z, \beta) = 1 + \beta \cdot f(dose)$$

где $\Phi(z, \beta)$ – функция риска; β – линейный коэффициент функции риска.

3. Линейная модель с логлинейным компонентом, используемая в специализированных программах оценки риска облучения:

$$\Phi(z, \beta) = e^{\beta_1 \cdot z_1 + \dots + \beta_k \cdot z_k} \cdot (1 + \beta_0 \cdot f(dose))$$

где $\Phi(z, \beta)$ – функция риска; $\beta_1 \dots \beta_k$ – коэффициенты объясняющих переменных; $z_1 \dots z_k$ – вектор объясняющих переменных (ковариат).

Линейная модель, а также линейная модель с логлинейной компонентой в модели оценки риска используется в специализированных программах. Наиболее простым способом оценки риска облучения является использование программных пакетов rERR и LinERR в среде статистического программирования R. В радиационной эпидемиологии модели ERR используются для анализа зависимости «доза – реакция» для данных о частоте событий. Одной из моделей, представляющих особый интерес, особенно в радиационной эпидемиологии, является линейная модель ERR. Нами были проанализированы результаты вычислений избыточного относительного риска (ERR) для некоторых заболеваний, относящихся к понятию «тканевые реакции». Вычисления проводились в среде статистического программирования R с использованием бесплатного программного пакета rERR.

Пример кода для оценки риска развития тканевых реакций представлен ниже.

```
library("rERR")
Data1 <- read.table(file = "Cor2.txt", header =
TRUE)
Formula1 <- Surv(AgeAtEntry,age_at_event,outcome) ~
lin(dose_cum) + strata(sex)
Formula2 <- Surv(AgeAtEntry,age_at_event,outcome) ~
loglin(factor(covar)) + lin(dose_cum) + strata(sex)
Fit1 <- f_fit_linERR_wf(formula1,data =
Data1, id_name = "id", doses = Data1[,45:79], times =
Data1[,10:44], covars = Data1[,c("sex","covar")], lag = 2, exclusion_done = FALSE)
Fit2 <- f_fit_linERR_wf(formula2,data =
Data1, id_name = "id", doses = Data1[,45:79], times =
Data1[,10:44], covars = Data1[,c("sex","covar")], lag = 2, exclusion_done = FALSE)
summary(fit1)
summary(fit2)
confint(fit1)
confint(fit2)
f_lrt(fit1,fit2).
```

Получение результатов работы программы, включающее строки данных, содержащих итоги вычислений, например:

```
> summary(fit1)
Formula: Surv(AgeAtEntry, age_at_event,
outcome) ~ lin(dose_cum) + strata(sex)
Linear Parameter Summary Table:
  coef  se(coef) z Pr(>|z|)
```

```
dose_cum 0.2936232 0.06352452 4.622203
3.796869e-06
AIC: 50228.74
Deviance: 50226.74
Number of risk sets: 2913
> confint(fit1)
Confidence intervals:
Linear Parameter - Likelihood ratio test ci:
  coef lower .95 upper .95
dose_cum 0.2936232 0.1936654 0.4575233
> summary(fit2)
Formula: Surv(AgeAtEntry, age_at_event,
outcome) ~ loglin(factor(covar)) +
  lin(dose_cum) + strata(sex)
Linear Parameter Summary Table:
  coef se(coef) z Pr(>|z|)
dose_cum 0.3631761 0.08716315 4.166624
3.091434e-05
Log Linear Parameter Summary Table:
  coef exp(coef) se(coef) z Pr(>|z|)
covar_1 -1.2680399 0.2813826 0.4026492 -
3.1492424 0.001636943
covar_2 -0.5217867 0.5934593 0.3864317 -
1.3502688 0.176929770
covar_3 -0.2171762 0.8047882 0.3830518 -
0.5669630 0.570739324
covar_4 -0.1930176 0.8244675 0.3816092 -
0.5057991 0.612997674
covar_5 -0.5637658 0.5690620 0.3874995 -
1.4548814 0.145702087
AIC: 50156.16
Deviance: 50144.16
Number of risk sets: 2913
> confint(fit2)
Confidence intervals:
Linear Parameter - Likelihood ratio test ci:
  coef lower .95 upper .95
```

```
dose_cum 0.3631761 0.2359541 0.5840276
Log Linear Parameter - Wald ci:
  coef exp(coef) lower .95 upper .95
  covar_1 -1.2680399 0.2813826 0.1278091
0.619488
  covar_2 -0.5217867 0.5934593 0.2782657
1.265675
  covar_3 -0.2171762 0.8047882 0.3798633
1.705045
  covar_4 -0.1930176 0.8244675 0.3902538
1.741806
  covar_5 -0.5637658 0.5690620 0.2662683
1.216185
> f_lrt(fit1,fit2)
$lrt (likelihood ratio test)
[1] 82.57406
$lrt_pval 1.172924e-18.
```

Анализ полученных результатов осуществлялся в три этапа:

- 1) анализ качества и достоверности линейной модели риска по стандартным оценкам аналогичных тестов, применяемых в статистике;
- 2) анализ качества и достоверности линейной модели с логлинейным компонентом по стандартным статистическим оценкам аналогичных тестов;
- 3) сравнение качества двух моделей методом максимального правдоподобия с целью выбора наилучшей модели или отклонения обеих моделей и принятия или отклонения поиска альтернативных моделей.

В случае, когда линейная модель, а также линейная модель с логлинейным компонентом не давали статистически значимого результата, мы использовали стандартную модель пропорциональных рисков Кокса. Результаты вычислений представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты вычислений риска развития некоторых неонкологических заболеваний на загрязненных радионуклидами территориях

Показатель		Линейная модель ERR		Линейная + логлинейная модель ERR			Логлинейная (модель Кокса)*	
Диагноз (МКБ-10)	Ковариата	β	p (β)	β	p (β)	α ; p	β	p (β)
Гипертоническая болезнь (I10–I13)	Плотность загрязнения	0.294	3.79e-06	0.229	3.771e-6	10.56; 0.919	-	-
	Возраст	0.294	3.79e-06	0.363	3.091e-5	-1.26; 0.0016	-	-
	Тип населенного пункта	0.294	3.79e-06	0.505	0.00015	0.11; 0.99	-	-

Окончание табл. 1

Показатель		Линейная модель ERR		Линейная + логлинейная модель ERR			Логлинейная (модель Кокса)*	
Диагноз (МКБ-10)	Ковариата	β	p (β)	β	p (β)	α ; p	β	p (β)
ИБС (I20–I25)	Плотность загрязнения	0,336	0,000128	0,99	0,048	0,62; 0,9	-	-
	Возраст	0,336	0,000128	0,354	0,000165	-8,18; 0,9	-	-
	Тип населенного пункта	0,336	0,000128	0,407	0,001	- 0,028; ---	-	-
Болезни сердца, «плотность загрязнения», I10–I13; I20–I25		0,398	5,15e-08	0,586	0,00035	0,321; --	-	-
Болезни сердца, «возраст», I10–I13; I20–I25		0,398	5,15e-08	0,402	1,698e-07	-1,06; 0,008	-	-
Болезни сердца, «тип населенного пункта», I10–I13; I20–I25		0,398	5,15e-08	0,539	4,3e-06	- ,0016; 0,99	-	-
Ишемия мозга, «плотность загрязнения», I63, I64, G45		0,267	0,0295	0,498	0,202	10,39; 0,96	-	-
Ишемия мозга, «возраст», I63, I64, G45		0,279	0,026	0,267	0,026	-1,90; 0,13	-	-
Ишемия мозга, «тип населенного пункта», I63, I64, G45		0,279	0,026	0,357	0,082	0,25; 0,97	-	-
Циррозы печени, «возраст»		0,029	>0,05	2,107	>0,05	11,8; 0,96	- 0,17	<0,01
Катаракта, «возраст»		-0,01	>0,05	0,112	>0,05	-2,41; 0,0011	- 0,08	0,02
Пневмонии, «возраст»		0,12	>0,05	1,17	>0,05	10,12; 0,01	-0,6	<0,01

*Примечание – * – отсутствие данных указывает на наличие положительных результатов линейной и/или линейной модели с логлинейным компонентом*

Заключение:

1. Обнаружено отсутствие достоверно положительного влияния дозы облучения на риски развития катаракты, цирроза печени, пневмоний при проживании на загрязненных радионуклидами территориях.

2. Наиболее значимые и одновременно достоверные результаты влияния дозы облучения на риски развития тканевых реакций по линейной модели получены для таких событий, как развитие гипертонической болезни, ишемической

болезни сердца, инфаркта миокарда, инсультов, атеросклеротических поражений сосудов головного мозга, транзиторных ишемических атак.

3. Полученные результаты указывают на необходимость проведения дополнительных мероприятий по снижению выявленных повышенных рисков у населения, проживающего на территориях с более высокими уровнями загрязнения основными дозообразующими радионуклидами Чернобыльского выброса.

Список цитированных источников

1. The 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection // Ann ICRP. – 1991. – Т. 21, N 1–3. – P. 1–201.
2. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP publication 103 // Ann ICRP. – 2007. – Т. 37, N 2–4. – P. 1–332.
3. Аклеев, А.В. Реакции тканей на хроническое воздействие ионизирующего излучения / А. В. Аклеев // Радиационная Биология. Радиоэкология. – 2009. – Т. 49, № 1. – С. 5–20.
4. ICRP, 2012 ICRP Statement on Tissue Reactions / Early and Late Effects of Radiation in Normal Tissues and Organs – Threshold Doses for Tissue Reactions in a Radiation Protection Context // Ann ICRP. – 2012. – Vol. 41, N 1–2. – P. 1–322.
5. Concise Review: Stem Cells, Myocardial Regeneration, and Methodological Artifacts / P. Anversa [et al.] // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25, N 3. – P. 589–601.
6. Review and meta-analysis of epidemiological associations between low/moderate doses of ionizing radiation and circulatory disease risks, and their possible mechanisms / M. P. Little [et al.] // Radiat Environ Biophys. – 2010. – Vol. 49, N 2. – P. 139–153.
7. Bromet, E.J. Mental health consequences of the Chernobyl disaster / E. J. Bromet // J Radiol Prot. – 2012. – Vol. 32, N 1. – P. 71–75.
8. Румянцева, Г. М. Экспертная оценка психических нарушений у лиц, подвергшихся радиационному воздействию / Г. М. Румянцева, О. В. Чинкина, С. Н. Шишков. – Москва, 2011. – 260 с.
9. Radiation cataractogenesis: a review of recent studies / E. A. Ainsbury [et al.] // Radiat Res. – 2009. – Vol. 172, N 1. – P. 1–9.
10. Baranov, A. E. Allogeneic bone marrow transplantation after severe, uniform total-body irradiation: experience from recent (Nyasvizh, Belarus) and previous radiation accidents // Advances in the Biosciences. – 1996. – Vol. 94. – P. 281–294.
11. Akleyev, A. V. Chronic Radiation Syndrome / A. V. Akleyev. – Berlin, Heidelberg : Springer, 2014. – 410 p.
12. M. Bentzen, J. Z. S., J. Bernier, S. Quantitative clinical radiobiology of early and late lung reactions / J. Z. S. M. Bentzen, J. Bernier, S. // International Journal of Radiation Biology. – 2000. – Vol. 76, N 4. – P. 453–462.
13. Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950–1997 / D.L. Preston [et al.] // Radiat Res. – 2003. – Vol. 160, N 4. – P. 381–407.
14. Herrmann, Th. Strahlenreaktionen an den Gonaden / Th. Herrmann // Strahlenther. Onkol. – 1997. – Vol. 173, N 10. – P. 493–501.
15. Wallace, W. H. B. The radiosensitivity of the human oocyte / W. H. B. Wallace, A. B. Thomson, T. W. Kelsey // Hum Reprod. – 2003. – Vol. 18, N 1. – P. 117–121.
16. Radiation dose rates now and in the future for residents neighboring restricted areas of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant / K. H. Harada [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2014. – Vol. 111, N 10.
17. Relationship between environmental radiation and radioactivity and childhood thyroid cancer found in Fukushima health management survey / H. Toki [et al.] // Sci Rep. – 2020. – Vol. 10, N 1. – P. 4074.
18. Trends of development and prediction of the doses from the internal exposure of the public of the Russian Federation and its critical groups in the distant post-Chernobyl NPP accident period / G. Ya. Bruk [et al.] // Radiac. gig. (2008). – 2019. – Vol. 12, N 2. – P. 66–74.

Assessment of the risk of development of non-stochastic effects when living in territories contaminated with radionuclides

Avetisov A. R., Stojarov A. N., Sasnowski A. V.
Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

This paper discusses the procedure and results of assessing the risk of tissue reactions in response to radiation when living in areas contaminated with radionuclides. The study was conducted in the Luninets district of the Brest region. A dose-dependent increase in the risk of developing diseases such as coronary heart

disease, hypertension, cerebral infarctions and strokes, and transient ischemic attacks was found. At the same time, the risks of developing cataracts and some other diseases did not show a reliable positive dependence of risk on the radiation dose. The discovered facts allow us to recommend the use of medically approved measures to prevent the development of heart and vascular diseases in contaminated areas.

Keywords: irradiation, tissue reactions, risk.

Поступила 05.06.2024

УДК 614.1:314.114

ДИНАМИКА СМЕРТНОСТИ В 5-ЛЕТНИХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ В 1990–2019 ГГ.

Агиевец О. В., Романова А. П.

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

Реферат. В работе приведен анализ динамики смертности в 5-летних возрастных группах трудоспособного населения Республики Беларусь в 1990–2019 гг. Проведено моделирование динамики смертности с использованием кусочно-линейной регрессионной модели изменения интенсивности смертности в многолетней ретроспективе. В результате проведенного анализа данных показано, что периодизация динамики смертности в 5-летних возрастных группах трудоспособного населения имела хронологические различия. Модели динамики смертности выделили за период 1990–2019 гг.: 3 периода динамики у групп в возрастном диапазоне 15–29 лет и 50–54 года, 4 периода у группы в возрасте 30–34 года и по 5 периодов у групп в возрастном диапазоне 35–64 года. За период с 1990 по 2019 г. произошло снижение уровня смертности во всех 5-летних группах трудоспособного населения, степень которого убывала по мере увеличения возрастного ценза группы. В группах в возрастном диапазоне 15–29 лет показатель смертности снизился более чем в 2 раза ($p<0,05$), в диапазоне 30–39 лет – более чем в 1,5 раза ($p<0,05$), в диапазоне 40–64 года – менее чем 1,2 раза ($p<0,05$). В хронологических границах исследования статистически значимо разнилась динамика смертности в группе 15–19 лет по сравнению с 5-летними группами в возрастном диапазоне 30–64 года. Темпы ежегодного прироста показателей смертности в 5-летних группах в возрастном диапазоне 15–29 лет в периодах модели различий не имели ($p<0,05$).

Ключевые слова: трудоспособное население, 5-летние возрастные группы, динамика смертности, моделирование

Введение. Смертность, наряду с рождаемостью, является основным медико-демографическим показателем, определяющим характер и особенности демографического развития стран и регионов. По данным Всемирной организации здравоохранения, Беларусь относится к странам со средним уровнем смертности (9,1–15 %) [1]. Однако наиболее актуальной проблемой медико-демографического развития страны по-прежнему остается смертность трудоспособного населения, которое составляет 60 % от общей численности населения [2]. Ученые смертность

трудоспособного населения России и Беларуси считают угрозой демографическому развитию территорий, которая обуславливает непрерывное снижение численности населения, трансформацию возрастной структуры в неблагоприятную сторону и потенциальные социально-экономические трудности [3].

Тем не менее до настоящего времени не существует единого мнения относительно подходов в расчетах смертности трудоспособного населения, в том числе в определении и оценке преждевременной смертности [4]. Традиционно

преждевременной считается смерть в возрасте от 15 до 58 лет у женщин и от 15 до 63 лет у мужчин, которая обуславливает потерю значимых для развития экономики трудовых ресурсов.

Анализ смертности в 5-летних возрастных группах трудоспособного населения предполагает более глубокое изучение смертности населения трудоспособного возраста для получения объективной оценки уровня, динамики и межгрупповых возрастных различий смертности [5]. Исследование смертности в отдельных возрастных группах позволит более рационально планировать мероприятия по снижению смертности, улучшению состояния здоровья и медицинского обслуживания трудоспособного населения за счет целевой возрастной направленности этих мероприятий.

Цель работы – провести сравнительный анализ и установить различия динамики смертности в 5-летних возрастных группах трудоспособного населения Республики Беларусь в 1990–2019 гг.

Материалы и методы. Источниками исходных данных являлись формы государственной статистической отчетности за период с 1990 по 2019 г. Исследование динамики смертности в 5-летних возрастных группах в многолетней ретроспективе проведено на основе регрессионного анализа с использованием линейной модели регрессии с точками перелома. Для моделирования кусочно-линейной регрессии и расчета трендов использовано программное обеспечение Joinpoint Regression Program [5]. Результатом

моделирования явилось деление процесса смертности на хронологические периоды на основании статистически значимых различий темпа ежегодного прироста (ТЕП) исследуемого показателя в многолетней динамике в периодах различной продолжительности. На основании коэффициента регрессии рассчитывался ТЕП в процентах для каждого хронологического периода, который интерпретировался как процентное возрастание средней величины показателя за год [6, 7].

Результаты и их обсуждение. В хронологических рамках исследования абсолютное число умерших в возрасте 15–19 лет за 1990–2019 гг. снизилось в 3,6 раза: в 1990 г. число умерших в этом возрастном диапазоне составляло 615 человек, в 2019 г. – 170.

Среднегодовая численность этой возрастной страты уменьшилась в 1,6 раза (с 723 587 в 1990 г. до 448 911 в 2019 г.).

За 1990–2019 гг. показатель смертности (ПС) этой возрастной страты снизился в 2,2 раза ($p<0,05$): с 0,85 (0,79; 0,92) % в 1990 г. до 0,38 (0,33; 0,44) % в 2019 г. ПС данной возрастной группы в 2015–2019 гг. были наиболее низкими в хронологических рамках исследования ($p<0,05$) и не имели статистически значимых различий ($p>0,05$).

Также не имели статистически значимых различий ($p>0,05$) наиболее высокие ПС ($p<0,05$), наблюдавшиеся в 1990–2002 гг. (в 1995 г. он составил 0,98 (0,91; 1,05) %). То есть с 1995 г. уровень смертности к 2018 г. снизился в 2,9 раза ($p<0,05$) (рисунок 1).

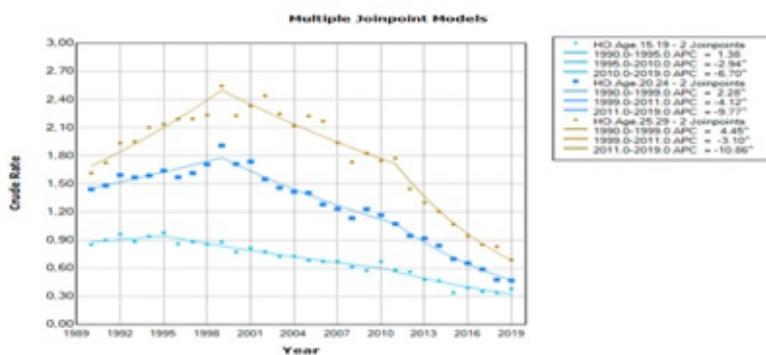


Рисунок 1 – Динамика смертности населения в возрасте 15–29 лет в 1990–2019 гг.

Модель выделила 3 периода, в хронологических границах которых различия ТЕП показателя были статистически значимы. На протяжении 1990–1995 гг. (в течение 6 лет), ТЕП ПС не отличался от нулевого ($p=0,345$). В течение последующих 15 лет (1995–2010 гг.) ПС снижался с

отрицательным ТЕП $-2,94$ ($-3,6$; $-2,27$) % ($p<0,001$). В последующем на протяжении 9 лет (2010–2019 гг.) уровень смертности снижался с отрицательным ТЕП $-6,7$ ($-8,6$; $-4,7$) % ($p<0,001$) (рисунок 1).

В хронологических рамках исследования абсолютное число умерших в возрасте 20–24 года за 1990–2019 гг. снизилось в 4,3 раза: в 1990 г. число умерших в этом возрастном диапазоне составляло 983 человека, в 2019 г. – 226. Среднегодовая численность этой возрастной страты уменьшилась в 1,4 раза (с 681 894 в 1990 г. до 482 098 в 2019 г.).

За 1990–2019 гг. ПС данной возрастной страты снизился в 3 раза ($p<0,05$) с 1,44 (1,35; 1,53) % в 1990 г. до 0,47 (0,41; 0,53) % в 2019 г. Наиболее низкие ПС этой возрастной группы не имели статистически значимых различий ($p>0,05$) и наблюдались в 2018–2019 гг. ($p<0,05$).

Наиболее высокий уровень смертности 1,91 (1,81; 2,01) % наблюдался в 1999 г. ($p<0,05$). То есть с 1999 к 2019 г. уровень смертности снизился в 4 раза ($p<0,05$) (рисунок 1). Модель выделила 3 периода, в хронологических границах которых различия ТЕП показателя были статистически значимы. На протяжении 1990–1999 гг. (в течение 10 лет) ПС ежегодно рос с ТЕП 2,23 (1,33; 3,23) % ($p<0,0001$). В течение последующих 12 лет (1999–2011 гг.) ПС снижался с отрицательным ТЕП $-4,12$ ($-4,78$; $-3,45$) % ($p<0,0001$). В последующем на протяжении 8 лет (2011–2019 гг.) уровень смертности снижался с отрицательным ТЕП $-9,76$ ($-11,44$; $-8,06$) % ($p<0,001$) (рисунок 1). Таким образом, в возрастной группе 20–24 года в течение 2 периодов общей продолжительностью 20 лет (1999–2011, 2011–2019 гг.) происходило снижение ПС, а отрицательный ТЕП становился выше. ТЕП в 2011–2019 гг. в 2,4 раза превышал ТЕП в 1999–2011 гг. ($p<0,05$).

В хронологических рамках исследования абсолютное число умерших в возрасте 25–29 лет за 1990–2019 гг. снизилось в 2,9 раза: в 1990 г. число умерших в этом возрастном диапазоне

составляло 1320 человек, в 2019 г. – 451. Среднегодовая численность этой возрастной страты уменьшилась в 1,2 раза (с 817 917 в 1990 г. до 655 607 в 2019 г.).

В целом за 1990–2019 гг. ПС этой возрастной страты снизился в 2,3 раза ($p<0,05$) с 1,61 (1,53; 1,7) % в 1990 г. до 0,69 (0,63; 0,75) % в 2019 г., который был наиболее низким во временных рамках исследования ($p<0,05$). Наиболее высокий подъем уровня смертности 2,54 (2,43; 2,67) % наблюдался в 1999 г. Таким образом, с 1999 г. ПС к 2019 г. снизился в 3,7 раза ($p<0,05$) (рисунок 1).

Модель выделила 3 периода, в хронологических границах которых различия ТЕП показателя были статистически значимы.

На протяжении 1990–1999 гг. (в течение 10 лет) ПС ежегодно рос с ТЕП 4,45 (3,16; 5,76) % ($p<0,001$). В течение последующих 12 лет (1999–2011 гг.) ПС снижался с отрицательным ТЕП $-3,1$ ($-3,97$; $-2,28$) % ($p<0,001$).

В последующем на протяжении 8 лет (2011–2019 гг.) уровень смертности снижался с отрицательным ТЕП $-10,86$ ($-12,69$; $-8,98$) % ($p<0,001$) (рисунок 1).

Таким образом, в возрастной группе 25–29 лет в течение 2 периодов общей продолжительностью 20 лет (1999–2011, 2011–2019 гг.) происходило снижение ПС, а отрицательный ТЕП становился выше. ТЕП в 2011–2019 гг. в 3,5 раза превышал ТЕП в 1999–2011 гг. ($p<0,05$).

В хронологических рамках исследования абсолютное число умерших в возрасте 30–34 года за 1990–2019 гг. снизилось в 1,6 раза: в 1990 г. число умерших в этом возрастном диапазоне составляло 1781 человек, в 2019 г. – 1084.

Среднегодовая численность этой возрастной страты уменьшилась в 1,1 раза (с 861 388 в 1990 г. до 776 326 в 2019 г.) (рисунок 2).

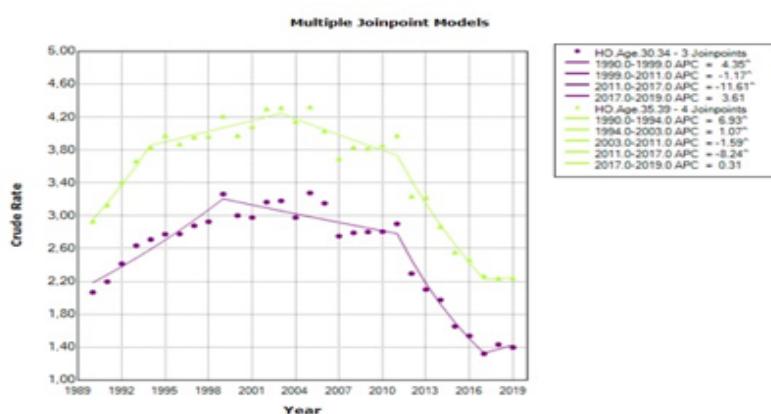


Рисунок 2 – Динамика смертности населения в возрасте 30–39 лет в 1990–2019 гг.

За 1990–2019 гг. ПС этой возрастной страты снизился в 1,5 раза ($p<0,05$) с 2,1 (0,97; 2,17) % в 1990 г. до 1,4 (1,32; 1,48) % в 2019 г. Наиболее низкий уровень смертности отмечен в 2017–2019 гг. ($p<0,05$), когда ПС не имели статистически значимых различий ($p>0,05$). Период с 1998 по 2006 г. характеризуется наиболее высокими значениями ПС, которые не имели статистически значимых различий ($p>0,05$), а ПС в 2005 г. составил 3,28 (3,14; 3,41) %. То есть с 2005 г. уровень смертности этой возрастной страты к 2019 г. снизился в 2,3 раза ($p<0,05$) (рисунок 2).

В целом за 1990–2019 гг. ПС снижался с отрицательным ТЕП $-1,26$ ($-2,23$; $-0,27$) % ($p=0,014$).

Модель выделила 4 периода, в хронологических границах которых различия ТЕП показателя были статистически значимы. На протяжении 1990–1999 гг. (в течение 10 лет) ПС ежегодно рос с ТЕП 4,35 (3,01; 5,71) % ($p<0,0001$). В течение последующих 12 лет (1999–2011 гг.) наблюдался тренд на снижение ПС с ТЕП $-1,17$ ($-2,11$; $-0,22$) % ($p=0,018$). В последующем на протяжении 6 лет (2011–2017 гг.) уровень смертности снижался с возросшим отрицательным ТЕП $-11,61$ ($-14,92$; $-8,16$) % ($p<0,001$), который в 9,9 раза превышал ТЕП в 1999–2011 гг. ($p<0,05$). В последующие 2 года (2017–2019 гг.) уровень смертности стабилизировался ($p=0,701$) (рисунок 2). Таким образом, в возрастной группе 30–34 года в течение 2 периодов общей продолжительностью 18 лет (1999–2011, 2011–2017 гг.) происходило снижение уровня смертности, сменившееся его стабилизацией в 2017–2019 гг.

В хронологических рамках исследования абсолютное число умерших в возрасте 35–39 лет за 1990–2019 гг. снизилось в 1,3 раза: в 1990 г. число умерших в этом возрастном диапазоне составляло 2171 человек, в 2019 г. — 1637. Среднегодовая численность этой возрастной страты уменьшилась на 9 742 человека (с 739 819 в 1990 г. до 730 077 в 2019 г.).

За 1990–2019 гг. ПС этой возрастной страты снизился в 1,4 раза ($p<0,05$): с 2,93 (2,81; 3,06) % в 1990 г. до 2,14 (2,14; 3,35) % в 2019 г. В 2017–2019 гг. отмечены наиболее низкие ПС ($p<0,05$), которые не имели статистически значимых различий ($p>0,05$). Период с 1997 по 2006 г. характеризовался высоким уровнем смертности, который в 2002 и 2005 гг. составил 4,32 %. То есть с 2002 г. уровень смертности снизился к 2019 г. в 1,9 раза ($p<0,05$) (рисунок 2).

Модель выделила 5 периодов. На протяжении 1990–1994 гг. (в течение 5 лет) ПС ежегодно

рос с ТЕП 6,93 (3,63; 10,33) % ($p<0,001$). В течение последующих 9 лет (1994–2003 гг.) сохранялся тренд роста уровня смертности с ТЕП 1,07 (0,12; 2,04) % ($p=0,03$). В последующем на протяжении 8 лет (2003–2011 гг.) формировался тренд на снижение с ТЕП $-1,59$ ($-2,85$; $-0,32$) % ($p=0,017$). С 2011 по 2017 г. (на протяжении 6 лет) ПС достоверно значимо снижался с ТЕП $-8,24$ ($-10,56$; $-5,87$) % ($p<0,001$). В завершающие 2 года исследования (2017–2019 гг.) наблюдалась стабилизация уровня смертности ($p=0,959$) (рисунок 2).

Таким образом, в возрастной группе 35–39 лет в течение 2 периодов общей продолжительностью 14 лет (1990–1994, 1994–2003 гг.) происходил рост ПС, а ТЕП становился ниже: в 1994–2003 гг. он был ниже в 6,5 раза ($p<0,05$). Также разнились отрицательные ТЕП, наблюдавшиеся в течение 14 лет, когда отмечено снижение смертности: отрицательный ТЕП в 2011–2017 гг. в 5,2 раза превышал ТЕП в 2003–2011 гг. ($p<0,05$).

В хронологических рамках исследования абсолютное число умерших в возрасте 40–44 года за 1990–2019 гг. снизилось на 148 человек: в 1990 г. число умерших в этом возрастном диапазоне составляло 2574 человека, в 2019 г. — 2426. Среднегодовая численность этой возрастной страты увеличилась на 50 841 человека (с 611 096 в 1990 г. до 661 937 в 2019 г.).

За 1990–2019 гг. ПС этой возрастной страты снизился в 1,13 раза ($p<0,05$): с 4,21 (4,05; 4,38) % в 1990 г. до 3,67 (3,52; 3,81) % в 2019 г. Наиболее высокий уровень смертности ($p<0,05$) наблюдался в 2002–2005 гг., а в 2002 г. составил 6,14 (5,98; 6,31) %. Наиболее низкий уровень смертности наблюдался в 2015–2019 гг. ($p<0,05$), а в 2017 г. составил 3,49 (3,42; 3,71) %. То есть уровень смертности с 2002 г. снизился в 1,8 раза ($p<0,05$) (рисунок 3).

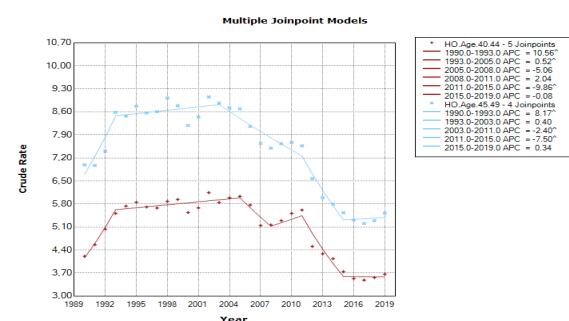


Рисунок 3 – Динамика смертности населения в возрасте 40–49 лет в 1990–2019 гг.

Модель выделила 6 периодов. На протяжении 1990–1993 гг. (в течение 5 лет) ПС ежегодно рос с ТЕП 10,56 (5,53; 15,83) % (p<0,0001). В течение последующих 12 лет (1993–2005 гг.) тренд роста ПС сохранялся при в 20 раз более низком (p<0,05) ТЕП 0,52 (0,01; 1,03) % (p=0,046).

В последующем уровень смертности стабилизируется на протяжении 2 периодов: в 2005–2008 гг. (p=0,186) и 2008–2011 гг. (p=0,618).

С 2011 по 2015 г. ПС статистически значимо снижался с отрицательным ТЕП –9,85 (–14,08; –5,42) % (p<0,0001), после чего на протяжении 4 лет (2015–2019 гг.) вновь стабилизовался (p=0,958) (рисунок 3). Таким образом, в возрастной группе 40–44 года в течение одного периода общей продолжительностью 4 года (2011–2015 гг.) происходило снижение ПС (p<0,0001), в то время как совокупная продолжительность роста составила 16 лет (1990–1993, 1993–2005 гг.), стабилизации – 10 лет (2005–2008, 2008–2011, 2011–2015 гг.).

В хронологических рамках исследования абсолютное число умерших в возрасте 45–49 лет за 1990–2019 гг. увеличилось на 296 человек: в 1990 г. число умерших в этом возрастном диапазоне составляло 3229 человек, в 2019 г. – 3525. Среднегодовая численность этой возрастной страты возросла в 1,38 раза (с 461 903 в 1990 г. до 638 500 в 2019 г.).

За 1990–2019 гг. ПС этой возрастной страты снизился в 1,13 раза (p<0,05): с 6,99 (6,75; 7,24) % в 1990 г. до 5,52 (5,34; 5,71) % в 2019 г. Наиболее высокие ПС (p<0,05) отмечены в период 2002–2005 гг. (p>0,05), а в 2002 г. ПС составил 9,06 (8,84; 9,27) %.

Уровень смертности в 2015–2019 гг. (p>0,05) характеризуется наиболее низкими значениями в хронологических рамках исследования (p<0,05), а в 2017 г. уровень смертности составлял 5,21 (5,03; 5,39) %. То есть по сравнению с 2002 г. уровень смертности к 2017 г. снизился в 1,7 раза (p<0,05) (рисунок 3).

Модель выделила 5 периодов: на протяжении 1990–1993 гг. (в течение 4 лет) ПС ежегодно рос с ТЕП 8,17 (1,41; 15,37) % (p=0,02).

В течение последующих 10 лет (1993–2003 гг.) уровень смертности стабилизировался (p=0,362). В последующем на протяжении 8 лет (2003–2011 гг.) ПС приобретал тренд на снижение с ТЕП –2,4 (–3,59; –1,2) % (p<0,0001).

С 2011 по 2015 г. (на протяжении 4 лет) ПС снижался с ТЕП –7,5 (–12,61; –2,09) % (p=0,01). В последующие 4 года (2015–2019 гг.) была отмечена стабилизация смертности (p=0,859) (рисунок 3). Таким образом, в возрастной группе 45–49 лет в течение 2 периодов общей продолжительностью 12 лет (2003–2011, 2011–2015 гг.) происходило снижение ПС, а отрицательный ТЕП становился выше. ТЕП в 2011–2015 гг. в 3,1 раза превышал ТЕП в 2003–2011 гг. (p<0,05). Продолжительность периодов стабилизации составила 14 лет (1993–2003, 2015–2019 гг.).

В хронологических рамках исследования абсолютное число умерших в возрасте 50–54 года за 1990–2019 гг. снизилось в 1,2 раза: в 1990 г. число умерших в этом возрастном диапазоне составляло 6370 человек, в 2019 г. – 5124.

Среднегодовая численность этой возрастной страты уменьшилась на 32 474 человека (с 664 438 в 1990 г. до 631 964 в 2019 г.).

За период 1990–2019 гг. ПС возрастной группы 50–54 года снизился в 1,2 раза (p<0,05): с 9,59 (9,36; 9,82) % в 1990 г. до 8,11 (7,89; 8,33) % в 2019 г. Наиболее высокие ПС (p<0,05) наблюдались в 2002–2003 гг. (p>0,05), когда в 2002 г. ПС составлял 13,57 (13,29; 13,86) %.

Аналогичный подъем уровня смертности (p>0,05) наблюдался в 1995–1996 гг. Наиболее низкий уровень смертности (p<0,05) наблюдался в 2016–2019 гг. (p>0,05), который в 2017 г. составлял 7,5 (7,29; 7,71) %.

То есть с 2002 г. уровень смертности к 2017 г. снизился в 1,8 раза (p<0,05) (рисунок 4).

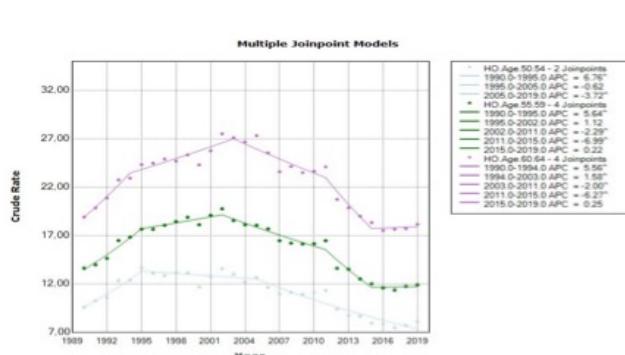


Рисунок 4 – Динамика смертности населения в возрасте 50–64 года в 1990–2019 гг.

Модель выделила 3 периода динамики смертности. В 1990–1995 гг. ПС ежегодно возрастал с ТЕП 6,76 (2,67; 11,01) % (p=0,002). В период с 1995–2005 гг. (в течение 10 лет) ПС оставался приблизительно на одном уровне (p=0,412). В последующем на протяжении 14 лет (2005–2019 гг.) уровень смертности снижался с отрицательным ТЕП –3,72 (–4,5; –2,94) % (p<0,0001) (рисунок 4).

Таким образом, в возрастной группе 50–54 года в течение одного периода общей продолжительностью 14 лет (2005–2019 гг.) происходило снижение ПС. На протяжении 16 лет уровень смертности этой возрастной группы статистически значимых изменений не претерпевал (p>0,05).

В хронологических рамках исследования абсолютное число умерших в возрасте 55–59 лет за 1990–2019 гг. увеличилось на 494 человека (в 1,06 раза): с 8043 человек в 1990 г. до 8547 человек в 2019 г. Среднегодовая численность этой возрастной страты увеличилась в 1,2 раза (с 590 597 в 1990 г. до 718 395 в 2019 г.).

Уровень смертности в этой возрастной группе снизился в 1,15 раза (p<0,05): с 13,62 (13,33; 13,92) % в 1990 г. до 11,9 (11,65; 12,15) % в 2019 г. Наиболее высокий уровень смертности 19,76 (19,33; 20,21) % отмечен в 2002 г. (p<0,05). Минимальный уровень смертности наблюдался в 2016–2018 гг. (p<0,05) в диапазоне 11,36–11,75 % (p>0,05). То есть с 2002 г. произошло снижение смертности к 2017 г. в 1,7 раза (p<0,05) и достигло уровня 11,36 (11,12; 11,6) % (рисунок 4).

Модель выделила 5 периодов, в хронологических границах которых различия ТЕП ПС были статистически значимы. На протяжении 1990–1995 гг. (в течение 6 лет) ПС возрастал с ТЕП 5,64 (4,1; 7,24) % (p<0,0001). Затем в 1995–2002 гг. ПС сохранил тенденцию к росту (p=0,058). С 2002 по 2011 г. наблюдалось снижение уровня смертности с отрицательным ТЕП –2,29 (–3,0; –1,57) % (p<0,0001), который в последующие 4 года (2011–2015 гг.) достигает ТЕП –6,99 (–10,08; –3,78) % (p<0,0001).

С 2015 г. уровень смертности стабилизировался (p=0,836) (рисунок 4). Таким образом, в возрастной группе 55–59 лет в течение 2 периодов общей продолжительностью 13 лет (2002–2011, 2011–2015 гг.) происходило снижение ПС, а отрицательный ТЕП становился выше. ТЕП ПС в 2011–2015 гг. в 3 раза превышал ТЕП в 2003–2011 гг. (p<0,05). Период стабилизации смертности составил 11 лет (1995–2002, 2015–2019 гг.), а роста – 6 лет (1990–1995 гг.).

В хронологических рамках исследования абсолютное число умерших в возрасте 60–64 года

за 1990–2019 гг. увеличилось на 640 человек (в 1,06 раза): в 1990 г. число умерших в этом возрастном диапазоне составляло 11 339 человек, в 2019 г. – 11 979. Среднегодовая численность этой возрастной страты также выросла в 1,1 раза (с 599 690 в 1990 г. до 659 500 в 2019 г.)

За 1990–2019 гг. ПС возрастной группы 60–64 года снизился в 1,04 раза (p<0,05): с 18,9 (18,57; 19,26) % в 1990 г. до 18,16 (17,84; 18,49) % в 2019 г.

Наиболее высокие ПС в этой возрастной группе наблюдались в 2002–2005 гг. (p<0,05), когда статистически значимые различия этих показателей отсутствовали (p>0,05) и в 2002 г. ПС составил 27,51 (27,07; 27,96) %. Минимальный уровень смертности (p<0,05) отмечен в 2016–2019 гг. (p>0,05). То есть с 2002 г. произошло снижение смертности в 1,6 раза (p<0,05) к 2017 г., когда ПС составил 17,64 (17,3; 17,97) % (рисунок 4).

Модель выделила 5 периодов, в хронологических границах которых различия ТЕП ПС были статистически значимы. На протяжении 1990–1994 гг. (в течение 5 лет) ПС возрастал с ТЕП 5,56 (3,02; 8,16) % (p<0,0001). Затем в течение 9 лет (1994–2003 гг.) рост смертности продолжился с ТЕП 1,58 (0,77; 2,4) % (p=0,001). С 2003 по 2011 г. (на протяжении 8 лет) наблюдалось снижение ПС с отрицательным ТЕП –1,99 (–3,07; –0,91) % (p=0,001). В 2011–2015 гг. (в течение 4 лет) ПС снижался с ТЕП –6,28 (–10,02; –2,38) % (p=0,004). С 2015 г. уровень смертности стабилизировался (p=0,837) (рисунок 4).

Таким образом, в возрастной группе 60–64 года в течение 2 периодов общей продолжительностью 12 лет (2003–2011, 2011–2015 гг.) происходило снижение ПС, а отрицательный ТЕП становился выше. ТЕП в 2011–2015 гг. в 3,15 раза превышал ТЕП в 2003–2011 гг. (p<0,05). Рост уровня смертности в этой возрастной группе продолжился в течение 14 лет (1990–1994, 1994–2003 гг.). При этом ТЕП в 1994–2003 гг. был в 3,5 раза ниже по сравнению с ТЕП ПС в 2011–2015 гг. (p<0,05).

За период 1990–2019 гг. уровень смертности снизился во всех 5-летних возрастных группах (p<0,05).

Однако уровни и характер динамики смертности в 5-летних возрастных группах трудоспособного населения разнились. Снижение уровня смертности за 30 лет, которое наблюдалось во всех 5-летних возрастных группах трудоспособного населения, также разнилось.

За 30 лет в возрастном диапазоне 30–64 года смертность снизилась в 1,5 раза и менее, в то время как в группе 15–19 лет произошло

снижение ПС в 2,2 раза, в группе 25–29 лет – в 2,9 раза, а в группе 20–24 года – в 3 раза.

Периоды наиболее высокого уровня смертности разнились по продолжительности. Так, максимальные значения смертности в 5-летних группах в возрастном диапазоне 15–29 лет наблюдались в течение 2,7 года. Для группы 15–19 лет отмечен период 1993–1996 гг., для групп 20–24 года – 1999–2002 гг., для группы 25–29 лет – 1999–2001 гг.

Период наиболее высокого уровня смертности в 5-летних группах в возрастном диапазоне 40–64 года составил 2,6 года и отмечен в 2002–2005 гг.

Наиболее низкий уровень смертности во всех 5-летних группах трудоспособного населения наблюдался вплоть до 2019 г., у групп 15–19 лет, 40–44 года – с 2015 г., у групп 30–34 года, 35–39 лет – с 2017 г., у группы 45–49 лет ранее всех – с 2013 г., у 5-летних групп в возрастном диапазоне 50–64 года – с 2016 г.

В хронологических границах исследования отмечены различия степени снижения ПС в 5-летних группах трудоспособного населения от максимальных до минимальных значений. В возрастном диапазоне 35–64 года различия максимального и минимального уровней были менее чем в 2 раза, в то время как в возрастных группах 30–34 года и 15–19 лет произошло снижение менее чем в 3 раза. Максимальный уровень смертности в группе 25–29 лет превышал минимальный в 3,7 раза, а 20–24 года – в 4 раза. По 3 периода динамики смертности выделили модели 5-летних групп в возрастном диапазоне 15–29 лет и 50–54 года, 4 периода смертности выделила модель в возрастной группе 30–34 года, по 5 периодов выделили модели динамики смертности в возрастных группах 35–39, 45–49, 55–59 лет и 60–64 года. Только модель динамики смертности населения в возрасте 40–44 года выделила 6 периодов. Однако модель выделяет 2 последовательных периода стабилизации ($p>0,05$) смертности (2005–2008, 2008–2011 гг.) с 2005 по 2011 гг. То есть в совокупности кривая динамики смертности в течение 6 лет делает разворот на снижение, в связи с чем эти 2 периода рассмотрены как один период.

Наиболее продолжительная динамика роста отмечена у группы 40–44 года (16 лет) и у групп 35–39 лет и 60–64 года, у которых рост смертности в хронологических границах модели продолжался по 14 лет. Период роста смертности у группы 15–19 лет отсутствовал. Наиболее продолжительный период (24 года) снижения ПС с возрастающим отрицательным ТЕП ПС

наблюдался у группы 15–29 лет. В течение 20 лет продолжался с возрастающим ТЕП ПС период снижения смертности в группах в возрасте 20–24 года и 25–29 лет и в течение 14 лет смертность с неизменным отрицательным ТЕП –3,72 (–4,50; –2,94) % (p=0,001), смертность снижалась в группе 50–54 года до окончания периода исследования (2005–2019 гг.). Периодом стабилизации смертности в группе 15–19 лет отмечено начало исследования (1990–1995 гг.). В хронологических границах исследования периоды стабилизации продолжались 4 года до завершения исследования (2015–2019 гг.) 5-летних групп в возрастном диапазоне 40–49 и 55–59 лет. А наиболее продолжительные периоды стабилизации – развороты линии тренда динамики смертности на снижение – наблюдались у групп 45–49 лет (10 лет), 50–54 года (10 лет), 55–59 лет (7 лет) и 40–44 года (6 лет). Отрицательный ТЕП ПС за 1990–2019 гг. в возрастной группе 15–19 лет статистически значимо различался с отрицательным ТЕП в 5-летних возрастных группах в диапазоне 30–64 лет (p<0,05), при этом не имел таких различий с отрицательным ТЕП ПС возрастных групп 20–24 года и 25–29 лет (p>0,05). В течение 30 лет максимальные ежегодные темпы снижения ПС во всех 5-летних возрастных группах отмечены в период 2010–2019 гг. (p<0,05). Причем в группах в возрастном диапазоне 15–29 лет в 2010–2019 гг., то есть до конца периода исследования.

Заключение. Хронологические границы и число периодов динамики смертности в 5-летних возрастных группах трудоспособного населения в 1990–2019 гг. были различны. Модели динамики смертности выделили за период 1990–2019 гг.: 3 периода динамики в группах в возрастном диапазоне 15–29 лет и группы 50–54 года; 4 периода в группах в возрасте 30–34 года и по 5 периодов в группах в возрастном диапазоне 35–64 года.

За период 1990–2019 гг. произошло снижение уровня смертности во всех 5-летних группах трудоспособного населения, степень которого убывала по мере увеличения возрастного ценза группы. В группах в возрастном диапазоне 15–29 лет ПС снизился более чем в 2 раза (p<0,05), в диапазоне 30–39 лет – более чем в 1,5 раза (p<0,05), в диапазоне 40–64 года – менее чем 1,2 раза (p<0,05). Хронологические периоды максимальных значений ПС в 5-летних группах в возрастном диапазоне 20–39 лет наблюдались в 1997–2006 гг., в возрастном диапазоне 40–64 года – в 2002–2005 гг., а наиболее ранний подъем смертности в 1993–1996 гг. отмечен в группе в возрасте 15–19 лет. Продолжительность



максимального подъема уровня смертности в 5-летних группах трудоспособного населения разнилась и была наиболее продолжительной в группах в возрастном диапазоне 30–39 лет в 1997(8)–2006 гг. Диапазон изменения уровня смертности от максимального до минимального в хронологических границах исследования в 5-летних группах разнился. Максимальный ПС превышал минимальный в возрастных группах 15–19 лет и 30–34 года в 3 раза, в возрастном диапазоне 20–29 лет – более чем в 3,5 раза, а в возрастном диапазоне 35 лет и старше – менее чем в 2 раза.

В моделях, выделивших 5 периодов динамики смертности, наиболее короткий (4 года) период роста смертности характерен для группы 45–49 лет, а наиболее продолжительный совокупный период (16 лет) – для группы 40–44 года. Соответственно наиболее продолжительный период снижения – у группы 35–39 лет (14 лет).

В хронологических границах исследования статистически значимо различалась динамика

смертности в группе 15–19 лет и в 5-летних группах в возрастном диапазоне 30–64 года. ТЕП в 5-летних группах в возрастном диапазоне 15–29 различий не имели.

Наиболее продолжительные совокупные периоды снижения смертности характеризовали динамику смертности в 5-летних группах согласно моделям динамики смертности, выделившим 3 периода: 15–19 лет – 24 года, 20–24 года и 25–29 лет – 20 лет.

Группа 15–19 лет периодов роста смертности в хронологических границах периода исследования не имела.

Отрицательные ТЕП ПС в 5-летних группах в возрастном диапазоне 15–29 лет не имели статистически значимых различий во всех периодах модели и были наиболее высокими в третьем периоде (2010–2019 гг.) в группе 25–29 лет.

Список цитированных источников

1. Чешик, И. А. Эпидемиология наиболее распространенных факторов риска, влияющих на развитие болезней системы кровообращения, и их вклад в смертность мужского населения трудоспособного возраста / И. А. Чешик, Т. М. Шаошакова // Проблемы здоровья и экологии. – 2018. – №. 1 (55). – С. 8–15.
2. Национальный статистический комитет Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.belstat.gov.by/ofitsialnaya-statistika/solialnaya-sfera/>. – Дата доступа: 19.05.2024/
3. Смертность трудоспособного населения России и Беларуси как угроза демографическому развитию территорий / А. А. Шабунова [и др.] // Экономические и социальные перемены: факты, тенденции, прогноз. – 2012. – № 2 (20). – С. 53–94.
4. Юмагузин, В. В. Факторы смертности от внешних причин и пути ее снижения: опыт экспериментального интервью [Электронный ресурс] / В. В. Юмагузин, М. В. Винник // Социальные аспекты здоровья населения. – 2014. – № 4. – Режим доступа: <http://vestnik.mednet.ru/>. – Дата доступа: 12.05.2024.
5. Comparability of segmented line regression models / H. J. Kim [et al.] // Biometrics. – 2004. – Vol. 60, N 4. – P. 1005–1014.
6. Романова, А. П. Метод расчета, оценки и комплексного анализа социальной компоненты смертности на популяционном, региональном и территориальном уровне / А. П. Романова // Вопросы организации и информатизации здравоохранения. – 2016. – № 2. – С. 4–13.
7. Estimating average annual per cent change in trend analysis / L. X. Clegg [et al.] // Stat. in Med. – 2009. – Vol. 28, N 29. – P. 3670–3682.

Dynamics of mortality rate in 5-year age groups of the population of the Republic of Belarus in 1990–2019

Ahiyevets A. V., Romanova A. P.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The article provides an analysis of the dynamics of mortality in 5-year age groups of the working population of the Republic of Belarus in 1990–2019. As a result of the data analysis, it was shown that the periodization of the dynamics of mortality in 5-year age groups of the working-age population had chronological differences. Models of mortality dynamics were identified for the period 1990–2019: three periods of dynamics

for groups in the age range 15–29 years and groups 50–54 years; four periods for the group aged 30–34 years and five periods for groups in the age range 35–64 years. There was a decrease in the mortality rate of all 5-year groups of the working-age population, the degree of which decreased as the age limit of the group increased.

Keywords: working-age population, 5-year age groups, mortality dynamics, modeling.

Поступила 05.06.2024

УДК 616.1/.8-084-053.2:796.035

МЕДИЦИНСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА НЕИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ДЕТЕЙ НА ОСНОВЕ ОПТИМИЗАЦИИ ИХ СУТОЧНОЙ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Борисова Т. С., Самохина Н. В., Кушнерук А. В.

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

Реферат. В статье представлен анализ современного состояния и тенденций формирования здоровья детей и подростков с обоснованием ключевых направлений профилактики его нарушений. Изложены результаты выполненного исследования физического развития детей младшего школьного возраста и особенностей организации их режима дня в контексте донозологической диагностики факторов риска гипокинезии, предикторов риска и групп риска развития гиподинамии с оценкой накопительного шанса формирования нарушений состояния здоровья и обоснованием ведущих направлений коррекции двигательного режима учащихся.

Ключевые слова: дети, суточная двигательная активность, гипокинезия, гиподинамия, факторы риска и профилактика неинфекционных заболеваний.

Введение. Неинфекционные заболевания (НИЗ) в Республике Беларусь, как и в большинстве других мировых сообществ, являются в настоящее время основной причиной заболеваемости, инвалидности и преждевременной смертности населения, представляя собой глобальную медико-социально-экономическую проблему. При этом доказательная база научных исследований, осуществленных в разных странах, демонстрирует, что наиболее эффективные меры, направленные на снижение бремени НИЗ, заключаются в предупреждении их развития.

Всемирная организация здравоохранения отмечает, что шанс развития НИЗ можно существенно снизить главным образом путем изменения четырех поведенческих факторов: употребление табака, вредное употребление алкоголя, не здоровое питание и дефицит физической активности, а также путем устранения возникающих на их фоне метаболических рисков, таких как высокое артериальное давление и высокий уровень холестерина [1].

Многие формы НИЗ взрослого населения и обуславливающие их возникновение факторы риска берут свое начало в детском и подростковом возрасте, так как развитие хронической патологии представляет собой программируенный итог взаимодействия индивидуального генетического фона, средовых и поведенческих факторов, действующих на человека в процессе всего периода онтогенеза. Все это определяет детский возраст как базисный период для формирования здоровья.

Ключевым направлением профилактики нарушений здоровья детей и подростков является воздействие на поведенческие факторы риска путем организации разумного двигательного режима в сочетании с рациональным питанием и отказом от вредных привычек. Тем не менее, среди спектра наиболее распространенных факторов риска формирования НИЗ в условиях техногенно измененного общества одно из центральных мест занимает гипокинезия и ее следствие — гиподинамия, весьма неблагоприятно сказывающаяся на состоянии растущего организма. При длительной

статической нагрузке, особенно при продолжительном нахождении в положении сидя, дыхание становится менее глубоким, обмен веществ замедляется, происходит застой крови в нижних конечностях, что ведет к снижению физической работоспособности всего организма. Систематическая продолжительная статическая нагрузка оказывается на функциональной активности головного мозга: снижается внимание, ослабляется память, нарушается координация движений, увеличивается время мыслительных операций [2]. В результате гипокинезии нарастает слабость мышц спины, давление на межпозвоночные диски становится постоянным, что сопровождается ухудшением их кровоснабжения, структурными патологическими изменениями, приводит к развитию нарушений осанки и сколиоза. Тонкие хрупкие кости и недостаточно развитая мышечная система способствуют высокому риску травматизации и нарушению работы внутренних органов и систем растущего организма. При слабых или переутомленных мышцах подошвенной поверхности стопы ее свод уплощается, что является причиной формирования плоскостопия и, как следствие, еще более выраженного снижения физической активности детей и подростков. Недостаточный уровень двигательной активности способствует изменениям и в функциональном состоянии жизнеобеспечивающих систем организма (атрофия и/или дистрофия тканей с уменьшением функциональных резервов; нарушение координирующей и интегрирующей роли движения; компенсаторная перестройка всех видов обмена веществ; выключение конечного звена стрессовой реакции и напряжение центральной нервной системы с переходом стресса в дистресс; изменение иммунологических свойств организма и терморегуляции) с развитием на этом фоне ряда НИЗ [3].

Вместе с тем в детском возрасте большинство патологических изменений, вызванных гигиенией вследствие нездорового образа жизни, при своевременно принятых мерах обратимо. Поэтому одной из актуальных задач профилактической медицины на современном этапе является исследование характера двигательного режима подрастающего поколения и действенная профилактика последствий его нарушения [4].

Цель работы – обосновать стратегию медицинской профилактики НИЗ на основе гигиенической оценки двигательной активности детей.

Задачи исследования включали: изучение состояния здоровья детей в связи с разными режимами их двигательной активности; выявление факторов риска формирования основных НИЗ учащихся, обусловленных характером

организации их двигательной активности; разработку рекомендаций по организации рационального двигательного режима учащихся.

Материалы и методы. В рамках исследования осуществлен анализ состояния здоровья детей: структуры распределения по группам здоровья, распространенности отдельных видов нарушений состояния здоровья по данным профилактических медицинских осмотров, распространенности основных классов болезней с использованием ретроспективного анализа ситуации в исследуемом регионе по данным официальной статистической отчетности учреждения здравоохранения с численностью обслуживаемого контингента около 15 000 детей. Проведены собственные исследования с оценкой физического развития, структуры и распространенности хронических заболеваний, функциональных нарушений органов и систем, уровня неспецифической резистентности, содержания жира в организме, функциональных показателей и адаптационных резервов жизнеобеспечивающих систем организма, а также двигательной активности 394 учащихся учреждений общего среднего образования в возрасте 6–11 лет. Двигательный компонент режима дня учащихся исследован с помощью специально разработанной карты диагностики двигательной активности, предусматривающей ее градацию на 6 категорий в зависимости от уровня метаболического эквивалента (от 1 до 10 ккал/кг/ч): базовая двигательная активность (сон) — 1,0; очень легкая (приготовление уроков, чтение книг, слушание музыки, игра в настольные игры, просмотр телепередач, работа с гаджетами и т. п.) — 1,5; легкая (уход за домашними животными, прогулки и ходьба спокойным шагом, занятие домашней работой, игра в настольный теннис, экскурсии) — 2,5; средняя (утренняя зарядка, подвижные игры на улице, прогулка и ходьба быстрым шагом, занятия хореографией и спортивной гимнастикой, танцами, катание на велосипеде и лыжах, игра в теннис, бадминтон и др.) — 4,0; тяжелая (хоккей, баскетбол, ручной мяч, аэробика, плавание, спортивная борьба, турпоходы) — 6,0; очень тяжелая двигательная активность (бег трусцой, кросс, атлетическая гимнастика, гребля, футбол) — 10,0. Статистическая обработка данных осуществлена с помощью программ Microsoft Excel, Statistica 10.0.

Результаты и их обсуждение. Оценка характера и тенденций формирования здоровья детей и подростков на основе данных анализа официальной статистической отчетности состояния здоровья детей от 0 до 17 лет за 2022 год в целом по стране показала, что с увеличением их

возраста имеет место ухудшение состояния здоровья. Количество абсолютно здоровых детей составляет всего лишь 15 %, и в подростковом периоде оно количество снижается в 1,5 раза, при этом растет распространенность функциональных нарушений и хронической неинфекционной патологии различной степени выраженности. Анализ результатов профилактических осмотров на примере одного из территориальных учреждений здравоохранения г. Минска с количеством обслуживаемого контингента около 15 000 человек также подтвердил наличие роста распространенности отдельных видов нарушений состояния здоровья у детей и подростков по мере их взросления с наиболее выраженными изменениями по пониженной остроте зрения, которая выявлена у 8,2 % детей и 21,9 % подростков, и сколиозу (характерен для 3,0 и 10,7 % соответственно обозначенным возрастным группам).

Заболеваемость по основным классам болезней также имеет выраженную тенденцию к росту среди подростков по сравнению с детьми, что подтверждает актуальность более углубленного анализа факторов, формирующих состояние здоровья растущего организма, разработки и

реализации оздоровительных и профилактических мероприятий среди детей младшего школьного возраста.

Выполнение собственных исследований с оценкой физического развития 394 учащихся учреждений общего среднего образования в возрасте 6–11 лет позволило установить наличие гармоничного физического развития лишь у $\frac{1}{3}$ обследованных детей, при этом дисгармоничное и резко дисгармоничное физическое развитие является превалирующим и значительно чаще (в 40,7 % случаев) регистрируется за счет избытка массы тела, что также подтверждает актуальность принятия профилактических и коррекционных мер по оптимизации двигательной активности обучающихся.

Скрининговое исследование двигательного режима детей на основе карт диагностики их двигательной активности дало возможность установить характер и продолжительность различных ее категорий (базовая, очень легкая, легкая, средняя) в суточном бюджете времени (рисунок 1). Тяжелая и очень тяжелая двигательная активность не являются категориями, характерными для детей младшего школьного возраста.

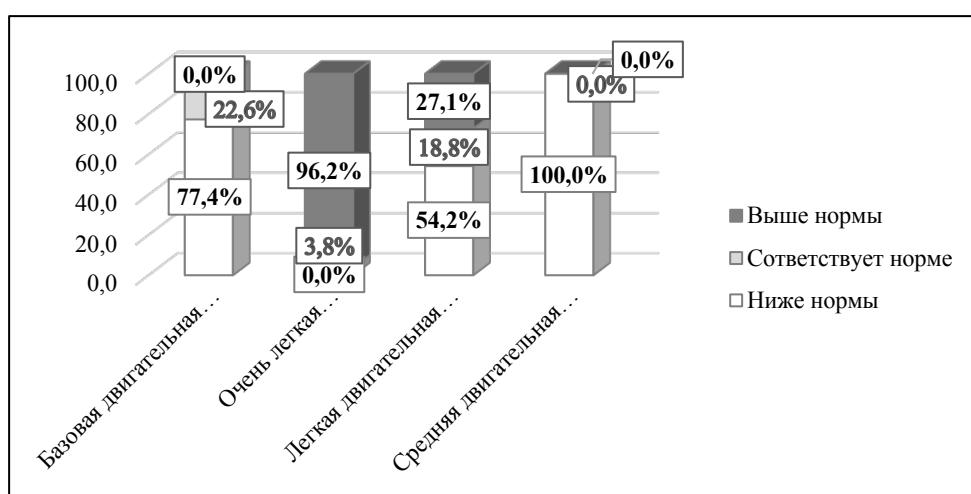


Рисунок 1 – Структура распределения различных категорий фактической двигательной активности детей 6–11 лет в зависимости от степени соответствия их продолжительности физиологически обоснованным режимам организации

Как видно из представленных данных, в структуре двигательного компонента режима дня детей младшего школьного возраста превалирует очень легкая двигательная активность и имеет место недостаточная продолжительность базовой, легкой и средней ее категорий.

Обращает на себя внимание тот факт, что 77,4 % детей имеют продолжительность ночных сна (базовый компонент) ниже физиологического оптимума. Основой среднесуточного

двигательного режима у 96,2 % детей является легкая двигательная активность, заключающаяся в спонтанных движениях, сопровождающих занятия в школе, выполнение домашних заданий, чтение книг, слушание музыки, игру на музыкальном инструменте, игру в настольные игры; рисование, лепку, конструирование, шитье, вязание, просмотр телепередач, использование гаджетов, общение с друзьями, знакомыми, членами семьи.

В целом имеющая место в режиме дня детей двигательная активность – посильная, однако без тренирующего эффекта либо с его наличием лишь у отдельных учащихся (при выполнении средней категории двигательной активности). Суммарная суточная двигательная активность (СДА) большинства учащихся младшего школьного возраста является нерациональной: у 54,7 % обследованных детей отмечается низкий уровень ее интенсивности (менее 30,5 ккал/кг/сут у девочек), ниже (в пределах 30,3–46,3 ккал/кг/сут у мальчиков и 30,5–42,7 ккал/кг/сут у девочек) и выше оптимального (в пределах 58,6–

78,2 ккал/кг/сут у мальчиков) у 28,3 и 3,8 % соответственно.

То есть группой риска формирования гиподинамии вследствие недостаточной по объему и интенсивности двигательной активности является 83,0 % учащихся.

При этом интенсивность СДА у девочек составляет 28,5–36,2 ккал/кг/сут с преобладанием по распространенности низкого уровня ее интенсивности, что существенно отличается от мальчиков, у которых интенсивность СДА составляет от 30,4 до 64,2 ккал/кг/сут с преобладанием по распространенности ее уровня ниже оптимального (таблица 1).

Таблица 1 – Структура распределения учащихся 6–11 лет в зависимости от уровня интенсивности их СДА с учетом гендерной принадлежности, %

Уровень интенсивности СДА	Мальчики	Девочки
Низкий	0,0	96,7
Ниже оптимального	60,9	3,3
Оптимальный	30,4	0,0
Выше оптимального	8,7	0,0
Высокий	0,0	0,0

Таким образом, было установлено, что группой риска по формированию гиподинамии среди младших школьников являются лица женского пола.

Анализ структуры двигательного режима обучающихся показал, что организованные уроки физической культуры и здоровья являются ведущим по степени интенсивности видом двигательной активности детей основной и подготовительной медицинских групп и в силу отсутствия или нерациональности организации не играют роли в обеспечении двигательного режима учащихся специальной медицинской группы и группы ЛФК.

Помимо уроков физической культуры в режиме учебного дня имеют место и физкультминутки в течение общеобразовательных уроков со статической компонентой, однако они проводятся нерегулярно; динамические перемены в организованном порядке проводятся весьма редко, в предусмотренное для них в расписании время подвижная деятельность характерна лишь для 34,8 % детей.

Образ жизни большинства учащихся вне учреждения образования является нерациональным с преобладанием статической нагрузки, обусловленной у 60,9 % детей просмотром телепередач или использованием гаджетов более 2 ч ежедневно. Основным видом самостоятельной повседневной двигательной активности является

дорога в школу и домой суммарной продолжительностью у $\frac{2}{3}$ детей до 20–30 мин в день. Дополнительная двигательная активность школьников 6–11 лет в будни и в выходные дни представлена у большинства прогулками на свежем воздухе, однако продолжительностью у 73,2 % детей ниже физиологически обоснованных величин. У 18,0 % обследуемых детей в будние дни и у 13,0 % – в выходные дни двигательная активность характеризуется лишь спонтанными движениями в свободное время.

Полученные данные подтверждают наличие гипокинезии с имеющим место недостаточным разнообразием форм двигательной активности и их низкой эффективностью в режиме выходного дня у 65,2 % детей младшего школьного возраста.

На фоне гипокинезии у обследованных детей установлено широкое распространение недостаточных резервов и функциональных отклонений со стороны жизнеобеспечивающих систем организма: сниженная ЖЕЛ у 62,6 %; мышечная слабость кистей рук у 57,3 %; явление дистонии у 57,6 %, причем в 2,2 раза чаще за счет сниженного артериального давления; нарушения сердечного ритма у 14,9 %; низкий уровень физической подготовленности и скрытая функциональная недостаточность сердечно-сосудистой системы, подтвержденные показателями сниженной тренированности кардиореспираторной системы как

по расчету индекса двойного произведения, так и коэффициента экономичности кровообращения (84 и 63 % соответственно анализируемым показателям); выраженным напряжением и неудовлетворительным состоянием адаптационного потенциала системы кровообращения, соответствующим состоянию здоровья детей ниже среднего (у 28,4 %), либо состоянию предболезни (у 42,4 %).

Каждый третий ребенок младшего школьного возраста отличается низкой сопротивляемостью к неблагоприятному воздействию факторов среды обитания и нуждается в оздоровлении и своевременном восполнении ресурсов здоровья. Проведенная биоимпедансометрия позволила

установить наличие приемлемого уровня телесного жира лишь у 35,6 % обследованных детей и его избыточное содержание у 50,7 %, а также у 13,7 % из них содержание телесного жира, классифицируемое как ожирение.

К тому же избыточное содержание телесного жира отмечается и у 55,6 % детей с оптимальным и выше оптимального уровнями СДА как подтверждение накопленного ранее дефицита двигательной активности.

По результатам биоимпедансометрии установлено наличие гендерной обусловленности изучаемого явления: уровни содержания телесного жира в организме девочек существенно выше, чем в организме мальчиков (рисунок 2).

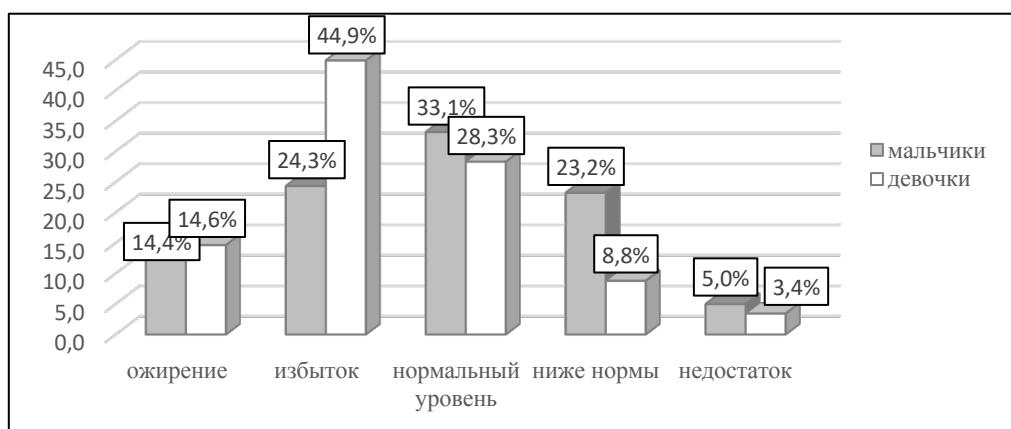


Рисунок 2 – Распределение обследованных мальчиков и девочек в зависимости от уровня содержания телесного жира

Среди обследованных девочек превалируют лица с содержанием жира в организме выше оптимального — 59,5 %, в том числе у 14,6 % оно классифицируемое как ожирение.

У мальчиков также превалируют лица с содержанием жира в организме выше оптимального (38,7 %), однако их в 1,5 раза меньше, чем среди девочек, что конкретизирует группу риска формирования гиподинамии — девочки младшего школьного возраста. Наряду с вышеизложенным, индекс внутреннего жира у 99,0 % детей соответствует приемлемому уровню, что подтверждает

донозологический характер метаболических отклонений и актуальность своевременной реализации профилактических и коррекционных мер по оптимизации двигательной активности обучающихся и прежде всего лиц женского пола.

Сопоставление уровня СДА девочек со стандартными шкалами, построенными на основе исследований И. И. Новиковой с соавторами [5], позволило выполнить оценку накопительного шанса формирования нарушений состояния здоровья, обусловленного гиподинамиией (таблица 2).

Таблица 2 – Накопительный шанс нарушений двигательной активности

здоровья девочек, обусловленный уровнем их

Уровни СДА	Интенсивность двигательной активности, ккал/кг/сут	Накопительный шанс нарушений состояния здоровья, %			
		физического и психического развития	снижения функциональных возможностей и работоспособности организма	снижения резистентности организма	формирования хронических заболеваний и обострений имеющихся
Низкий	ниже 30,5	65,6	67,2	77,9	62,2

Окончание табл. 2

Ниже оптимального	30,5–32,8	46,2	50,4	63,7	39,9
	32,9–35,3	41,0	44,9	59,9	34,7
	35,4–37,7	26,0	28,1	46,6	19,0
	37,8–40,1	7,8	11,6	26,6	2,8
	40,2–42,7	3,2	2,3	16,2	0,0
Оптимальный	42,8–44,7	2,9	2,0	15,2	0,0
	44,8–46,7	0,0	0,0	0,0	0,0
	46,8–48,7	0,0	0,0	0,0	0,0
	48,8–50,7	0,0	0,0	0,0	0,0
	50,8–52,8	2,9	2,0	14,3	0,0
Выше оптимального	52,9–55,6	3,2	2,3	16,2	0,0
	55,7–58,4	7,3	10,9	24,7	1,8
	58,5–61,2	26,0	26,0	46,6	19,0
	61,3–64,0	39,7	43,6	59,9	34,7
	64,1–66,8	43,6	49,0	61,8	37,3
Высокий	Более 66,8	59,3	64,0	72,2	52,8

Так, у девочек младшего школьного возраста, имеющих фактическую интенсивность САД от 28,5–36,2 ккал/кг/сут, вероятность снижения функциональных возможностей, умственной и физической работоспособности организма составляет от 28,1 до 67,2 %, резистентности организма — 46,6–77,9 %, формирования нарушений физического и психического развития от 26,0 до 65,6 %, формирования новых или обострения имеющихся хронических заболеваний — 19,0–62,2 %.

Все это подтверждает необходимость принятия срочных мер по коррекции их двигательного режима.

Сопоставление характера фактической САД девочек-школьниц с физиологически обоснованным режимом их двигательной активности позволило определить направления коррекции двигательного режима учащихся и разработать рекомендуемый диапазон среднесуточной нагрузки по различным категориям двигательной активности (таблица 3).

Таблица 3 – Рекомендуемый диапазон среднесуточной нагрузки девочек младшего школьного возраста по различным категориям двигательной активности

Категория двигательной активности	Учебный год		Каникулы	
	час	ккал/кг	час	ккал/кг
Базовая	10,1±0,6	10,1±0,6	11,0±1,1	11,0±1,1
Очень легкая	6,8±1,1	10,2±1,6	3,5±0,5	5,3±0,7
Легкая	1,2±0,2	3,0±0,5	2,7±0,3	6,8±0,8
Средняя	5,9±1,1	23,6±4,4	6,8±0,1	27,2±0,4
Итого	24,0	46,9±3,0	24,0	50,3±3,0

Основными направлениями коррекции двигательного режима девочек младшего школьного возраста, как ведущей группы риска развития гиподинамии и связанных с ней потенциальных нарушений состояния здоровья, определены повышение интенсивности САД в рамках учебного года до уровня не менее 43,9 ккал/кг/сут и в каникулярный период до 47,3 ккал/кг/сут за счет перераспределения компонентов двигательного режима дня — сокращения продолжительности очень легких видов деятельности и включения средней тяжести физической нагрузки (утренняя зарядка, подвижные игры на улице, прогулки

быстрым шагом, занятия хореографией, танцами, катание на велосипеде, занятия спортивной гимнастикой, игра в теннис или в бадминтон и т. п.) общкой продолжительностью не менее 4,8 ч в сутки в рамках учебного года и не менее 6,7 ч в каникулярный период, при обязательном сохранении физиологически полноценной продолжительности ночного сна (базовая категория), составляющей в среднем 10 ч в сутки. Управленческие решения по оптимизации двигательного режима доведены до сведения родителей и педагогов учреждений общего среднего образования, на базе которого проводилось исследование.

Таким образом, у большинства современных учащихся общеобразовательных учреждений имеет место гипокинезия и существует выраженный риск развития гиподинамии с весьма выраженным накопительным шансом формирования нарушений состояния здоровья, степень выраженности которого нарастает по мере усиления отклонений интенсивности СДА от оптимального уровня. Исследование и установление уровня интенсивности СДА с учетом прогностических показателей здоровья определяет стратегию последующих профилактических мероприятий и мер по коррекции двигательного режима учащихся. С помощью диагностических инструментов гигиенической оценки и рискового подхода становится возможным эффективно обосновывать и визуализировать наиболее выраженные проблемные зоны здоровьесразрушающего поведения.

Установление уровня двигательной активности детей, выделение группы риска развития гиподинамии и наиболее значимых предикторов риска ее формирования, а также

индивидуального накопительного шанса развития нарушений состояния здоровья позволяют определить основные задачи и стратегию реализации здоровьесберегающих мероприятий. Обоснованная оптимизация характера и интенсивности режима двигательной активности учащихся послужит существенному снижению вероятности развития нарушений состояния здоровья, а соответственно, направлена на обеспечение здоровьесбережения подрастающего поколения и всего населения на перспективу.

Заключение. Своевременная гигиеническая оценка состояния двигательной активности детей с последующим рисковым анализом ее влияния на здоровье детей является вкладом не только в индивидуальную диагностику и персонализированную медицинскую профилактику обусловленных гипокинезией состояний, но также направлена на совершенствование системы управления организацией здоровьесберегающей среды в интересах сохранения здоровья и обеспечения оптимального санитарно-эпидемиологического благополучия подрастающего поколения.

Список цитированных источников

1. Профилактика неинфекционных заболеваний и борьба с ними : доклад на 67-й сессии Европейского регионального комитета ВОЗ. – А67/14, Add. 3, Rev.1. – ВОЗ, 2014. – 7 с.
2. Синдром высоких учебных нагрузок у детей школьного и подросткового возраста / Г. А. Каркашадзе [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2017. – № 1 (14). – С. 7–23.
3. Основы гигиены детей и подростков : учеб. пособие / Т. С. Борисова [и др.] ; под ред. Т. С. Борисовой. – Минск : Новое знание, 2018. – 390 с.
4. ВОЗ. Глобальный план действий по физической активности на 2018–2030 гг. [Электронный ресурс] // Всемирная организация здравоохранения. – Режим доступа: <http://www.who.int/ncds/prevention/physical-activity/gappa>. – Дата доступа: 02.07.2019.
5. Двигательная активность и индивидуальные накопительные риски нарушения составляющих здоровья школьников / И. И. Новикова [и др.] // Гигиена и санитария. – 2020 – Т. 99, № 3. – С. 279–285.

Prevention of non-infectious diseases in children based on optimization of their daily motor activity

Borisova T. S., Samokhina N. V., Kushneruk A. V.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The article presents an analysis of the current state and trends in the health of children and adolescents with the justification of main areas for the prevention of its violations. The results of the study on the physical development of schoolchildren and the daily routine are presented in the context of early diagnosis of risk factors for physical inactivity, risk predictors and risk groups for the development of hypodynamy with an assessment of the chance of health disorders and justification of the leading directions for correcting the student's motor regime.

Keywords: children, daily motor activity, physical inactivity, hypodynamy, risk factors and prevention of non-infectious diseases.

Поступила 05.06.2024



УДК 616.36-002.12-022.6:578.891]-036.22-053.2(476)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ HBsAg СРЕДИ ДЕТЕЙ 2009–2015 ГОДОВ РОЖДЕНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Высоцкая В. С.¹, Коломиец Н. Д.², Гасич Е. Л.³, Глинская И. Н.¹, Романова О. Н.⁴,
Дашкевич А. М.¹, Карабан И. А.⁵, Гапеенко Е. В.⁶

¹Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья», г. Минск, Республика Беларусь;

²Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения
учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;

³Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья», г. Минск, Республика Беларусь;

⁴Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;

⁵Министерство здравоохранения Республики Беларусь;

⁶Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии
и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова»,
аг. Лесной, Минский район, Республика Беларусь

Реферат. Гепатит В (Hepatitis B — HB) имеет глобальный ареал распространения. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире более 2 миллиардов человек инфицированы вирусом HB (HBV). Вакцина против HBV является важнейшим средством профилактики, однако менее 40 % стран Европейского региона ВОЗ, в которых проводится всеобщая вакцинация детей, достигли целевого показателя 95 % охвата вакцинацией. Одной из целей по борьбе с HB в Европейском регионе ВОЗ установлен показатель распространенности поверхностного антигена HB (HBsAg) на уровне ≤0,5 % в вакцинированных когортах. В сероэпидемиологическом исследовании, проведенном в Республике Беларусь в 2022 г., с участием 2872 детей 2009–2015 годов рождения, установлено, что распространенность HBsAg HBV составила 0,03 % (95% ДИ: 0,00–0,22). Полученный результат соответствует достижению в Республике Беларусь контрольной региональной цели элиминации HBV — распространение HBsAg ≤0,5 % среди привитых когорт.

Ключевые слова: гепатит В, HBV, HBsAg, вакцинация, эпидемиологический процесс, серологическое исследование.

Введение. Программа иммунизации Республики Беларусь включает универсальную вакцинацию новорожденных против HB с 1998 г. В стране также успешно реализуются вакцинация по эпидемическим показаниям групп населения, подверженных высокому риску инфицирования, и система эпидемиологического слежения за вирусными гепатитами, которая предоставляет информацию о тенденциях заболеваемости и факто-рах риска. Однако слежение за острой инфекцией HB и ее последствиями не может в полной мере

отразить распространенность HBV и бремя болезни в популяции, поскольку большинство младенцев и детей во время острой инфекции остаются бессимптомными [1]. Вертикальная передача HBV и горизонтальная передача HBV в раннем возрасте сохраняют роль основных факторов, определяющих бремя HB в мире [2].

В связи с этим ВОЗ рекомендует странам проводить сероэпидемиологические исследования среди детей для оценки воздействия плановой вакцинации на бремя заболевания и

подтверждения достижения целевых задач по контролю HBV. Региональная рабочая группа по HB Европейской технической консультативной группы экспертов разработала основу и критерии для подтверждения достижения региональных целевых показателей по борьбе с HB для стран Европы [3].

Европейское региональное бюро ВОЗ в 2016 г. установило цели программы борьбы с HB на 2020 г., включая:

- ≥90 % охват 3 дозами вакцины против HBV;
- ≥90 % охват мероприятиями по профилактике передачи HBV от матери ребенку;
- распространность HBsAg HBV на уровне ≤0,5 % в возрастных группах, имеющих право на вакцинацию вакциной HBV.

В течение 2016–2019 г. Европейский регион ВОЗ добился существенного прогресса в достижении контроля над HB.

Борьба с HB является частью Программы по достижению целей устойчивого развития ООН, и ВОЗ поставила задачи по ликвидации HB в Глобальной стратегии сектора здравоохранения по борьбе с вирусными гепатитами и Временной стратегии по борьбе с HB [4].

В Республике Беларусь с 2000 г. иммунизация против HBV включена в Национальный календарь профилактических прививок и в настоящее время предполагает вакцинацию всех новорожденных в первые 12 часов жизни, в начале становления программы вакцинации дополнительно проводилась «догоняющая» вакцинация непривитых подростков в возрасте 13 лет. Также проводится вакцинация по эпидемическим показаниям групп, подверженных высокому риску инфицирования, например медицинских работников, контактных в очагах больных HB, носителей HBsAg и других.

Масштабное проведение плановой вакцинопрофилактики HB среди новорожденных на протяжении более 20 лет, а также вакцинация отдельных групп населения увеличили иммунную популяционную прослойку, косвенным показателем которой является величина охвата профилактическими прививками (по данным медицинской документации), которая по состоянию на 01.01.2023 г. составила в целом по стране 46,9 %. В когорте детского населения (0–17 лет) показатель охвата законченной вакцинацией не опускается ниже 98,0 %, показатель своевременности введения первой дозы вакцины достиг более 90 %, что соответствует рекомендациям и целевым показателям ВОЗ. Поскольку одним из целевых ориентиров Плана действий сектора

здравоохранения по борьбе с вирусными гепатитами в Европейском регионе ВОЗ является ≤0,5 % показатель распространенности HBsAg HBV среди привитых когорт населения, странам рекомендовано проводить соответствующие серологические исследования по изучению распространенности HBsAg HBV. В связи с этим в 2022 г. Министерством здравоохранения Республики Беларусь совместно с Европейским региональным бюро ВОЗ проведено презентативное много-кластерное серологическое исследование распространенности HBsAg HBV для оценки воздействия вакцинации против HB [5].

Цель работы – оценить воздействие вакцинации против HBV в Беларуси и установить, достигнута ли контрольная цель распространения HBsAg HBV ≤0,5 % среди привитых когорт, на основе результатов национального презентативного сероэпидемиологического исследования, проведенного совместно с Европейским региональным бюро ВОЗ при участии экспертов Института им. Роберта Коха (Берлин, Германия).

Материалы и методы. Исследование проведено среди детей 2009–2015 годов рождения, проживающих на территории всех регионов Республики Беларусь (шесть областей и столичный регион). Возрастная когорта определена с учетом необходимости участия детей, рожденных в период устойчивой реализации универсальной программы вакцинации новорожденных детей и детей, которые прошли период наибольшего риска перинатальной и горизонтальной передачи HBV.

Для определения числа участников применяна вероятностная выборка с использованием стратифицированного многоэтапного кластерного метода, основанная на системе участков организаций здравоохранения первичного звена системы здравоохранения, где участки рассматривались в качестве кластеров. Для того чтобы выборочная совокупность отражала распределение населения, проведена стратификация по степени урбанизации (столичный регион/городские районы/сельские районы) и географическому региону.

Серологическое исследование сыворотки крови участников проводилось в лаборатории ВИЧ/СПИД и сопутствующих заболеваний государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» методом иммуноферментного анализа. У участников исследования проведен отбор образцов крови, которые были исследованы иммуноферментным методом на наличие маркера HBV – HBsAg. Проведен анализ эпидемиологических данных, полученных в ходе

заполнения формы сбора информации (возраст, сведения о вакцинации против НВ, страна рождения). Статистическая обработка данных проводилась с помощью программ Microsoft Excel и EpiData.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенного отбора в исследовании приняли участие 3783 человека 2009–2015 годов

рождения, которым на момент взятия биологического материала исполнилось 6–13 лет.

Из них количество лиц мужского и женского пола составило 1938 (51,23 %; 95% ДИ: 49,64–52,82) и 1845 (48,77 %; 95 % ДИ: 47,18–50,36) соответственно. Стратифицированные данные по возрасту и гендерному признаку представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение участников исследования по возрасту и гендерному признаку

Возраст, годы	Мальчики			Девочки			Всего		
	абс. число	%	95% ДИ	абс. число	%	95% ДИ	абс. число	%	95% ДИ
6–7	261	13,51	12,02–15,06	240	13,05	11,55–14,62	501	13,26	12,20–14,36
8	282	14,59	13,05–16,19	221	12,02	10,57–13,54	503	13,32	12,25–14,42
9	290	14,96	13,40–16,63	295	16,03	14,39–17,73	585	15,48	14,35–16,65
10	264	13,66	12,17–15,22	286	15,54	13,92–17,23	550	14,56	13,45–15,70
11	281	14,54	13,00–16,14	278	15,11	13,51–16,77	559	14,80	13,68–15,94
12	286	14,79	13,25–16,41	269	14,62	13,04–16,27	555	14,69	13,58–15,83
13	274	14,18	12,66–15,76	256	13,91	12,37–15,53	530	14,03	12,94–15,15
Итого	1938	51,23	49,64–52,82	1845	48,77	47,18–50,36	3783	100,00	–

Из 3783 человек, включенных в исследование, 3766 (99,52 %; 95% ДИ: 99,28–99,72) были рождены в Республике Беларусь, 17 (0,48 %; 95% ДИ: 0,28–0,72) детей родились в других странах, из них только 4 ребенка заканчивали или полностью проходили курс вакцинации в Республике Беларусь.

Соотношение участников по степени урбанизации: 1256 (33,21 %) человек – жители городов, 1267 (33,50 %) – сельские жители и 1260 (33,32 %) – жители столичного региона. В совокупной выборке детей медицинская документация, содержащая сведения о прививочном статусе, была доступна для 3731 респондента. По данным медицинской

документации, 3528 детей (94,54 %; 95% ДИ: 93,78–95,24) получили не менее трех доз вакцины, для 145 детей (3,91 %; 95% ДИ: 3,31–4,56) получить достоверные сведения о проведенной вакцинации не представилось возможным. Из общего количества детей, по которым имелись сведения о прививочном статусе, 3247 (87,01 %; 95% ДИ: 85,91–88,07) детей получили дозу вакцины своевременно (т.е. непосредственно в день рождения или на следующий день). Сведения о введении трех доз вакцины против НВ имели 92,4 % участников из числа городских жителей, 95,48 % — из числа сельских жителей и 95,56 % — из числа жителей г. Минска (таблица 2).

Таблица 2 – Сведения о вакцинации против НВУ участников исследования

Население по виду урбанизации	Количество участников, имеющих сведения о вакцинации	Количество участников, получивших дозу вакцины при рождении*	Количество участников, получивших 1 и более дозы вакцины	Количество участников, получивших 3 и более дозы вакцины
Городское	1235 (98,25 %)	1040 (84,16 %)	1172 (94,83 %)	1142 (92,40 %)
Сельское	1236 (97,48 %)	1050 (84,89 %)	1196 (96,69 %)	1181 (95,48 %)
Столичное	1260 (100,00 %)	1157 (91,76 %)	1218 (96,59 %)	1205 (95,56 %)
Итого	3731 (98,60 %)	3247 (87,01 %)	3586 (96,09 %)	3528 (94,54 %)

Примечание: * – непосредственно в день рождения или на следующий календарный день.

Для вакцинации детей применялась преимущественно вакцина для профилактики HB рекомбинантная Euvax В. Доля детей, получивших 3 и более доз данной вакцины, составила 98,27 %. Вакцину рекомбинантную Heberbiovac HB® получило значимо меньше детей – 26 (0,96 %), для 6 (0,20 %) детей наименование вакцины не было определено.

Согласно Национальному календарю профилактических прививок Республики Беларусь, своевременное введение первой дозы вакцины против HBV определяется первыми 12 часами жизни. В изучаемой выборке у 87,01 % детей вакцинация была начата во временном интервале дня рождения и следующего календарного дня (с колебаниями значения от 69,07 % в Брестской области до 91,82 % в г. Минске). При этом среди жителей городов (без учета столичного региона) этот показатель (84,16 %) достоверно не отличался от аналогичного показателя среди сельских жителей (84,89 %). Суммарная доля детей, получивших первую дозу вакцины против HBV до выписки из родильного дома (0–7-е сутки), ориентировочно составляет 90,0 % (89,3 % для городского населения, 91,2 % для сельского населения).

Установлено, что 3,73 % (133) детей получили первую дозу вакцины против HBV в период после выписки из роддома до возраста начала проведения вакцинации против коклюша, дифтерии, столбняка, гемофильной инфекции и полиомиелита (до 3 месяцев жизни), что, вероятно, могло привести к сдвиганию срока начала данного вакцинального комплекса. При этом среди жителей сельской местности доля таких детей составляет 5,4 %, что в 1,9 раза превышает аналогичный показатель среди городских жителей (2,9 %).

Среди участников 2,6 % (92) детей получили первую дозу вакцины против HBV после достижения возраста 3 месяцев, включая 2,2 % городских жителей и 3,3 % сельских жителей.

Непосредственно в серологическом исследовании приняли участие 2872 (75,9 %; 95% ДИ: 74,53–77,25) человека из выбранных участников. Среди отказавшихся от исследования 911 человек 854 лица изначально заявили об отказе, 57 не явились на сдачу биологического материала для серологического исследования несмотря на данное ранее согласие (таблица 3).

Таблица 3 – Распределение участников исследования по месту проживания и характеру участия в серологическом исследовании

Регион Республики Беларусь	Всего запланировано участников			Приняли участие в серологическом исследовании			Получен отказ от лабораторного исследования		
	абс. число	%	95% ДИ		абс. число	%	95% ДИ		абс. число
Брестская область	504	13,34	12,38–14,44	458	90,71	88,02–93,11	44	8,89	6,55–11,54
Витебская область	252	6,68	5,91–7,50	178	70,47	64,73–75,92	73	29,13	23,71–34,86
Гомельская область	508	13,45	12,38–14,55	368	72,35	68,39–76,15	126	24,90	21,24–28,74
Гродненская область	372	9,85	8,92–10,82	196	52,67	47,61–57,71	159	42,78	37,81–47,82
Минская область	637	16,86	15,68–18,06	497	77,93	74,64–81,07	134	21,13	18,04–24,37
Могилевская область	250	6,63	5,86–7,45	240	95,63	92,70–97,91	10	4,37	2,09–7,30
г. Минск	1260	33,32	31,82–34,3	935	74,17	71,72–76,55	308	24,48	22,15–26,89

При первичной постановке иммуноферментного анализа положительными на наличие HBsAg HBV оказались 53 (1,88 %; 95% ДИ: 1,41–2,41) проб.

На следующем этапе в подтверждающем (конфирматорном) тесте HBsAg HBV был определен только у 1 ребенка, что составило 3,64 % (95% ДИ: 0,01–10,88) от первично положительных проб и 0,03 % (95% ДИ: 0,00–0,22) из 2872 обследованных лиц.

По уточненным данным, HBsAg HBV обнаружен у участника женского пола, 2012 года рождения, проживающего в городском регионе области М., имеющего в медицинской документации сведения о 3 дозах вакцины Euvaх В, первая из которых введена своевременно, последующие — с нарушениями временных интервалов между прививками. В связи с обнаружением HBsAg сыворотка крови была дополнительно исследована на другие маркеры HBV. Получены следующие результаты: позитивный тест DNA HBV, субтип D3 без мутаций; негативные тесты HBeAg, anti-HBc-IgM, anti-HBsAg и anti-HDV-tot; позитивные тесты anti-HBV-to-Ig, anti-HBeAg-Ig.

Заключение. Полученный результат национального сероэпидемиологического исследования определил распространность HBsAg HBV, равную 0,03 % (95% ДИ: 0,00–0,22), что соответствует целевому критерию ($\leq 0,5\%$) регионального достижения показателей по контролю HB среди привитых когорт детского населения в Республике Беларусь и позволяет подтвердить данный статус для страны.

В апреле 2023 г. Республика Беларусь получила сертификат подтверждения достижения целевых показателей по контролю HB на уровне Европейского региона ВОЗ наравне

с такими странами, как Нидерланды, Италия, Грузия, Республика Молдова, Соединенное Королевство.

Эффективность тактики универсальной вакцинации против HB подтверждается сокращением вплоть до полного отсутствия в отдельные годы случаев заражения HB среди детей. Для Республики Беларусь на фоне поддержания высокого уровня охвата вакцинацией детей до 1 года жизни необходимо сконцентрировать усилия на повышении своевременности проведения вакцинации против HB, прежде всего введения первой дозы вакцины.

Поддержание высокого уровня охвата вакцинацией против HB и своевременная вакцинация при рождении являются необходимыми условиями сохранения низкого уровня новых случаев инфицирования вирусом HB в будущих возрастных когортах. В современных условиях целесообразно сосредоточить усилия по ликвидации HB на реализации превентивных вмешательств среди возрастных групп, родившихся до того, как вакцина против HB была внедрена в стране.

Исследование проведено при поддержке Европейского бюро ВОЗ.

Протокол исследования и сопроводительные документы (алгоритм забора биологического материала, алгоритм заполнения формы сбора информации и информированного согласия, форма сбора информации, информированное согласие, информация для родителей) были одобрены Комитетом по этике государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (выписка из протокола № 5 заседания Комитета по этике БелМАПО от 18.04.2022).

Список цитированных источников

1. Progress Toward Hepatitis B Control and Elimination of Mother-to-Child Transmission of Hepatitis B Virus. Western Pacific Region, 2005–2017 / J. Woodring [et al.] // MMWR. – US Department of Health and Human Services; Centers for Disease Control and Prevention March 1, 2019. – Vol. 68. – N 8. – P. 195–200.
2. Hepatitis B virus infection in children and adolescents / G. Indolfi [et al.] // Lancet Gastroenterol Hepatol. – 2019. – N 4. – P. 466–476.
3. Progress Toward Hepatitis B Control. World Health Organization European Region, 2016–2019 / N. Khetsuriani [et al.] // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. – 2021. – Vol. 70. – P. 1029–1035.
4. Viral hepatitis [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.who.int/europe/ru/publications/i/item/WHO-EURO-2017-2389-42144-58061>. – Date of access: 30.05.2024.
5. Monitoring and evaluation for viral hepatitis B and C: Recommended indicators and framework. World Health Organization, Geneva, 2016. [Electronic resource]. – Mode of access: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204790/1/9789241510288_eng.pdf?ua=1. – Date of access: 30.05.2024.

Determination of HBsAg prevalence among children born in 2009–2015 in the Republic of Belarus

*Vysotskaya V.¹, Kolomiets N.², Gasich E.³, Glinskaya I.¹, Romanova O.⁴, Dashkevich A.¹,
Karaban I.⁵, Gapienko E.⁶*

*¹Republican Center of Hygiene, Epidemiology and Public Health,
Minsk, Republic of Belarus;*

*²Institute of Professional Development and Retraining of Health Care Personnel
of Belarusian State Medical University,
Minsk, Republic of Belarus;*

*³Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology»,
Minsk, Republic of Belarus;*

*⁴Belarusian State Medical University,
Minsk, Republic of Belarus;*

⁵Ministry of Health of the Republic of Belarus;

*⁶N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus,
Minsk District, Lesnoy, Republic of Belarus*

One of the goals for the fight against hepatitis B in the WHO European Region (WHO Europe) is the prevalence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) at a level of $\leq 0.5\%$ in vaccinated cohorts. In a seroepidemiological study conducted in the Republic of Belarus in 2022, 2872 children born in 2009–2015 found that the prevalence of HBsAg HBV was 0.03 % (95 CI: 0.00–0.22 %). The obtained result corresponds to the achievement of the control regional goal of HBV elimination in the Republic of Belarus — the prevalence of HBsAg $\leq 0.5\%$ among vaccinated cohorts.

Keywords: hepatitis B, HBV, HBsAg, vaccination, epidemiologic process, serologic study.

Поступила 05.06.2024



УДК: 616.98:578.834.1SARS-COV-2]-036.22(476.7) "2021"

СЕРОПРЕВАЛЕНТНОСТЬ НАСЕЛЕНИЯ МИНСКОЙ ОБЛАСТИ К ВИРУСУ SARS-CoV-2 В 2021 ГОДУ

Дашкевич А. М.¹, Коломиец Н. Д.², Глинская И. Н.¹, Самойлович Е. О.³,
Колодкина В. Л.³, Ермолович М. А.³, Дронина А. М.³, Карабан И. А.⁴, Тарасенко А. А.⁵,
Загорская Т. О.⁵

¹Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь;

²Государственное учреждение образования «Белорусский государственный медицинский
университет», Минск, Республика Беларусь;

³Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь;

⁴Министерство здравоохранения Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь;

⁵Государственное учреждение «Минский областной центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Результаты продольного стратифицированного по возрасту популяционного исследования показали значительный уровень серопревалентности среди населения Минской области Республики Беларусь к RBD-фрагменту S-белка SARS-CoV-2 на первом этапе исследования (59,7 %), и его дальнейший рост ко второму и третьему этапам исследования (70,9 и 78,4 % соответственно). Наибольшая доля серопозитивных установлена среди лиц с активным образом жизни, а также работников организаций здравоохранения и учреждений образования.

Ключевые слова: серопревалентность, коронавирус SARS-CoV-2, COVID-19, популяционный иммунитет, эпидемический процесс.

Введение. Развившаяся в конце 2019 г. ситуация с COVID-19, связанная с распространением коронавируса SARS-CoV-2, 30 января 2020 г. официально была объявлена чрезвычайной в области общественного здравоохранения на международном уровне и 11 марта 2020 г. получила статус пандемии, которая продлилась до 5 мая 2023 г. За этот период было зарегистрировано 765 222 932 случаев заболевания, умерло 6 921 614 человек (в том числе более 980 тысяч заболевших и 7 тысяч умерших человек в Республике Беларусь).

Продолжающий циркулировать вирус SARS-CoV-2 постоянно мутирует, образуя штаммы с различными эпидемиологическими, клиническими и биологическими характеристиками. Эпидемический процесс характеризуется волнообразным течением и по-прежнему имеется немало вопросов, на которые важно ответить для управления возможным обострением эпидемиологической ситуации, поэтому коронавирусная инфекция продолжает оставаться одной из самых

сложных медицинских проблем в мире, в том числе в Республике Беларусь [1].

За практически 2,5-летний прошедший период общемировые успехи в борьбе с пандемией стали очевидными и в настоящее время повсеместно фиксируется спад эпидемического процесса.

В беспрецедентно короткие сроки были созданы вакцины, которые позволили спасти сотни тысяч человеческих жизней и существенно повлиять на распространение вируса SARS-CoV-2. Однако пути формирования популяционного иммунитета как после перенесенного заболевания, так и в результате специфической профилактики, его роль в сдерживании распространения COVID-19 требуют более детального осмысления.

С учетом вышеизложенного, значимой составляющей эпидемиологического сложения за новой коронавирусной инфекцией является оценка динамики и путей формирования популяционного иммунитета. Результаты исследования иммунной прослойки к вирусу SARS-CoV-2

используются для прогнозирования развития эпидемического процесса, актуализации и дополнения мероприятий по предупреждению распространения инфекции.

Цель работы – оценить уровень популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 и факторов риска развития COVID-19 среди населения Минской области Республики Беларусь на втором году пандемии.

Материалы и методы. Изучение популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Республики Беларусь, в том числе Минской области, было организовано в рамках сотрудничества с ВОЗ, одобрено Комитетом по биоэтике Республики Беларусь. Продольное стратифицированное по возрасту сероэпидемиологическое исследование популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 выполнено в соответствии с протоколом, разработанным ВОЗ [2] и адаптированным для Республики Беларусь (*An age-stratified seroepidemiological investigation protocol for COVID-19 infection in the Republic of Belarus (30 November 2020. Revised 17 June 2021)*), а также согласно приказам Министерства здравоохранения Республики Беларусь [3, 4, 5].

В Минской области были выбраны 3 контрольные территории: Минский, а также Слуцкий и Узденский районы, определенные как территории с высоким и низким уровнями заболеваемости на момент планирования исследования по отношению к другим районам Минской области. Исследование предусматривало 3 этапа, включавших анкетирование и изучение серопревалентности к RBD-участку S-белка SARS-CoV-2 среди населения.

Набор участников осуществлялся на добровольной основе – из числа лиц, посещающих организацию здравоохранения за медицинской помощью в конкретный(ые) день (дни) недели, в том числе к обращающимся к «узким» специалистам, в процедурные кабинеты поликлиник с целью сдачи венозной крови на анализ. Лица, принявшие участие в исследовании на первом его этапе, были приглашены для участия на втором и третьем этапах исследования. На каждом этапе перед забором крови медицинским работником-анкетером было проведено анкетирование участника либо его законного представителя, с использованием ранее разработанной анкеты, включавшей как общие вопросы, так и вопросы в отношении COVID-19. Каждым из участников либо законным представителем было подписано информированное согласие на участие в данном исследовании.

Лабораторные исследования были выполнены в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии». Определение суммарных (IgM и IgG) антител к SARS-CoV-2 осуществляли с помощью качественной иммуноферментной тест-системы Wantai SARS-CoV-2 Total Ab (Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise, Пекин, Китай) в соответствии с протоколом производителя.

Систематизация и последующий анализ данных проведены с использованием электронной базы данных на платформе Microsoft Access, в которую внесены сведения из анкет обследуемых, а также результаты исследования антител к SARS-CoV-2. Обработку полученных данных проводили с применением пакета статистических программ Excel 2010. Доверительные интервалы (95% ДИ) и статистическую значимость различий рассчитывали с помощью соответствующих онлайн-калькуляторов [6, 7].

Авторы выражают благодарность работникам организаций здравоохранения Минской области за помощь и участие в проведении данного исследования.

Результаты и их обсуждение. Первый случай новой коронавирусной инфекции в Республике Беларусь был зарегистрирован в конце февраля 2020 г. в г. Минске. По эпидемиологическим и впоследствии молекулярно-генетическим данным он классифицирован как завозной из Ирана.

Первый заболевший COVID-19 в Минской области был выявлен 12 марта 2020 г., спустя 2 недели с момента регистрации индексного случая в стране. Учитывая, что в ориентировочные сроки заражения заболевший находился в Европе (Италии), случай был классифицирован как завозной.

Исследование по оценке уровня популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Республики Беларусь, включая Минскую область, реализовано на втором году пандемии COVID-19.

Первый этап исследований проведен в конце февраля – начале марта 2021 г., эпидемический процесс COVID-19 в республике в этот период характеризовался снижением заболеваемости второго периода подъема.

Второй этап исследований реализован в конце мая – начале июня 2021 г., данный промежуток времени являлся серединным, входящим в диапазон между вторым и третьим подъемом заболеваемости коронавирусной инфекцией от начала пандемии. Показатели заболеваемости в этот период были минимальными по сравнению с

таковыми в предыдущий и последующий этапы исследования. Проведенный в конце сентября – начале октября 2021 г. третий этап исследований пришелся на очередной подъем заболеваемости, характеризующийся наиболее высокими показателями заболеваемости.

На первом этапе в исследовании приняли участие 630 жителей Минской области. При этом как на данном, так и на двух последующих этапах среди участников преобладало женское население (71,6, 74,9 и 76,9 % соответственно).

Доля лиц с наличием антител к RBD-фрагменту S-белка SARS-CoV-2 на первом этапе

составила 59,7 % (95% ДИ 55,7–63,5). Наиболее высокий уровень серопревалентности был у жителей Минского района, антитела к вирусу SARS-CoV-2 обнаружены у 62,5 % (95% ДИ 56,6–68,2) из 283 обследованных.

Однако достоверных отличий в уровне серопревалентности среди участников различных районов Минской области не установлено.

Значимых гендерных отличий не установлено: доля серопозитивных лиц была примерно одинакова и составила 61,2 % (95% ДИ 56,6–65,7) среди женщин и 55,9 % (95% ДИ 48,3–63,3) среди мужчин (таблица 1).

Таблица 1 – Серопревалентность населения Минской области к RBD-фрагменту S-белка SARS-CoV-2 на первом этапе исследования

Адми- нист-ра- тивная террито- рия	Участники								
	Общее количество			Женщины			Мужчины		
	Всего	Серо- пози- тив- ные	% (95% ДИ)	Всего	Серо- пози- тив- ные	% (95% ДИ)	Всего	Серо- пози- тив- ные	% (95% ДИ)
Минский район	283	177	62,5 (56,6–68,2)	216	136	63,0 (56,2–69,4)	67	41	61,2 (48,5–72,9)
Слуцкий район	246	143	58,1 (51,7–64,4)	171	102	59,7 (51,9–67,1)	75	41	54,7 (42,8–66,2)
Узденский район	101	56	55,5 (45,2–65,3)	64	38	59,4 (46,4–71,5)	37	18	48,7 (31,9–65,6)
Минская область	630	376	59,7 (55,7–63,5)	451	276	61,2 (56,5–65,7)	179	100	55,9 (48,3–63,3)

На втором этапе в исследовании приняли участие 398 человек (63,2 % от принявших участие в исследовании на первом этапе).

Серопревалентность к RBD-фрагменту S-белка SARS-CoV-2 населения Минского и Слуцкого районов, а также Минской области достоверно увеличилась ($p<0,05$), составив 74,4 (95% ДИ 67,5–81,3), 69,1 (95% ДИ 61,5–77,1) и 70,9 % (95% ДИ 66,1–75,3) соответственно. Значимых различий в уровне серопозитивности среди участников различных районов Минской области не установлено.

Вместе с тем по-прежнему наибольшее количество серопозитивных лиц – 74,9 % (95% ДИ 67,5–81,3) – установлено среди участников из Минского района, наименьшее – 65,6 % (95% ДИ

55,0–75,1) – среди участников из Узденского района.

Доля серопозитивных лиц среди женщин и мужчин статистически не отличалась и составила 71,5 (95% ДИ 66,0–76,5) и 69,0 % (95% ДИ 59,0–78,0) соответственно (таблица 2). На третьем этапе в исследовании приняли участие 334 человека (53,0 % от принявших участие в первом этапе, 83,9 % от принявших участие во втором этапе). Доля серопозитивных лиц среди населения Минской области достоверно увеличилась, составив 78,4 % (95% ДИ 73,6–82,7). Однако статистически значимых отличий уровня серопревалентности среди участников из различных районов, а также среди мужчин и женщин не установлено (таблица 3).

Таблица 2 – Серопревалентность населения Минской области к RBD-фрагменту S-белка SARS-CoV-2 на втором этапе исследования

Адми-нист-ративная террито-рия	Число участников								
	Общее количество			Женщины			Мужчины		
	Всего	Серо-пози-тивные	% (95% ДИ)	Всего	Серо-пози-тивные	% (95% ДИ)	Всего	Серо-пози-тивные	% (95% ДИ)
Минский район	163	122	74,9 (67,5–81,3)	127	94	74,0 (65,5–81,4)	36	28	77,8 (60,9–89,9)
Слуцкий район	142	99	69,7 (61,5–77,1)	110	77	70,0 (60,5–78,4)	32	22	68,8 (50,0–83,9)
Узденский район	93	61	65,6 (55,0–75,1)	61	42	68,9 (55,7–80,1)	32	19	59,4 (40,6–76,3)
Минская область	398	282	70,9 (66,1–75,3)	298	213	71,5 (66,0–76,5)	100	69	69,0 (59,0–78,0)

Таблица 3 – Серопревалентность населения Минской области к RBD-фрагменту S-белка SARS-CoV-2 на третьем этапе исследования

Адми-нист-ративная террито-рия	Число участников								
	Общее количество			Женщины			Мужчины		
	Всего	Серо-пози-тивные	% (95% ДИ)	Всего	Серо-пози-тивные	% (95% ДИ)	Всего	Серо-пози-тивные	% (95% ДИ)
Минский район	139	115	82,7 (75,4–88,6)	113	95	84,1 (76,0–90,3)	26	20	76,9 (56,4–91,0)
Слуцкий район	112	88	78,6 (69,8–85,8)	88	67	76,1 (65,9–84,6)	24	21	87,5 (67,6–97,3)
Узденский район	83	59	71,1 (60,1–80,5)	56	44	78,6 (65,6–88,4)	27	15	55,6 (35,3–74,5)
Минская область	334	262	78,4 (73,6–82,7)	257	206	80,2 (74,8–84,9)	77	56	72,7 (61,4–82,3)

В целом, от первого к третьему этапу доля серопозитивных участников увеличилась на 18,8 % — с 59,7 до 78,4 % ($p<0,05$).

При оценке серопревалентности в различных возрастных группах населения на первом этапе статистически значимых различий среди детского и взрослого населения не выявлено. Доля серопозитивных среди детей в возрасте 1–17 лет составила 59,8 % (95% ДИ 50,1–69,0), среди взрослых — 59,7 % (95% ДИ 55,3–63,9). Наименьшая доля лиц, имеющих антитела к RBD-фрагменту S-белка SARS-CoV-2, была в возрастной группе 70 лет и старше — 39,1 % (95% ДИ 27,1–52,1), а наибольшая — в возрастной группе 10–17 лет — 68,2 % (95% ДИ 52,4–81,4) ($p<0,05$).

На втором этапе уровень серопревалентности увеличился во всех возрастных группах, однако существенных отличий в уровне серопозитивности среди детского и взрослого населения не установлено. Как и на первом этапе, наибольшая доля серопозитивных лиц выявлена в

возрастной группе 10–17 лет — 77,8 % (95% ДИ 57,7–91,4), наименьшая — среди лиц 70 лет и старше — 53,3 % (95% ДИ 34,3–71,7).

По результатам третьего этапа исследования отмечено увеличение уровня серопревалентности во всех возрастных группах. Как и на двух предыдущих этапах исследования, максимальная доля серопозитивных лиц оказалась среди участников в возрасте 10–17 лет — 86,7 % (95% ДИ 59,5–98,3). Наименьший уровень серопозитивности установлен в возрастных группах 40–49 лет и 70 лет и старше — 73,4 (95% ДИ 60,9–83,7) и 73,5 % (95% ДИ 55,6–87,1) (таблица 4).

Распространение инфекционных заболеваний, особенно воздушно-капельным и контактным путями передачи, во многом зависит от социального поведения человека. В Республике Беларусь в целях предупреждения распространения COVID-19 наряду с принятием нормативных правовых актов, регламентирующих проведение санитарно- противоэпидемических мероприятий, активно внедрялись среди населения меры по

социальному дистанцированию, использованию средств защиты органов дыхания, соблюдению гигиены рук.

С учетом вышеизложенного, на первом этапе исследования на основании данных анкет участников проведено изучение влияния на уровень серопревалентности факторов риска, связанных с образом жизни, а также пользованием общественным транспортом.

При анализе оценки рисков, связанных с образом жизни, установлено, что из 619 участников, ответивших на вопросы анкеты, 480 указали, что продолжают активный образ жизни, 139 отметили, что активность снижена (контакты ограничены).

Доля серопозитивных лиц среди группы участников с активным образом жизни составила 62,3 % (95% ДИ 57,8–66,6) и была достоверно выше по сравнению с таковой среди участников со сниженной активностью образа жизни – 51,8 % (95% ДИ 43,2–60,4) ($p<0,05$).

Среди участников – жителей Минского района в оценке рисков, связанных с образом жизни, приняли участие 280 человек: 217 указали, что продолжают активный образ жизни, и 63 отметили, что активность снижена.

Уровень серопревалентности в первой группе составил 65,0 % (95% ДИ 58,2–71,3), во второй – 54,0 % (95% ДИ 40,9–66,6).

В Слуцком районе 193 участника указали, что продолжают активный образ жизни и 50 отметили, что активность снижена. Доля серопозитивных лиц среди группы участников с активным образом жизни составила 60,1 % (95% ДИ 52,8–67,1), среди участников со сниженной активностью образа жизни 50,0 % (95% ДИ 35,5–64,5). В Узденском районе, согласно анкетным данным, продолжают активный образ жизни 70 человек и снижена активность у 26. Уровень серопревалентности в первой группе составил 60,0 % (95% ДИ 47,6–71,5), во второй – 50,0 % (95% ДИ 30,0–70,1) (таблица 5)

В оценке факторов риска, связанных с использованием общественного транспорта, участие приняли (ответили на вопросы анкеты) 619 участников.

Статистически значимых различий в уровне серопревалентности среди лиц, пользующихся общественным транспортом (часто или иногда), и среди участников, не использующих общественный транспорт, не установлено (таблица 6).

Таблица 5 – Результаты оценки рисков, связанных с образом жизни

Административная территория	Образ жизни	Количество участников	Серопозитивные	
			Абс.	Серопревалентность, % (95% ДИ)
Минский район	Активность снижена ¹⁾	63	34	54,0 (40,9–66,6)
	Активный образ жизни ²⁾	217	141	65,0 (58,2–71,3)
Слуцкий район	Активность снижена ¹⁾	50	25	50,0 (35,5–64,5)
	Активный образ жизни ²⁾	193	116	60,1 (52,8–67,1)
Узденский район	Активность снижена ¹⁾	26	13	50,0 (30,0–70,1)
	Активный образ жизни ²⁾	70	42	60,0 (47,6–71,5)
Минская область	Активность снижена ¹⁾	139	72	51,8 (43,2–60,4)
	Активный образ жизни ²⁾	480	299	62,3 (57,8–66,6)

Примечание: ¹⁾Контакты ограничены. ²⁾Контакты не ограничены.

Таблица 6 – Оценка серопозитивности с учетом использования общественного транспорта (среди участников Минской области)

Использование общественного транспорта	Количество участников	Серопозитивные	
		Абс.	Серопревалентность, % (95% ДИ)
Да	268	159	59,3 (53,2–65,3)
Иногда	144	90	62,5 (54,1–70,4)
Нет	207	123	59,4 (52,4–66,2)

Таблица 4 – Характеристика серопревалентности к RBD-фрагменту S-белка SARS-CoV-2 в возрастных группах населения Минской области

Возраст-ная группа, лет	Первый этап			Второй этап			Третий этап		
	Всего (абс.)	Серопози-тивные	Серопрева-лентность, % (95% ДИ)	Всего (абс.)	Серопози-тивные	Серопрева-лентность, % (95% ДИ)	Всего (абс.)	Серопози-тивные	Серопрева-лентность, % (95% ДИ)
1–9	68	37	54,4 (41,9–66,6)	48	31	64,6 (49,5–77,8)	23	16	69,6 (47,1–86,8)
10–17	44	30	68,2 (52,4–81,4)	27	21	77,8 (57,7–91,4)	15	13	86,7 (59,5–98,3)
1–17	112	67	59,8 (50,1–69,0)	75	52	69,3 (57,6–79,5)	38	29	76,3 (59,8–88,6)
18–29	92	59	64,1 (53,5–73,9)	61	45	73,8 (60,9–84,2)	44	34	77,3 (62,2–88,5)
30–39	108	63	58,3 (48,5–67,8)	65	45	69,2 (56,6–80,1)	59	50	84,8 (73,0–92,8)
40–49	95	61	64,2 (53,7–73,8)	68	48	70,6 (58,3–81,0)	64	47	73,4 (60,9–83,7)
50–59	84	56	66,7 (55,5–76,6)	57	44	77,2 (64,2–87,3)	49	41	83,7 (70,3–92,7)
60–69	75	45	60,0 (48,0–71,2)	42	32	76,2 (60,6–88,0)	46	36	78,3 (63,6–89,1)
70 и старше	64	25	39,1 (27,1–52,1)	30	16	53,3 (34,3–71,7)	34	25	73,5 (55,6–87,1)
18 и старше	518	309	59,7 (55,3–63,9)	323	230	65,9 (65,9–76,1)	296	233	78,7 (73,6–83,2)
Итого	630	376	59,7 (55,7–63,5)	398	282	70,9 (66,1–75,3)	334	262	78,4 (73,6–82,7)

Социальная активность населения во многом связана с профессией и является еще одним фактором риска в распространении коронавирусной инфекции.

В этой связи представляла интерес оценка уровня серопревалентности среди различных профессиональных групп. Для этого анализа участники из числа работающего населения были разделены на 5 групп: работники организаций здравоохранения; работники сферы общественного питания, торговли, услуг и транспорта; работники учреждений образования; работники промышленных предприятий и представители бизнеса; прочие работники.

Полученные результаты показали, что на первом этапе наибольший уровень серопозитивности у работающего населения был выявлен среди работников организаций здравоохранения – 67,8 % (95% ДИ 59,6–75,3), наименьший – среди работников промышленных предприятий и

представителей бизнеса – 52,8 % (95% ДИ 41,9–63,5) ($p<0,05$).

Ко второму этапу исследования доля серопозитивных лиц увеличилась во всех профессиональных группах.

Максимальный уровень серопревалентности отмечен среди работников образования – 76,5 % (95% ДИ 58,8–89,3), наименьший – по-прежнему среди работников промышленных предприятий, бизнеса – 66,7 % (95% ДИ 47,2–82,7).

По результатам третьего этапа исследования уровень серопревалентности среди работников промышленных предприятий и представителей бизнеса снизился до 60,0 % (95% ДИ 38,7–78,9), среди прочих работников остался на уровне, аналогичном второму этапу – 70,0 % (95% ДИ 50,6–85,3). Наибольшая доля серопозитивных лиц, как и на втором этапе, была выявлена среди работников образования – 87,5 % (95% ДИ 71,0–96,5) (таблица 7).

Таблица 7 – Общая характеристика серопревалентности к RBD-фрагменту S-белка SARS-CoV-2 среди профессиональных групп

Профессиональная группа	Первый этап			Второй этап			Третий этап		
	Всего (абс.)	Серопозитивные	Серопревалентность, % (95% ДИ)	Всего (абс.)	Серопозитивные	Серопревалентность, % (95% ДИ)	Всего (абс.)	Серопозитивные	Серопревалентность, % (95% ДИ)
Здравоохранение	146	99	67,8 (59,6–75,3)	95	72	75,8 (65,9–84,0)	86	72	83,7 (74,2–90,8)
Образование	49	32	65,3 (50,4–78,3)	34	26	76,5 (58,8–89,3)	32	28	87,5 (71,0–96,5)
Общественное питание, торговля, сфера обслуживания, транспорт	89	47	55,8 (41,3–69,5)	61	41	67,2 (54,0–78,7)	53	41	77,4 (63,8–87,7)
Промышленные предприятия, бизнес	52	29	52,8 (41,9–63,5)	30	20	66,7 (47,2–82,7)	25	15	60,0 (38,7–78,9)
Прочие	53	33	62,3 (47,9–75,2)	30	21	70,0 (50,6–85,3)	30	21	70,0 (50,6–85,3)
Итого	389	240	61,7 (56,7–66,6)	250	180	72,0 (66,0–77,5)	226	177	78,3 (72,4–83,5)

Заключение. Результаты продольного стратифицированного по возрасту популяционного исследования показали уже на первом этапе исследования (конец февраля – начало марта 2021 г.) значительный уровень серопревалентности населения Минской области Республики Беларусь к RBD-фрагменту S-белка SARS-CoV-2, составивший 59,7 %, и его дальнейший рост ко второму и третьему этапам исследования (70,9 и 78,4 % соответственно). При оценке серопревалентности в различных возрастных группах населения статистически значимых различий среди детского и взрослого населения не выявлено.

По результатам всех 3 этапов исследования наибольшая доля лиц, имеющих антитела к RBD-фрагменту S-белка SARS-CoV-2, была в возрастной группе 10–17 лет.

Наименьший уровень серопозитивности на первом и втором этапе установлен среди лиц в возрасте 70 лет и старше, на третьем этапе – в воз-

растных группах 40–49 лет и 70 лет и старше. При оценке влияния на уровень серопревалентности факторов риска, связанных с образом жизни, установлено, что доля серопозитивных лиц среди группы участников с активным образом жизни была достоверно выше по сравнению с таковой среди участников со сниженной активностью образа жизни. При оценке факторов риска, связанных с использованием общественного транспорта, статистически значимых различий не выявлено. Оценка уровня серопревалентности среди различных профессиональных групп на первом этапе исследования продемонстрировала наибольшую долю серопозитивных лиц среди работников организаций здравоохранения, являющихся основной группой риска по COVID-10 вследствие их тесных профессиональных контактов с пациентами. По результатам второго и третьего этапов наибольший уровень серопревалентности отмечен среди работников образования.

Список цитированных источников

1. With the international public health emergency ending, WHO/Europe launches its transition plan for COVID-19 [Electronic resource]. – WHO, 2023. – Mode of access: <https://www.who.int/europe/news/item/12-06-2023-with-the-international-public-health-emergency-ending--who-europe-launches-its-transition-plan-for-covid-19>. – Date of access: 10.05.2024.
2. WHO Population-based age-stratified seroepidemiological investigation protocol for coronavirus 2019 (COVID-19) infection [Electronic resource]. WHO, 2020. – Mode of access: <https://www.who.int>. – Date of access: 10.05.2024.
3. Об изучении популяционного иммунитета населения Республики Беларусь к COVID-19 [Электронный ресурс]: приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19.02.2021 № 167. – Режим доступа: <https://www.minzdrav.gov.by>. – Дата доступа: 14.05.2024.
4. О проведении второго этапа изучения популяционного иммунитета к COVID-19 (совместное исследование с Всемирной организацией здравоохранения) [Электронный ресурс]: приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 31.05.2021 № 627. – Режим доступа: <https://www.minzdrav.gov.by>. – Дата доступа: 14.05.2024.
5. О проведении третьего этапа изучения популяционного иммунитета к COVID-19 (совместное исследование с Всемирной организацией здравоохранения) [Электронный ресурс]: приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 14.09.2021 № 1110. – Режим доступа: <https://www.minzdrav.gov.by>. – Дата доступа: 14.05.2024.
6. Калькулятор доверительных интервалов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://measuringu.com/calculators/wald/>. – Дата доступа: 19.05.2024.
7. Калькулятор расчета статистической значимости различий [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.aatc.top/raschet-oshibki-vyborki>. – Дата доступа: 19.05.2024.



Seroprevalence of the population of the Minsk region to the SARS-CoV-2 virus in 2021

Dashkevich A. M.¹, Kolomiet N. D.², Hlinskaya I. N.¹, Samoilovich E. O.³, Kolodkina V. L.³, Yermolovich M. A.³, Dronina A. M.³, Karaban I. A.⁴, Tarasenka A. A.⁵, Zagorskaya T. O.⁵

¹Republican Center of Hygiene, Epidemiology and Public Health,
Minsk, Republic of Belarus;

²Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus;

³Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk,
Republic of Belarus;

⁴Ministry of Health of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus;

⁵Minsk Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus

The results of the longitudinal age-stratified population study showed a significant level of seroprevalence among the population of Minsk region of the Republic of Belarus to the RBD fragment S of SARS-CoV-2 protein at the first stage of the study (59.7 %), and its further increase by the second and third stages of the study (70.9 and 78.4 %, respectively). The highest proportion of seropositive individuals was found among people with active lifestyles, as well as employees of health care organizations and educational institutions.

Keywords: seroprevalence, SARS-CoV-2 coronavirus, COVID-19, population immunity, epidemic process.

Поступила 05.06.2024

УДК [615.9:547.631.42]+615.256.51

ОЦЕНКА ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ФУНГИЦИДА НА ОСНОВЕ МЕТАМИТРОНА В БАТАРЕЕ ТЕСТОВ

Дудчик Н. В., Дроздова Е. В., Емельянова О. А., Фираго А. В., Суровец Т. З.

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. В соответствии с основным принципом лабораторного биотестирования проведена оценка интегральной токсичности действующего вещества фунгицида на основе метамитрона в батарее тестов, составленной из трех краткосрочных тестов: по кинетическим параметрам развития консорциума *Pseudomonas* spp., на тест-культуре одноклеточных протококковых водорослей с оптическим принципом детекции и в аггравированном тесте с использованием тест-культуры *Daphnia magna* (Straus). Обоснована целесообразность батареи тестов, основанной на биологической роли разных видов организмов, обладающих различной чувствительностью к химическим контаминалтам, в сложных эутрофических системах.

Ключевые слова: экспресс-методы, интегральная токсичность, гидробионты, экспериментальное моделирование, факторы среды обитания.

Введение. В соответствии с основным принципом лабораторного биотестирования целесообразно проведение лабораторного моделирования для оценки показателя интегральной токсичности в батарее краткосрочных тестов. Тест-

объекты должны представлять различные уровни организации биологических систем (прокариоты и эукариоты) и различные трофические группы экосистемы: рыбы, беспозвоночные, водоросли, бактерии. Такой концептуальный подход основан

на биологической роли разных видов организмов, обладающих различной чувствительностью к химическим контаминалтам, в сложных эутрофических системах [1–8].

Для оценки интегральной токсичности объектов окружающей среды целесообразно использование «батареи тестов» (набора тестов), состоящей из нескольких тест-систем, поскольку отдельно взятый тест не позволяет получить представительные объективные данные о токсичности [4, 9–12]. При составлении батареи тестов необходимо учитывать следующие основополагающие критерии: биотесты должны дополнять друг друга по чувствительности к различным группам химических веществ, маркеры оценки интегральной токсичности должны основываться на разных принципах детекции токсического воздействия и критериях оценки токсического воздействия (биохимические, физиологические, репродуктивные, поведенческие параметры жизнедеятельности и другие).

Разработка, валидация и последующее внедрение релевантных методов качественного выявления и количественной оценки факторов среды химической природы обеспечивает получение новых знаний о механизмах их воздействия на биологические структуры разного уровня организации, позволяет выявить и определить характер и выраженность их воздействий, обосновать и осуществить гигиеническое регламентирование неблагоприятных факторов среды обитания [4].

Для высокой степени стандартизации экспериментов используют тест-объекты из синхронизированной тест-культуры – генетически и физиологически однородной. Синхронизацию тест-культур применяют с целью нормирования тест-системы по стадии жизненного цикла тест-объектов. Она может осуществляться разнообразными методами, при использовании гидробионтов чаще применяют механический (селективный), предусмотренный в международных руководствах.

Для ракообразных он заключается в получении необходимого количества особей в 3-м поколении от одной самки, размножающейся партеногенетическим путем. Механический метод синхронизации достаточно эффективен и прост в использовании, а его пригодность в практическом применении служит весомым аргументом при выборе тест-организма для постановки биологических тестов.

Одной из последних тенденций совершенствования системы тестирования и оценок объектов среды обитания является максимальное

приближение методических подходов биотестирования к естественным условиям.

Это позволяет увеличить достоверность получаемых результатов исследований с позиции учета межвидовых взаимодействий. Обозначены несколько тенденций в данном направлении. Наиболее актуальным является разработка подходов по тестированию с применением стандартизованных тест-моделей и тест-моделей на основе видов организмов, характерных для местных экосистем.

Таким образом, научное обоснование концепции моделирования и оценки характера и выраженности биологического действия факторов среды различной природы на релевантных тест-моделях, методологии разработки на их основе адекватных и чувствительных методик с целью гигиенической оценки, регламентации и нормирования факторов среды является актуальным и приоритетным, но вместе с тем недостаточно изученным направлением профилактической медицины [1, 2, 4, 11].

Цель работы – обоснование целесообразности оценки показателя интегральной токсичности химического вещества 4-амино-3-метил-6-фенил-1,2,4-триазин-5-он (метамитрон) в батарее тестов, составленной из 3 краткосрочных тестов: по кинетическим параметрам развития консорциума *Pseudomonas spp.*, на тест-культуре одноклеточных протококковых водорослей с оптическим принципом детекции и в агрегированном teste с использованием тест-культуры *Daphnia magna* (Straus).

Материалы и методы. Объектом исследования являлся 4-амино-3-метил-6-фенил-1,2,4-триазин-5-он (метамитрон) — действующее вещество, которое используется в качестве регулятора роста растений. Метамитрон способствует уменьшению скорости роста стеблей и листьев растений, также может применяться для увеличения устойчивости растений к стрессовым условиям, таким как засуха, холод или жара.

В работе использовали следующие средства измерений, реактивы и оборудование: анализатор потенциометрический (рН-метр), автоклав вертикальный, аппарат для встряхивания, бактерицидные лампы, баня водяная с терморегулятором, весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г, гигрометр психрометрический типа ВИТ-1, дистиллятор, климатостат, спектрофотометр Hitachi U-5100, микробиологический анализатор с электрохимическим (импедансным) принципом детекции, микроскоп световой биологический с увеличением 900–1000.

Среда для культивирования *Pseudomonas* spp. (на 1000 мл воды): глюкоза – 3,2 г; кукурузный экстракт – 1,5 г; пептон – 0,5 г; натрий хлористый — 5,0 г; рН 7,2–7,4. Вода дистиллированная – до 1000 мл, рН среды 6,8. Стерилизация автоклавированием при 121 °C в течение 30 мин.

Тестирование проводили при температуре воздуха в лаборатории от 18 °C до 25 °C. Относительная влажность воздуха (80 ± 5 %). Атмосферное давление 84–106 кПа (630–800 мм рт. ст.). Проверку лабораторных культур на пригодность проводили тестированием растворов эталонных (референсных) веществ, на основании чего рассчитывают показатель эффективной концентрации ЭК₅₀. Тест-объект должен реагировать на действие таких веществ в установленном диапазоне. Референсное вещество, длительность теста и стандартный диапазон реагирования на референсное вещество установлены для каждого метода индивидуально. Если величина ЭК₅₀ находится в установленном диапазоне реагирования тест-объекта, культура тест-объекта пригодна для биотестирования.

Результаты и их обсуждение. Проведена оценка интегральной токсичности препартивной формы фунгицида метамитрона в диапазоне концентраций в батарее тестов.

Метод оценки интегральной токсичности водных объектов на тест-культуре одноклеточных протококковых водорослей с оптическим принципом детекции устанавливает методику определения интегральной токсичности с использованием тест-культуры пресноводных одноклеточных протококковых водорослей *Scenedesmus subspicatus* и основан на изучении динамики роста численности популяции оптическим методом. Метод биотестирования с использованием тест-культуры пресноводных одноклеточных протококковых водорослей *Scenedesmus subspicatus* основан на установлении различия между интенсивностью роста водорослей в анализируемой пробе (опыт) и культуральной среде (контроль).

Для количественной оценки интегральной токсичности обоснован показатель интегральной токсичности ИТ, рассчитываемый по формуле (1):

$$ИТ = (Ts_2 - Ts_1) / Ts_1 \cdot 100 \% \quad (1),$$

где Ts_1 – время наступления стационарной фазы в контроле, с внесением образца, ч; Ts_2 – время наступления стационарной фазы в опыте, без внесения образца, ч.

Мы предлагаем следующую количественную шкалу оценки ИТ: менее 25 % – низкая

токсичность, от 25 до 50 % – умеренно выраженная токсичность; от 50 до 75 % – выраженная токсичность, более 75 % – сильная токсичность.

Для биотестирования используют лабораторную альгологически чистую культуру одноклеточных протококковых водорослей *Scenedesmus subspicatus*, находящуюся в экспоненциальной стадии роста (3-суточную). Для поддержания экспоненциальной стадии роста водорослей пересев осуществляется регулярно 1 раз в 7 суток. Во время проведения эксперимента проводят измерения оптической плотности культуры путем отбора 2 см³ в начале опыта и через каждый час, соблюдая правила асептики. Измерения проводят на спектрофотометре Hitachi U-5100 при длине волны $\lambda = 540$ нм, длина оптического пути 1 см. За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое значение результатов 3 параллельных измерений. Метод оценки интегральной токсичности водных сред по кинетическим параметрам развития консорциума *Pseudomonas* spp. устанавливает методику определения токсичности с использованием в качестве тест-объекта консорциум водных микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa* 31-02102015 и *Pseudomonas mirabilis* 34-02102015. Изоляты получены в ходе гигиенического мониторинга водных объектов в зонах рекреации Минского района в весенне-летний период 2015 г. При тестировании используются кинетические маркеры консорциума микроорганизмов *Pseudomonas* spp. Для оценки роста тест-штамма выбирают параметр детекции таким образом, чтобы кривая роста тест-культур на соответствующих питательных средах имела характерный вид: стабильную базовую линию, выраженную фазу быстрого роста культуры и значительные значения изменений электрохимических показателей среды.

Величину лаг-периода (длительность начальной фазы роста) определяют с использованием показателя Impedance Detection Time (IDT) микробиологического анализатора.

С учетом этого нами выполнена модификация ростового теста с оптической детекцией с использованием инструментального высокопрекционного импедиметрического способа детекции. Для оценки токсических воздействий целесообразно определение продолжительности лаг-фазы кривой роста тест-штамма микроорганизма. Оценка степени токсического воздействия основывалась на сравнении параметров времени детекции IDT в контроле (IDT_к) и опыте (IDT_о), полученных с помощью программного обеспечения прибора.

Чувствительность к интегральному токсическому (T) воздействию для тест-культуры рассчитывали по формуле (2):

$$T = \frac{IDTo}{IDTk} \quad (2).$$

При $T = 1$ считали штамм нечувствительным, при $T = 1,1\text{--}1,5$ — умеренно чувствительным, при $T = 1,6$ и более — чувствительным к интегральному токсическому воздействию, при $T < 1$ считали тест-организм устойчивым к токсическому воздействию.

Экспресс-методика определения интегральной токсичности в экспресс-тесте основана на использовании в качестве тест-объекта низших ракообразных *Daphnia magna* (Straus) и определении их иммобилизации при воздействии химических веществ, присутствующих в исследуемой водной среде, по сравнению с контрольной культурой в пробах, не содержащих токсические вещества (контроль). В токсикологических исследованиях, в частности при биотестиировании, редко принимается во внимание температурный фактор, существенно влияющий на результаты биотестов. Критерии к выбору диапазона варьируемых температур основываются на представлении о том, что ферментные системы водных

организмов наиболее активно функционируют и, соответственно, наиболее уязвимы для действия токсикантов при температуре в пределах 18–25 °C. Температура денатурации белка, как правило, ограничивает допустимый интервал изменения температуры. От температуры зависят скорость поступления и выделения токсиканта, реакции, вызывающие повреждения, процессы, определяющие обезвреживание ксенобиотиков, и процессы репарации. При повышении температур на 4–15 °C различия в эффективности действия токсикантов могут выражаться резким возрастанием чувствительности в исследуемой пробе при условии, что в контролльном эксперименте иммобилизация не превышает 10 %.

Результаты экспериментальных исследований интегральной токсичности препартивной формы фунгицида метамитрон в батарее тестов, составленных из теста оценки интегральной токсичности водных сред по кинетическим параметрам развития консорциума *Pseudomonas spp.*, теста оценки интегральной токсичности водных объектов на тест-культуре одноклеточных протококковых водорослей с оптическим принципом детекции и теста оценки интегральной токсичности в агравированном тесте с использованием тест-культуры *Daphnia magna* (Straus), представлены в таблицах 1–3.

Таблица 1 – Результаты анализа токсичности фунгицида метамитрон по кинетическим параметрам развития консорциума *Pseudomonas spp.*

Тест-организм	Маркеры		
	Концентрация, мг/л	Длительность лаг-фазы, ч	Td, ч
<i>Консорциум Pseudomonas spp.</i>	Контроль	4,7±0,3	—
	1	5,5±0,7*	1,17
	8	6,0±0,5*	1,28
	32	6,3±0,6*	1,34
	64	7,05±0,4*	1,48
	100	7,99±0,4*	1,7

Примечание: * — статистически значимое различие средних значений в опыте и контроле $p < 0,05$.

Таблица 2 – Результаты анализа интегральной токсичности фунгицида метамитрон на тест-культуре одноклеточных протококковых водорослей с оптическим принципом детекции

Тестируемая концентрация, мг/л	Снижение N/N ₀ по отношению к контролю, %	Интегральная токсичность
Контроль	—	—
1	15,5	Умеренно выраженная токсичность
8	30,4	Умеренно выраженная токсичность
32	45,3	Выраженная токсичность
64	58,3	Выраженная токсичность
100	70,3	Сильная токсичность

Таблица 3 – Интегральная токсичность фунгицида метамитрон в отношении *D. magna* (Straus) в экспресс-тесте при температуре 25 °C

Тестируемая концентрация, мг/л	Число дафний в тесте	Иммобилизация дафний в эксперименте		
		48 ч экспозиции		Выраженность проявления
		Число	%	
Контроль	20	0	0	–
1	20	1	5	Низкая
8	20	4	20	Низкая
32	20	6	30	Умеренно выраженная
64	20	10	50	Выраженная
100	20	15	75	Сильная

Таким образом, полученные в эксперименте данные тестирования позволили оценить динамику токсичности водного раствора фунгицида метамитрон на тест-культуре одноклеточных протококковых водорослей с оптическим принципом детекции в диапазоне концентраций по показателю интегральной токсичности. Показатель демонстрировал умеренно выраженную токсичность в концентрациях 1 и 8 мг/л, выраженную — в концентрациях 32 и 64 мг/мл и сильную токсичность — в концентрации 100 мг/мл.

При изучении водного раствора фунгицида метамитрон в аграрированных условиях получено значение сильной интегральной токсичности для концентрации метамитрона 100 мг/л, однако диапазон концентраций 32–64 мг/л выявил умеренно выраженную и выраженную токсичность. Полученные результаты свидетельствуют, что препарат токсичен для рыб, беспозвоночных и водорослей.

Поскольку гигиенические нормативы и экологические нормативы содержания действующих веществ препарата в воде объектов хозяйствственно-питьевого и культурно-бытового водопользования в воде поверхностных водных объектов не установлены, можно сформулировать следующие рекомендации.

Учитывая токсикологические характеристики препартивной формы средства защиты растений, препарат не рекомендуется для

применения в водоохранной зоне поверхностных водных объектов рыбохозяйственного значения. Рекомендуется не допускать бесконтрольного попадания продукта в окружающую среду, загрязнения почвы, природных и технических водоемов и источников питьевой воды остатками препарата и водой, использовавшейся для промывки тары и оборудования. Запрещается выливать остатки препарата в канализацию. Избегать попадания препарата в корма.

Заключение. Проведена оценка интегральной токсичности фунгицида на основе метамитрона в батарее тестов.

Результаты экспериментальных исследований интегральной токсичности препартивной формы фунгицида метамитрон в батарее тестов, составленных из теста оценки интегральной токсичности водных сред по кинетическим параметрам развития консорциума *Pseudomonas spp.*, теста оценки интегральной токсичности водных объектов на тест-культуре одноклеточных протококковых водорослей с оптическим принципом детекции и теста оценки интегральной токсичности в аграрированном тесте с использованием тест-культуры *Daphnia magna* (Straus) подтвердили умеренно выраженную токсичность фунгицида на основе метамитрона в концентрациях 1 и 8 мг/л, выраженную — в концентрациях 32 и 64 мг/мл и сильную токсичность — в концентрации 100 мг/мл.

Список цитированных источников

1. Дроздова, Е. В. Медико-экологические риски в контексте устойчивого развития / Е. В. Дроздова // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр. / Респ. науч.-практ. центр гигиены, М-во здравоохранения Респ. Беларусь ; редкол. : С. И. Сычик [и др.]. — Минск, 2019. — Вып. 29. — С. 168–177.
2. Дудчик, Н. В. Кинетические и культурально-морфологические особенности чувствительных культур микроорганизмов при токсическом воздействии / Н. В. Дудчик, В. П. Филонов, И. П. Щербинская // Медицинский журнал. — 2010. — № 3 (33). — С. 143–145.

3. Дудчик, Н. В. Изучение свойств консорциума почвенных микроорганизмов как тест-объектов для оценки интегральной токсичности / Н. В. Дудчик // Гигиена и санитария. – 2012. – Т. 91, № 5. – С. 82–84.
4. Оценка интегральной токсичности факторов и объектов среды обитания с использованием альтернативных биологических тест-моделей: методология и технологии / Е. В. Дроздова [и др.]. – Минск : Белорус. науч.-исслед. ин-т трансп. «Транстехника», 2017. – 216 с.
5. Шевцова, Н. С. Туристско-рекреационный потенциал малых рек Витебской области / Н. С. Шевцова, Г. И. Марцинкевич, Е. В. Дроздова // Природные ресурсы. – 2013. – № 2. – С. 42–51.
6. Bacterial profiles and phenotypic biomarkers of microbiota isolates in habitat: hazard identification factors / N. V. Dudchik [et al.] // Health Risk Analysis. – 2020. – № 2. – Р. 92–100.
7. 1-Deaza and 3-deazapurines in the reaction of microbiological transglycosylation / I. A. Mikhailopulo [et al.] // Biotechnology Letters. – 1992. – Vol. 14, N 10. – P. 885–890.
8. Dudchik, N. V. Prokaryotic test models for environmental ecotoxicological research: prospects and classification / N. V. Dudchik, S. I. Sychik, V. V. Shevlyakov // Theoretical and Applied Ecology. – 2018. – N 4. – P. 12–16.
9. Microbial community structure and function in sediments from e-waste contaminated rivers at Guiyu area of China / J. Liu [et al.] // Environ. Pollut. 2018. – Vol. 235. – P. 171–179.
10. Parmar, T. K. D. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution / T. K. D. Parmar, Y. Rawtani, K. Agrawal // Frontiers in Life Science. – 2016. – Vol. 9, № 2. – P. 110–118.
11. Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination / X. Li [et al.] // Environ. Pollut. – 2017. – Part 1. – P. 908–917.
12. Synthesis of 2'-deoxythymidine by an enzymatic transdeoxyribonosylation / A. J Zinchenko [et al.] // Biotechnology Letters. – 1990. – Vol. 12, N 5. – P. 341–346.

Assessment of the integral toxicity of the fungicide metamitron in a battery of tests

*Dudchik N. V., Drazdova A. V., Emelyanova O. A., Firaho H. V., Suravets T. Z.
Scientific Practical Centre of Hygiene, Minsk, Republic of Belarus*

In accordance with the basic principle of laboratory biotesting, the integral toxicity of the active substance of the fungicide Metamitron was assessed in a battery of tests composed of three short-term tests: according to the kinetic parameters of the development of the *Pseudomonas* spp. consortium, on a test culture of unicellular protococcal algae with an optical detection principle, and in an aggravated test with using a test culture of *Daphnia magna* (Straus). The feasibility of a battery of tests based on the biological role of different types of organisms in complex eutrophic systems and different sensitivities to chemical contaminants is substantiated.

Keywords: express methods, integral toxicity, hydrobiants, experimental modeling, environmental factors.

Поступила 05.06.2024



УДК 615.281.9:57.083.32

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ АЛЛЕРГЕННОЙ ОПАСНОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ КЛИНДАМИЦИНА ГИДРОХЛОРИД В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА БЕЛЫХ МЫШАХ

Земцова В. О.¹, Богданов Р. В.¹, Шевляков В. В.¹, Филонюк В. А.^{1, 2},
Чернышова Е. В.¹, Баранов С. А.¹

¹Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,
г. Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Изучение сенсибилизирующих свойств антибактериальных лекарственных средств (АБЛС) является непременным этапом их гигиенического нормирования в воздухе рабочей зоны и атмосфере.

Унифицирована постановка методики воспроизведения сенсибилизации к АБЛС в экспериментах на белых мышах с применением для внутрикожного введения в основание хвоста стандартной дозы препарата по 100 мкг в смеси 1 : 1 с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) в объеме 0,06 см³ на животное и выявления гиперчувствительности замедленного типа провокационным внутрикожным тестом опухания лапы (ВТОЛ) в разрешающей дозе препарата 120–140 мкг, что позволяет использовать критерии оценки степени сенсибилизирующей способности и аллергенной опасности промышленных аллергенов и обеспечивает объективность изучения специфических свойств и классификации аллергенной опасности новых АБЛС.

При апробации экспериментальной модели воспроизведения и выявления сенсибилизации на белых мышах установлено, что фармацевтическая субстанция антибиотика (КГ) даже в дозе 10 мкг проявляла эффективное сенсибилизирующее действие на организм, а в стандартной дозе 100 мкг препарат сенсибилизовал 83,3 % опытных животных (10 из 12) с превышением среднегрупповой величины интегрального показателя ВТОЛ у опытных мышей таковой в контрольной группе в 7,3 раза со статистическим их различием при $p < 0,001$ по критерию t и при $p < 0,01$ по критерию «Х» (6,42). На этой основе фармацевтическая субстанция КГ дифференцирована как обладающая сильной сенсибилизирующей способностью и отнесена к 1-му классу аллергенной опасности (чрезвычайно опасный промышленный аллерген).

Ключевые слова: антибактериальные лекарственные средства, фармацевтическая субстанция клиндамицина гидрохлорид, сенсибилизирующая способность и класс аллергенной опасности, экспериментальная модель воспроизведения и выявления сенсибилизации на белых мышах.

Введение. Наиболее часто негативное специфическое действие АБЛС на организм проявляется аллергическими реакциями. Так, у 50 % лиц, профессионально контактирующих с антибиотиками, установлены те или иные проявления аллергической манифестации со стороны кожных покровов, слизистых оболочек, дыхательных путей [1, 2].

Сенсибилизирующая способность АБЛС определяется химическими свойствами и

структурой фармацевтических субстанций. Так, природные и частично полусинтетические АБЛС (антибиотики групп бензилпенициллинов, грамицидинов, полимиксинов, эритромицинов, тетрациклинов, цефалоспоринов и др.) как продукты микробиологического синтеза в основном являются полными антигенами, которые при поступлении в организм, особенно при повторном парентеральном и ингаляционном воздействии, формируют гипериммунный процесс со

смешанными механизмами всех четырех типов аллергической реакции с превалированием немедленного IgE-обусловленного анафилактического типа [3].

Полусинтетические и синтетические АБЛС – гаптены, способные конъюгировать с аутобелками организма и образовывать комплексный антиген, триггирующий гипериммунный ответ с развитием в основном аллергической реакции замедленного клеточноопосредованного типа гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [4].

Следовательно, изучение сенсибилизирующей способности АБЛС является непременным этапом обоснования их предельно допустимых концентраций в воздухе рабочей зоны (ПДКврз). В то же время в ранее действовавших в СССР методических указаниях по обоснованию ПДКврз антибиотиков приведены только требования определения сенсибилизирующего действия антибиотиков в соответствии с методическими рекомендациями «Постановка исследований по гигиеническому нормированию промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны» (МЗ СССР, № 2121-80) или рекомендациями по оценке аллергенных свойств фармакологических препаратов [5]. В указанных рекомендациях приведена схема токсикологического-аллергологических экспериментов, но только с использованием морских свинок – альбиносов или с крупными белыми пятнами на туловище как животных, наиболее чувствительных к воздействию аллергенов и пригодных для воспроизведения сенсибилизации всеми способами. Постановка методов не позволяет оценить степень выраженности сенсибилизирующей способности вещества и тем более классифицировать его аллергенную опасность, в отличие от определения токсического действия (ГОСТ 12.1.007-76).

Однако приобретение в настоящее время морских свинок, тем более альбиносов, затратно ввиду их высокой стоимости и труднодоступно из-за отсутствия в нашей стране питомника лабораторных животных.

Вместе с тем аллергия к химическим веществам (контактный дерматит, фотодерматит, ГЗТ и гиперчувствительность немедленного типа) с успехом воспроизводится на мышах. Так, А. Д. Черноусовым [6] был предложен метод определения сенсибилизирующей способности низкомолекулярных химических веществ на мышах с применением ПАФ, основываясь на том, что внутрикожное введение гаптенов совместно с ПАФ усиливает индукцию ГЗТ вследствие угнетения формирования субпопуляций

регуляторных Т-лимфоцитов-супрессоров, подавляющих ГЗТ, что сопровождается усилением аллергических реакций и позволяет выявить аллергенные свойства даже слабых химических аллергенов. Затем методика была модифицирована для стандартизированной оценки аллергенной активности и опасности химических веществ и включена в методические указания по гигиеническому нормированию химических аллергенов в воздухе рабочей зоны [7].

Более того, применение методики определения и оценки степени аллергенной активности и аллергенной опасности различных видов органической пыли по их растворимым белково-антителенным комплексам в экспериментах на белых мышах обосновано теоретическими данными о том, что использование для сенсибилизации белоксодержащего вещества в смеси с ПАФ, содержащим антигены туберкулезных бацилл и вводимым в организм внут里кожно (создание «депо»), стимулирует переключение хелперной регуляции иммунного ответа 2-го типа (Th2) на 1-й тип с развитием преимущественно клеточноопосредованных механизмов гиперчувствительности замедленного типа [8].

Поскольку методика экспериментальной модели воспроизведения сенсибилизации на мышах с применением ПАФ позволяет оценить степень сенсибилизирующей способности как гаптеноев, так и белоксодержащих веществ как полных антигенов, то при адаптации условий постановки она вполне адекватно может быть использована для изучения и объективной оценки аллергенной активности и опасности любых АБЛС. В качестве аналога использовали методические подходы к постановке экспериментальной модели воспроизведения и выявления сенсибилизации на белых мышах, отработанные при изучении химических веществ и белоксодержащих аэрозолей [7, 8] с учетом применения стандартных сенсибилизирующих и разрешающих доз химических и биологических веществ и критериев определения степени сенсибилизирующей способности и классификации аллергенной опасности [9].

Апробация методики изучения и оценки сенсибилизирующей способности и аллергенной опасности в эксперименте на белых мышах выполнена на примере изучения фармацевтической субстанции КГ.

Цель работы – унификация постановки методики определения степени сенсибилизирующей способности и оценки аллергенной опасности АБЛС в экспериментах на белых мышах и ее апробация на примере изучения фармацевтической субстанции антибиотика КГ.

Материалы и методы. Объектом исследования являлась фармацевтическая субстанция КГ. Для определения и оценки степени сенсибилизирующей способности и аллергенной опасности КГ использовали доступную унифицированную экспериментальную модель на белых мышах, адекватную для воспроизведения и выявления ГЗТ как на полные антигены (антибиотики), так и на химические вещества – гаптены [7, 8].

Для экспериментов при изучении КГ подбирали группы белых мышей по 12 особей массой 20–24 г. Воспроизведение сенсибилизации белых мышей осуществляли однократным внутрикожным введением в основание хвоста опытных животных КГ в дозе по 10 мкг/животное (1-я опытная группа для возможного установления минимальной сенсибилизирующей дозы (MSD)) и стандартную дозу КГ по 100 мкг/животное (2-я опытная группа) в смеси 1 : 1 с ПАФ в общем объеме 0,06 см³. Животным контрольной группы аналогично вводили смесь 1 : 1 стерильного физиологического раствора и ПАФ.

Выявление ГЗТ осуществляли через шесть суток после введения сенсибилизирующей дозы постановкой провокационной пробы – ВТОЛ путем внутрикожного введения туберкулиновыми шприцами по 0,04 см³ в апоневроз задних

коллатеральных лап животных контрольной и опытных групп КГ в разрешающей дозе по 140 мкг/животное, не вызывающей у интактных животных после внутрикожного введения в лапу существенной воспалительно-отечной реакции кожи (величина отека не более 9×10^{-2} мм).

Выраженность отечно-воспалительной реакции кожи определяли у всех животных контрольной и опытных групп путем измерения микрометром толщины коллатеральных задних лап (апоневроз) в мм до и через 24 ч после тестирования, оценивали абсолютную величину отека лап в 10⁻² мм по разнице в их толщине после и до тестирования, переводили результаты в относительные величины интегрального показателя ВТОЛ в баллах по шкале [7, 8].

Поскольку соблюдены требования по унифицированным условиям постановки методики, стандартным сенсибилизирующими и тестирующим дозам, то для дифференцировки изучаемых фармацевтических субстанций АБЛС по степени сенсибилизирующей способности и классу аллергенной опасности обоснована объективная возможность использования критериев, применяемых для оценки промышленных веществ химической и биологической природы [9], приведенных в таблице 1.

Таблица 1 – Критерии классификационной оценки степени сенсибилизирующей способности (аллергенной активности) и аллергенной опасности фармацевтических субстанций АБЛС

Критерии	Классы аллергенной опасности (степень выраженности сенсибилизирующей способности/степень аллергенной опасности)			
	1-й (сильная/чрезвычайно опасная)	2-й (выраженная/высокоопасная)	3-й (умеренная/умеренно опасная)	4-й (слабая/малоопасная)
H ¹⁾	≥75	>50	≥50	≥25
pt ²⁾	<0,01–0,001	<0,05–0,01	<0,05	>0,05
pX ³⁾	<0,01	<0,05	>0,05	>0,05

¹⁾ Н – выявляемость сенсибилизации по частоте положительного теста ВТОЛ в баллах у животных опытной группы в %.

²⁾ pt – уровень значимости достоверных различий среднегрупповых величин интегрального показателя ВТОЛ в опытной и контрольной группах по критерию t (U).

³⁾ pX – то же по критерию «Х» Ван-дер-Вардена.

Согласно приведенным в таблице критериям изученные фармацевтические субстанции АБЛС разделяют на группы:

– с сильной сенсибилизирующей способностью (аллергенной активностью) и 1-го класса

аллергенной опасности относят – препараты, на которые при тестировании опытных животных, сенсибилизованных стандартной дозой в смеси с ПАФ, выявляют положительные интегральные показатели ВТОЛ у 75 % животных и более (9–12

белых мышей из 12) с достоверным различием среднегрупповых величин кожного тестирования в опыте и контроле по критерию «Х» при уровне значимости $p < 0,01$:

– выраженной сенсибилизирующей способностью (аллергенной активностью) и 2-го класса аллергенной опасности – препараты, на которые при тестировании установлены положительные интегральные показатели ВТОЛ у более 50 % опытных животных с достоверностью различий среднегрупповых величин кожных реакций в опыте и контроле при $p < 0,05$ по критерию «Х»;

– умеренной сенсибилизирующей способностью (аллергенной активностью) и 3-го класса аллергенной опасности – препараты, на которые выявлены положительные интегральные показатели ВТОЛ у половины и более опытных животных, но при статистической значимости различий среднегрупповых величин кожных тест-реакций в опыте и контроле только по критерию t (U);

– слабой сенсибилизирующей способностью (аллергенной активностью) и 4-го класса аллергенной опасности – препараты, при тестировании которыми положительные интегральные показатели ВТОЛ в баллах выявляют у более чем 25 % опытных животных при отсутствии статистически достоверных различий среднегрупповых показателей с контролем даже по критерию t (U);

– не обладающие аллергенной активностью, но представляющий потенциальный риск формирования аллергопатологии у лиц с ослабленной или нарушенной иммунологической реактивностью организма — препараты, на которые положительные тест-реакции регистрируются у 25 % опытных животных и менее, что считается проявлением повышенной индивидуальной чувствительности.

Условия содержания, обращения, проведения экспериментов и выведения лабораторных животных из опыта соответствовали требованиям технических нормативных правовых актов и основывались на международных принципах биоэтики.

Результаты исследования подвергались статистической обработке общепринятыми методами параметрической и непараметрической статистики с использованием лицензионного программного обеспечения Microsoft Office Excel 11 (Microsoft, США) и STATISTICA 10 (StatSoft, США) при сравнении результатов опыта с показателями контроля. В качестве критерия достоверности различий между сравниваемыми показателями принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. По описанной выше унифицированной методике определения и оценки степени сенсибилизирующей способности и класса аллергенной опасности КГ на белых мышах получены следующие результаты (таблица 2).

Таблица 2 – Частота и выраженность показателей провокационной пробы ВТОЛ у белых мышей, сенсибилизованных КГ в дозах 10 и 100 мкг в смеси с ПАФ

Показатели, ед. измерения	Группы сравнения ($M \pm m$)		
	Контрольная группа ($n=12$)	1-я опытная группа (КГ – 10 мкг; $n=12$)	2-я опытная группа (КГ – 100 мкг; $n = 12$)
ГЗТ по ВТОЛ: 10^{-2} мм	$7,58 \pm 1,40$	$18,1 \pm 3,46^{1)}$	$28,8 \pm 5,36^{2)}$
Н	4/12	9/12	10/12
Балл	$0,33 \pm 0,14$	$1,33 \pm 0,33^{3)}$	$2,42 \pm 0,53^{4)}$
Х	-	5,06	6,42

¹⁾ Достоверные различия с контролем при $p < 0,05$ по критерию t .
²⁾ Достоверные различия с контролем при $p < 0,01$ по критерию t .
³⁾ Достоверные различия с контролем при $p < 0,05$ по критериям «Х» и t .
⁴⁾ Достоверные различия с контролем при $p < 0,001$ по критерию t и $p < 0,001$ по критерию «Х».

Примечание: Н: числитель – количество животных с положительными результатами ВТОЛ, знаменатель – всего в группе.

У 4 из 12 животных контрольной группы была несколько повышена абсолютная величина отека лапы на введение провокационной тест-дозы КГ, что свидетельствует о неспецифическом раздражающем действии препарата на ткани лап в дозе 140 мкг и необходимости ее снижения в последующих экспериментах.

Однако у животных 1-й опытной группы положительные кожные реакции на провокационную пробу с интенсивностью 1–4 балла регистрировались у 9 из 12 белых мышей (75 %), а среднегрупповая величина абсолютного показателя провокационной внутрикожной пробы превышала таковой в контрольной группе в 2,4 раза ($p<0,05$).

Причем и интегральный показатель ВТОЛ у животных 1-й опытной группы достоверно как по критерию t ($p<0,05$), так и по «жесткому» критерию «Х» ($p<0,05$) превышал контрольный уровень в 4 раза. Следовательно, препарат КГ даже в дозе 10 мкг проявлял эффективное сенсибилизирующее действие на организм.

КГ в стандартной дозе 100 мкг сенсибилизовал 10 из 12 животных 2-й опытной группы с выраженной абсолютной величиной интегрального показателя ВТОЛ, превышающей таковой в контроле в 4 раза ($p<0,01$), тогда как среднегрупповая величина интегрального показателя, интенсивность которого у 8 лабораторных животных 2-й опытной группы составляла 2–5 баллов, была выше таковой в контрольной группе белых мышей в 7,3 раза ($p<0,001$ по критерию t).

Соответственно рассчитанный статистический показатель «Х» различия между опытной и контрольной группами сравнения равнялся 6,42 ($p<0,01$).

Следовательно, в унифицированных условиях эксперимента КГ в стандартной дозе 100 мкг в смеси с ПАФ сенсибилизовал 83,3 % животных опытной группы с достоверностью различий среднегрупповых величин интегрального показателя ВТОЛ в опытной и контрольной группах белых мышей по критерию «Х» при уровне значимости $p<0,01$, что, согласно классификационным критериям [9], характеризует препарат как обладающий сильной сенсибилизирующей способностью (аллергенной активностью) и определяет его отнесение к 1-му классу аллергенной опасности (чрезвычайно опасный промышленный аллерген).

Заключение. Из представленных результатов выполненных экспериментальных исследований вытекают следующие выводы.

1. На анализе литературных источников и действующих нормативно-методических

документов по изучению аллергенных свойств промышленных веществ обоснована возможность использования для определения степени сенсибилизирующей способности и аллергенной опасности АБЛС экспериментальной методики воспроизведения и выявления ГЗТ на более доступных и дешевых по сравнению с морскими свинками лабораторных животных – белых мышах.

2. Унифицирована и апробирована постановка методики воспроизведения сенсибилизации в экспериментах на белых мышах с применением для внутрикожного введения в основание хвоста стандартной дозы АБЛС 100 мкг в смеси с ПАФ и выявления ГЗТ ВТОЛ в стандартной разрешающей дозе препарата 140 мкг, что позволяет использовать критерии оценки степени сенсибилизирующей способности и аллергенной опасности промышленных аллергенов и обеспечивает объективность изучения специфических свойств и классификации аллергенной опасности новых АБЛС.

3. На экспериментальной модели воспроизведения и выявления сенсибилизации на белых мышах установлено, что фармацевтическая субстанция антибиотика КГ даже в дозе 10 мкг проявляла эффективное сенсибилизирующее действие на организм, а в стандартной дозе 100 мкг препарат сенсибилизовал 83,3 % животных опытной группы (10 из 12, а у 8 из них с интенсивностью ВТОЛ 2–5 баллов), причем среднегрупповая величина интегрального показателя ВТОЛ у опытных мышей была выше таковой в контроле в 7,3 раза ($p<0,001$ по t) и соответственно рассчитанный статистический показатель «Х» различий между опытной и контрольной группами сравнения равнялся 6,42 ($p<0,01$).

Следовательно, препарат КГ проявил сильную сенсибилизирующую способность и дифференцирован к 1-му классу аллергенной опасности (чрезвычайно опасный промышленный аллерген).

4. Разработан протокол исследований сенсибилизирующего действия АБЛС, включающий унифицированную постановку экспериментальной методики воспроизведения и выявления ГЗТ на белых мышах, оценку степени выраженности сенсибилизирующей способности и аллергенной опасности.

Обязательными параметрами оценки сенсибилизирующих свойств АБЛС определены показатели степени выраженности сенсибилизирующей способности и класс аллергенной опасности.

Список цитированных источников

1. Аллергия на антибиотики [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://s-p-a.com/article/570-allergiya-na-antibiotiki.html>. – Дата доступа: 02.02.2021.
2. Профессиональные вредности в производстве антибиотиков [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://studbooks.net/2501031/tovarovedenie/professionalnye_vrednosti_proizvodstve_antibiotikov. – Дата доступа: 02.02.2021.
3. Антибиотики как аллергены [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://allergianet.ru/nalekarstva/allergiya-na-antibiotiki.html>. – Дата доступа: 02.02.2021.
4. Алексеева, О. Г. Аллергия к промышленным химическим соединениям / О. Г. Алексеева, Л. А. Дуева. – Москва : Медицина, 1978. – 270 с.
5. Методические рекомендации по оценке аллергенных свойств фармакологических средств / Г. П. Кудрина [и др.] ; Фарм. комитет МЗ СССР № 13. – Москва, 1988. – 19 с.
6. Черноусов, А. Д. Метод определения аллергенной активности низкомолекулярных химических веществ на мышах / А. Д. Черноусов // Гигиена труда и проф. патология. – 1987. – № 5. – С. 45–47.
7. Требования к постановке экспериментальных исследований по изучению аллергенных свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы : метод. указания № 1.1.11-12-5-2003 / М-во здравоохранения Респ. Беларусь ; разраб. : В. В. Шевляков [и др.] // Сборник официальных документов по медицине труда и производственной санитарии / Респ. центр гигиены, эпидем. и обществ. здоровья, Респ. науч.-практ. центр гигиены ; под общ. ред. В. П. Филонова, С. М. Соколова. – Минск : ПЧУП «Бизнесофсет», 2004. – Ч. 14. – С. 133–156.
8. Требования к постановке токсиколого-аллергологических исследований при гигиеническом нормировании белоксодержащих аэрозолей в воздухе рабочей зоны : метод. указания 11-11-10 РБ-02 / М-во здравоохранения. Респ. Беларусь ; разраб. : В. В. Шевляков [и др.] // Сборник официальных документов по медицине труда и производственной санитарии / Респ. центр гигиены, эпидем. и обществ. здоровья, Респ. науч.-практ. центр гигиены ; под общ. ред. В. П. Филонова, С. М. Соколова. – Минск : ПЧУП «Бизнесофсет», 2004. – Ч. 14. – С. 4–49.
9. Классификация и перечень аллергоопасных для человека промышленных веществ, основные меры профилактики : руководство Р11-11-11 РБ 02 / М-во здравоохранения Респ. Беларусь ; разраб. : В. В. Шевляков [и др.] // Сборник официальных документов по медицине труда и производственной санитарии / Респ. центр гигиены, эпидем. и обществ. здоровья, Респ. науч.-практ. центр гигиены ; под общ. ред. В. П. Филонова, С. М. Соколова. – Минск : ПЧУП «Бизнесофсет», 2003. – Ч. 11. – С. 94–126.

Assessment of the degree of sensitizing ability and allergenic hazard of a pharmaceutical substance clindamycin hydrochloride in experiments on white mice

Zemtsova V. O.¹, Bogdanov R. V.¹, Shevlyakov V. V.¹, Filonyuk V. A.^{1, 2}, Chernyshova E. V.¹, Baranov S. A.¹

¹Scientific practical Centre of Hygiene, Minsk, Republic of Belarus;

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The study of the sensitizing properties of antibacterial drugs (hereinafter referred to as PABD) is an indispensable stage of their hygienic standardization in the air of the working area and atmosphere.

The method of reproducing sensitization to PABD in experiments on white mice was unified using a standard dose of 100 mcg of the drug in a 1 : 1 mixture with Freund's complete adjuvant in a volume of 0.06 cm³ per animal for intradermal injection into the base of the tail and the detection of delayed-type hypersensitivity by provocative intradermal paw swelling test (hereinafter referred to as IPST) in a resolving dose of the drug of 120–140 mcg, which allows the use of criteria for assessing the degree of sensitizing ability and



allergenic danger of industrial allergens and ensures the objectivity of studying the specific properties and classification of the allergenic danger of new PABD.

When testing an experimental model for the reproduction and detection of sensitization on white mice, it was found that the pharmaceutical substance of the antibiotic KG, even at a dose of 10 mcg, showed an effective sensitizing effect on the body, and at a standard dose of 100 mcg, the drug sensitized 83.3 % of experimental animals (10 out of 12) with the group average value of the integral indicator of IPST in experimental mice exceeded that in the control group by 7.3 times with their statistical difference at $p < 0.001$ according to the t criterion and at $p < 0.01$ according to the "X" criterion (6,42). On this basis, the drug KG was differentiated as having a strong sensitizing ability and classified as class 1 allergenic hazard (an extremely dangerous industrial allergen).

Keywords: antibacterial drugs, pharmaceutical substance of the antibiotic clindamycin hydrochloride, sensitizing ability and allergenic hazard class, experimental model for reproducing and identifying sensitization in white mice.

Поступила 05.06.2024

УДК: 614.2:61

МЕДИЦИНСКИЕ ФАКТОРЫ И ИХ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ

¹Калинина Т. В., ¹Костеневич М. М., ²Мосько П. Л.

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;

²Учреждение здравоохранения «Клинический родильный дом Минской области»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. В работе представлен анализ медицинских факторов, играющих значительную роль в формировании индикаторов общественного здоровья, включающих в том числе эффективность функционирования системы здравоохранения, доступность, своевременность и качество оказания медицинской помощи, развитие медицинской науки, квалификацию медицинских кадров. Представлен сравнительных анализ отдельных индикаторов общественного здоровья в Республике Беларусь и за рубежом.

Ключевые слова: общественное здоровье, доступность, качество, своевременность медицинской помощи.

Введение. Одной из важнейших задач совершенствования охраны здоровья граждан является формирование новой системы управления здравоохранением, которая обеспечит удовлетворение запроса общества на получение доступной и качественной медицинской помощи путем эффективного использования материально-технических, финансовых, кадровых и других ресурсов, направляемых в отрасль.

Для этого необходимы эффективно действующие механизмы выработки и принятия научно обоснованных управленческих решений, ориентированных на достижение конечного

результата – улучшения показателей здоровья населения.

С одной стороны, показатели общественного здоровья являются надежным статистическим инструментом оценки эффективности функционирования системы здравоохранения. С другой стороны, здравоохранческие факторы оказывают влияние на формирование общественного здоровья. Эксперты ВОЗ выделяют следующие группы факторов и условий, формирующих здоровье населения: социально-экономические, качество окружающей среды, генетические и биологические, медицинские. Согласно формулы

здоровья, предлагаемой ВОЗ, удельный вес влияния на здоровье социально-экономических факторов составляет 49–53 %, состояния окружающей среды – 8–20 %, генетических и биологических факторов – 17–20 %, медицинских – 8–10 % [1].

Цель работы – анализ влияния медицинских факторов на формирование общественного здоровья в Республике Беларусь.

Материалы и методы. При проведении исследования реализован системный подход с применением аналитического, исторического и статистического методов. Использованы ресурсы библиотечных фондов в Республике Беларусь и Российской Федерации, а также интернет-ресурсы. Объектами исследования являлись статистические данные, опубликованные на официальных сайтах Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Национального статистического комитета Республики Беларусь, Министерства финансов Республики Беларусь, United Nations.

Результаты и их обсуждение. Среди здравоохранительных факторов, оказывающих влияние на формирование общественного здоровья, ключевую роль играют эффективность функционирования системы здравоохранения, доступность и своевременность оказания медицинской помощи, качество медицинской помощи, развитие медицинской науки, квалификация медицинских кадров.

Экономическая эффективность системы здравоохранения определяется по соотношению затрат и полученного эффекта. При этом не всегда большие затраты коррелируют с получаемым медицинским, социальным и экономическим эффектом. В современном мире отмечается рост расходов на здравоохранение, выражющийся в его увеличении на 1 % ВВП каждое десятилетие. На постоянный рост средств, необходимых для здравоохранения, влияют следующие факторы:

- демографические: снижение рождаемости, постарение населения;
- рост реального объема медицинских услуг;
- внедрение новых, более дорогих медицинских технологий и медикаментов;
- инфляция (особенно интенсивная в сфере медицинского обслуживания);
- расширение прав пациентов, повышение заинтересованности граждан в собственном здоровье;
- стремление медицинского персонала, работающего в условиях оплаты труда, зависящей от объема выполненной работы, к назначению

дорогостоящих лекарств, не всегда целесообразных дорогостоящих операций и процедур;

- расширение бюрократического аппарата в системе здравоохранения;

- прямая утечка средств и их использование не по назначению;

- применение в здравоохранении высокозатратных и малоэффективных технологий, в том числе управляемых.

В развитых странах государство тратит на систему здравоохранения порядка 7 % ВВП.

В Республике Беларусь на протяжении последних лет на обеспечение системы здравоохранения из государственного бюджета выделяются средства в пределах 4 % ВВП, что соответствует пороговому значению индикатора социальной безопасности республики, рекомендованному ВОЗ, и предусмотрено Концепцией национальной безопасности Республики Беларусь.

Удельный вес расходов государственного бюджета на здравоохранение в 2024 г. запланирован на уровне 5,6 % [2].

В период пандемии COVID-19 в структуре государственного бюджета расходы на здравоохранение выросли и составили 4,6 % и 6,1 % в 2019 и 2021 г., соответственно (темпер роста 32,6 %) (рисунок 1).

Это связано с ростом расходов на мероприятия по предотвращению распространения коронавирусной инфекции.

Предусмотренные в республиканском бюджете средства направляются: на оказание медицинской помощи населению; внедрение в деятельность практического здравоохранения новейших современных технологий ранней диагностики, профилактики, лечения и реабилитации пациентов; организацию профилактических мероприятий по раннему выявлению факторов риска социально значимых заболеваний.

Эффективность инвестиций государства в систему здравоохранения подтверждается высокими рейтингами белорусского здравоохранения наряду с наиболее развитыми странами мира. Наше государство входит в число мировых лидеров по уровню развития здравоохранения и медицины.

Каждый гражданин независимо от достатка имеет возможность бесплатно получить любой вид медицинской помощи, в том числе самой высокотехнологичной.

Один из основных индикаторов эффективности и качества функционирования системы здравоохранения — ожидаемая продолжительность жизни при рождении (life expectancy at birth, LEB). Динамика ожидаемой

продолжительности предстоящей жизни при рождении коррелирует с показателем общих расходов на здравоохранение. В Республике Беларусь в 2020 г. продолжительность жизни населения достигла своего исторического максимума и составила 74,8 года [3, 4].

В 2021 г. в Беларуси регистрировалось постковидное снижение ожидаемой продолжительности жизни при рождении (рисунок 2). В 2022 г. продолжительность жизни выросла, показатель составил 73,2 года.

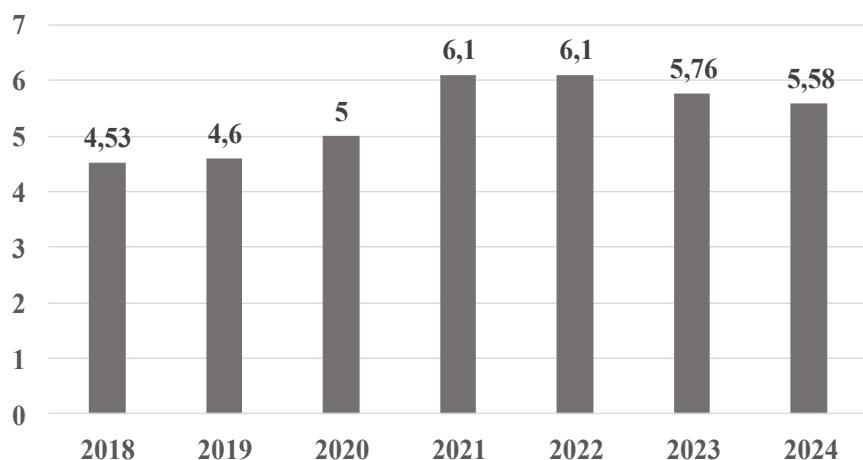


Рисунок 1 – Удельный вес расходов на здравоохранение в структуре государственного бюджета Республики Беларусь в 2018–2024 гг. (%)

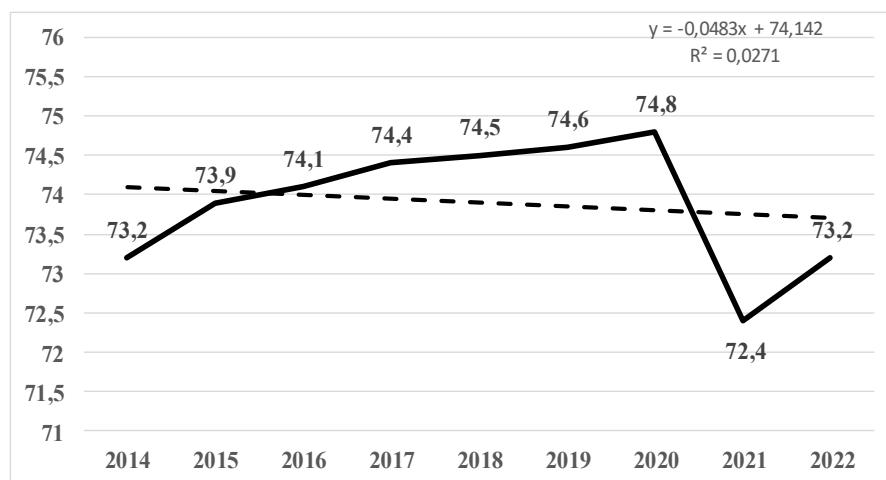


Рисунок 2 – Динамика ожидаемой продолжительности жизни при рождении в Республике Беларусь (2014–2022 гг.)

Законодательно закрепленный приоритет оказания медицинской помощи матерям и детям, четко выстроенная система оказания помощи, весомые меры социальной поддержки материнства и семей с детьми позволили достичь в Беларуси лучших в мире показателей материнской и детской смертности. Показатель материнской смертности коррелирует с качеством, объемом и доступностью медицинской помощи женщинам.

Динамика показателя позволяет судить об эффективности деятельности органов и учреждений здравоохранения.

Материнская смертность по акушерским причинам в Беларуси сведена к единичным случаям.

Как итог – наша страна занимает высокую позицию в рейтинге стран, благоприятных для материнства и детства (таблица 1) [5].

Таблица 1 – Коэффициент материнской смертности в некоторых странах мира по оценкам 2020 г.

Страны	Коэффициент материнской смертности (на 100 тыс. живорожденных)
Южный Судан	1223
Чад	1063
Нигерия	1047
Казахстан	13
Россия	14
Украина	17
Литва	9
Швеция	5
Украина	17
Литва	9
Швеция	5
Италия	5
Франция	8
Польша	2
Израиль	3
Беларусь	1

Коэффициент материнской смертности в Республике Беларусь имеет очевидную тенденцию к снижению. Последние 10 лет регистрируются единичные случаи смерти беременных, рожениц и родильниц в течение 42 суток после родов по какой-либо причине, связанной с

беременностью или отягощенной ею. В 2013 и 2015 г. в республике не было зарегистрировано ни одного случая материнской смертности. По сравнению с уровнем 1990 г. уровень материнской смертности в 2020 г. снизился более чем в 20 раз (рисунок 3) [3, 5].

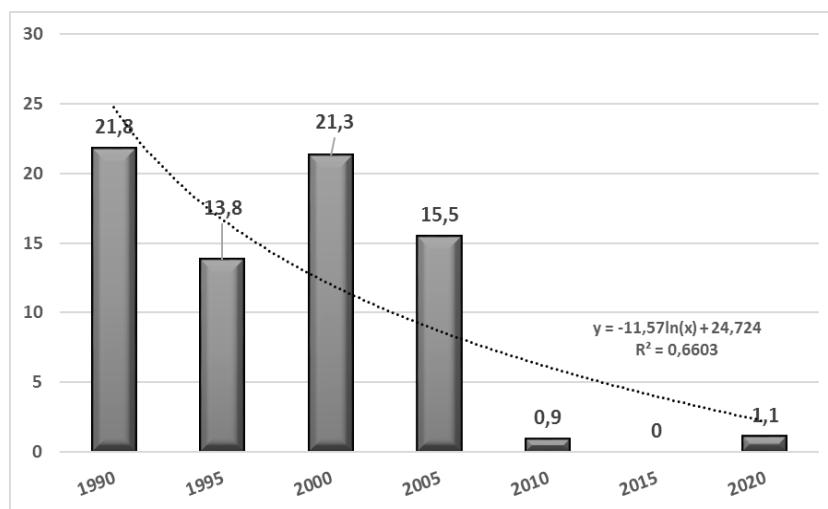


Рисунок 3 – Динамика материнской смертности в Республике Беларусь в 1990–2020 гг. (на 100 тыс. родившихся живыми)

Беларусь входит в число стран с самой низкой младенческой смертностью, опережая не только партнеров по СНГ и европейских соседей, но и многие развитые государства мира

(таблица 2) [6]. В 2019 г. уровень младенческой смертности в Беларуси составил 2,6 %. Это один из лучших показателей в мире.

Таблица 2 – Младенческая смертность в некоторых регионах мира по оценкам 2019 г.

Регион	На 1000 живорожденных детей
Африка	45
Центральная Африканская Республика	78
Сьерра-Леоне	77
Чад	72
Египет	15
Азия	24
Япония	2
Израиль	3
Объединенные Арабские Эмираты	6
Казахстан	7
Турция	8
Китай	9
Узбекистан	20
Индия	30
Туркменистан	42
Европа	4
Исландия	1
Республика Беларусь	2
Швеция	2
Швейцария	3
Польша	3
Российская Федерация	5
Литва	6
Латинская Америка и Карибский бассейн	15
Куба	4
Аргентина	10
Доминиканская Республика	25
Боливия	28
Северная Америка	6
Канада	4
США	6
Океания	17
Австралия	4
Океания	35

Показатель младенческой смертности в Республике Беларусь имеет устойчивую положительную динамику и снижается довольно стабильно на протяжении многих десятилетий (рисунок 4) [3, 6]. Динамика младенческой смертности в Республике Беларусь на протяжении всего послевоенного периода свидетельствует об эффективности функционирования системы охраны

материнства и детства как в советское время, так и сегодня.

Основные факторы риска для формирования общественного здоровья со стороны системы здравоохранения — низкая доступность, низкое качество и несвоевременность оказания медицинской помощи, а также неэффективность профилактических мероприятий. Доступность

медицинской помощи — один из ключевых факторов, оказывающих влияние на формирование показателей общественного здоровья. Конституция Республики Беларусь декларирует доступность медицинской помощи как основополагающий принцип здравоохранения и предопределяет нормы правового регулирования в области охраны здоровья населения по его реализации. В Законе Республики Беларусь «О здравоохранении» доступность медицинской помощи определяется как важнейшая составляющая

государственной политики в области охраны здоровья населения. Практическая реализация принципа доступности медицинской помощи осуществляется в соответствии с Законом Республики Беларусь от 11 ноября 1999 г. № 322-З «О государственных минимальных социальных стандартах» и постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 29 марта 2016 г. № 259 «О некоторых вопросах государственных минимальных социальных стандартов в области здравоохранения».

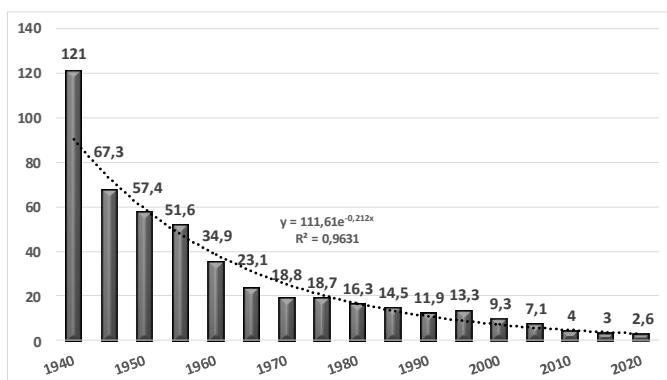


Рисунок 4 – Динамика коэффициента младенческой смертности в Республике Беларусь в период 1940–2020 гг. (на 1000 живорожденных, %)

Значимость фактора доступности медицинской помощи в формировании общественного здоровья убедительно демонстрируется при сравнительном анализе показателей здоровья сельских и городских жителей. О более низкой доступности медицинской помощи на селе свидетельствует тот факт, что число обращений жителей по поводу заболеваний на селе значительно ниже, чем в городе. При этом доля пациентов с запущенными формами онкологических заболеваний и туберкулеза на селе значительно выше среднереспубликанского показателя. Это связано с несвоевременным обращением за медицинской помощью и диагностикой заболеваний на более поздних стадиях.

Наряду с доступностью медицинской помощи для формирования популяционного здоровья важна своевременность ее оказания. Своевременность медицинской помощи, с одной стороны, предполагает проведение мероприятий, позволяющих выявлять на ранних стадиях либо предотвращать заболевания. С другой стороны, своевременность имеет решающее значение при оказании неотложной медицинской помощи пострадавшим в ДТП, при заболеваниях, угрожающих жизни самих пациентов или окружающих (острый коронарный синдром, острые нарушения мозгового кровообращения, острые

кровотечения, опасные инфекционные заболевания и другие). Кроме того, значительные трудности в обеспечении своевременности нередко возникают при необходимости оказания экстренной медицинской помощи жителям отдаленных малочисленных сельских поселений.

Ключевым фактором, обеспечивающим своевременное оказание медицинской помощи пациентам, является ответственное отношение медицинских работников на всех уровнях оказания медицинской помощи. Вместе с тем следует принимать во внимание также факторы, которые не зависят от медицинских работников: качество автомобильных дорог, по которым движется медицинский транспорт; техническая исправность транспорта; квалификация водителей, в том числе умение управлять автомобилем в экстремальных погодных условиях (снежный буран, ливневый дождь и другое). Проблема обеспечения должного качества медицинской помощи остается наиболее актуальной для систем здравоохранения всех стран. Большое количество исследователей подтверждают, что имеющийся уровень медицинской помощи не удовлетворяет в полной мере как медицинских работников, так и пациентов.

В Законе Республики Беларусь «О здравоохранении» качество медицинской помощи

определяется как «совокупность характеристик медицинской помощи, отражающих ее способность удовлетворять потребности пациента, своевременность оказания медицинской помощи, степень ее соответствия клиническим протоколам и иным нормативным правовым актам в области здравоохранения, а также степень достижения запланированного результата оказания медицинской помощи». Оценка качества оказания медицинской помощи в Беларуси проводится отделами контроля качества оказания медицинской помощи в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр медицинской экспертизы и реабилитации», областных (г. Минска) медико-реабилитационных экспертных комиссиях и врачебно-консультационных комиссиях государственных организаций здравоохранения. Качество оказываемой медицинской помощи напрямую связано с грамотной организацией процесса управления. Показатели здоровья населения являются надежной информационной базой для реализации таких функций управления, как прогнозирование (моделирование ожидаемых результатов стратегий развития отрасли), планирование (разработка планов, целевых программ, национальных проектов), анализ (оценка медицинской, экономической, социальной эффективности системы здравоохранения, отдельных медицинских организаций), мотивация (разработка механизмов достижения целей, поставленных перед системой здравоохранения).

Наиболее эффективным механизмом, обеспечивающим высокое качество оказания медицинской помощи и защиту прав пациентов, является использование медицинских стандартов в сфере медицинских услуг как нормативного и ресурсосберегающего инструмента. Стандартизация в здравоохранении законодательно определяет требования к оказанию медицинской помощи, обеспечивающие ее надлежащее качество с учетом возможностей конкретной организации здравоохранения. Обязательным условием и основным механизмом обеспечения и контроля качества медицинской помощи является экспертиза, направленная на исключение или выявление врачебных ошибок и дефектов оказания медицинской помощи. Экспертиза качества медицинской помощи проводится путем выявления дефектов ее оказания, для доказательства которых изучается, прежде всего, лицензионная деятельность учреждения и соблюдение стандартов оказания медицинской помощи. Обеспеченность врачами и квалификация медицинских кадров играют решающую роль в формировании общественного здоровья.

Кадровая политика является приоритетным направлением деятельности Министерства здравоохранения Республики Беларусь. В 2020 г. обеспеченность населения республики врачами-специалистами и средними медицинскими работниками составила 59,7 и 134,1 на 10 000 населения соответственно (рисунок 5) [7].



**Рисунок 5 – Обеспеченность населения Республики Беларусь медицинскими работниками в период 1950–2020 гг.
(на 10 000 человек населения)**

Подготовка специалистов отрасли здравоохранения осуществляется в 4 медицинских университетах и 16 медицинских колледжах республики на основе современных образовательных технологий высшего и среднего медицинского образования в сочетании с высокотехнологичными методами практической медицины, что

позволяет им быть конкурентоспособными и мобильными на мировом рынке труда. Вместе с тем современная система медицинского образования требует обсуждения и реформирования. Достойное будущее медицины напрямую связано с сегодняшним состоянием дел в подготовке кадров, при этом нужно постоянно адаптироваться к

новым условиям, меняться, проявлять гибкость мышления и действий. Одним из проблемных мест современного здравоохранения являются кадры, которые, если решают не все, то многое. Поэтому данный вопрос заслуживает особого внимания, а возможно, является первоочередным.

Заключение. В формировании общественного здоровья ключевую роль играет общество и все его институты. Согласно формуле ВОЗ, удельный вес здравоохранческих факторов в формировании общественного здоровья составляет порядка 10 %.

Проведенный анализ медицинских факторов, формирующих здоровье населения Республики Беларусь, позволяет заявлять об

исключительно позитивной роли белорусского здравоохранения, особенно в вопросах охраны материнства и детства.

При этом необходимо подчеркнуть, что в нашей стране значимость служб здравоохранения в формировании общественного здоровья намного шире, чем это определено формулой здоровья ВОЗ. Это и ключевая роль медицинских работников в формировании здорового образа жизни населения (социально-экономические факторы), и деятельность служб медицинской генетики (генетические факторы), и деятельность санитарно-эпидемиологической службы, обеспечивающей безопасность факторов среды обитания человека – атмосферного воздуха, почвы и питьевой воды (природные факторы).

Список цитированных источников

- Лисицын, Ю. П. Общественное здоровье и здравоохранение : учеб. / Ю. П. Лисицын, Г. Э. Улумбекова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 544 с.
- Бюджет Республики Беларусь для граждан на 2018–2024 гг. [Электронный ресурс] // Министерство финансов Республики Беларусь. – Режим доступа: <https://www.mminf.gov.by/upload/bp/budget/budget2024/.pdf>. – Дата доступа: 07.05.2024.
- Демографический ежегодник Республики Беларусь // Статистический сборник — Национальный статистический комитет Республики Беларусь, 2019. – 429 с.
- Human Development Reports [Electronic resource] // UNDP (United Nations Development Programme): New York, 2019–2024. – Mode of access: <https://hdr.undp.org/reports-and-publications/>. – Date of access: 08.05.2024.
- Trends in maternal mortality 2000 to 2020: estimates by WHO, UNICEF, UNFPA, World Bank Group and UNDESA/Population Division [Electronic resource]. – Mode of access: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/366225/9789240068759-eng.pdf?sequence=1>. – Date of access: 10.05.2024.
- World Mortality 2019: Data Booklet [Electronic resource]. – Mode of access: https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/files/documents/2020/Jan/un_2019_world-mortality_databooklet.pdf. – Date of access: 10.05.2024.
- Статистический ежегодник Республики Беларусь // Статистический сборник — Национальный статистический комитет Республики Беларусь, 2023. – 322 с.

Medical factors and their role in the formation of public health

Kalinina T. V.¹, Kostenevich M. M.¹, Mosko P. L.²

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

²Clinical Maternity Hospital of Minsk Region, Minsk, Republic of Belarus

The publication presents an analysis of medical factors that play a significant role in the formation of public health indicators, including the effectiveness of the functioning of the healthcare system, accessibility, timeliness and quality of medical care, the development of medical science, and the qualification of medical personnel. A comparative analysis of individual indicators of public health in the Republic of Belarus and abroad is presented.

Keywords: public health, accessibility, quality, timeliness of medical care.

Поступила 05.06.2024



УДК 616.915-036.1-036.22-082.4-053.2

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОРЕВОЙ ИНФЕКЦИИ У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ

Коломиец Н. Д.¹, Романова О. Н.¹, Ханенко О. Н.¹, Тонко О. В.¹, Высоцкая В. С.²,
Дашкевич А. М.², Соколова М. В.³, Самойлович Е. О.⁴, Байко А. Д.¹, Хватюк А. Ю.¹,
Домарад В. Р.¹

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;

²Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии
и общественного здоровья», г. Минск, Республика Беларусь;

³Учреждение здравоохранения «Городская детская инфекционная клиническая больница»,
г. Минск, Республика Беларусь;

⁴Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
микробиологии и эпидемиологии», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Объект исследования – 56 детей, госпитализированных в период 2023–2024 гг. с коревой инфекцией, подтвержденной серологическим методом (наличие специфических IgM-антител к вирусу кори) и молекулярно-биологическим (ПЦР). Основную группу пациентов составили дети в возрасте 6–18 лет – 25 (44,6 %) человек, в возрастных группах до 1 года и 1–6 лет наблюдали 17 (30,4 %) и 14 (25 %) человек соответственно. Среди наблюдавшихся пациентов 29 (51,8 %) составили девочки и 27 (48,2 %) мальчики. Большая часть госпитализированных детей – 44 (78,6 %) – не вакцинированы от кори в соответствии с Национальным календарем профилактических прививок ($p<0,05$). В большинстве случаев – 55 (98,2 %) – инфекция протекала типично в легкой форме, 1 пациент имел атипичную abortивную форму. Характерные признаки катарального периода кори – пятна Бельского–Филатова–Коплика – выявлялись у 48 (85,7 %) пациентов. Продолжительность сыпи составляла в среднем $(4,9 \pm 0,3)$ дней. Заболевание протекало у 38 (67,8 %) детей без осложнений и у 18 (32,2 %) – с осложнениями ($p<0,05$). У детей с неосложненным течением заболевания среднее количество дней пребывания в стационаре составило $(6,6 \pm 0,4)$. Среднее время пребывания в стационаре детей с корью и диагностированным отитом составило $(7,8 \pm 0,89)$ дня, пневмонией – $(12,75 \pm 1,75)$ дня, бронхитом – $(11,6 \pm 1,85)$ дня, у имеющих несколько осложнений – $(11,6 \pm 2,3)$ дня.

Ключевые слова: корь, дети, отит, пневмония, экзантема, вакцина.

Введение. Корь является самой заразной болезнью в мире с рейтингом R0 (базовый показатель воспроизведения) — 12–18, что означает, что инфицированный человек, вероятно, распространит болезнь в среднем среди 12–18 человек (в полностью восприимчивой популяции). После контакта примерно у 90 % восприимчивых людей разовьется корь. Инфекция характеризуется лихорадкой, недомоганием, кашлем, насморком и конъюнктивитом, за которыми следует экзантема. Период заразности, по оценкам, составляет от 5 дней до появления сыпи и до 4 дней после. Болезнь может передаваться в общественных местах даже при отсутствии контакта между людьми [1, 2]. До введения вакцинации ежегодно от кори

умирало более 2 млн человек. Доступность вакцинации против кори, начавшаяся в 1960-х гг., немедленно повлияла на заболеваемость, снизила связанные с этим показатели смертности и изменила глобальное распространение [3]. Корь встречается преимущественно в районах с низким уровнем вакцинации, особенно в условиях ограниченных ресурсов. Однако даже в условиях богатых ресурсами стран вспышки кори происходили в местах, где уровень вакцинации снизился, что допускает передачу завезенного вируса кори от невакцинированных и инфицированных путешественников [4, 5]. Сложная эпидемиологическая обстановка в Европейском регионе способствует завозу возбудителя кори и в Республику

Беларусь. Случаи заболевания регистрируются в разные годы во всех регионах [6]. С 2001 г. наблюдалось несколько эпизодов подъема заболеваемости (очаги и спорадические случаи) (рисунок 1).

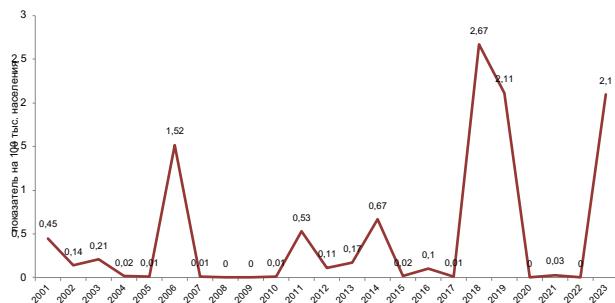


Рисунок 1 – Многолетняя динамика заболеваемости корью населения Республики Беларусь за период 2001–2023 гг.

В 2020 и 2022 гг. случаи кори в Республике Беларусь не регистрировались, в 2021 г. наблюдали всего 3 случая, показатель заболеваемости составил 0,03 случая на 100 тыс. населения. В 2023 г. средний показатель заболеваемости корью достиг 2,12 случаев на 100 тыс. населения, при этом в г. Минске он достиг 5,06 случаев на 100 тыс. населения (рисунок 2).

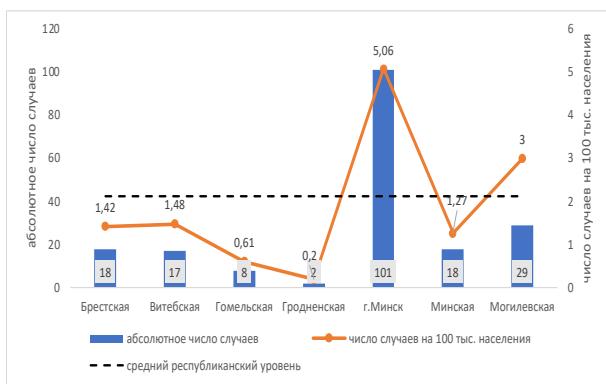


Рисунок 2 – Регистрация случаев кори среди населения Республики Беларусь в 2023 г.

В 2024 г. эпидемическая ситуация по кори продолжила свое развитие, за 4 месяца показатель заболеваемости – 5,27 случаев на 100 тыс. населения – превысил показатель прошлого года в 2,5 раза.

В настоящее время региональная структура заболеваемости носит неоднородный характер, наиболее высокая вовлеченность в эпидемический процесс отмечена в Брестской (16,87 случаев на 100 тыс. населения) и Могилевской (10,34 случаев на 100 тыс. населения) областях. Наличие множественных заносов и относительно

небольшое количество заболевших корью свидетельствуют, что в стране благодаря вакцинации сформирована достаточно сильная иммунная прослойка, которая не позволяет активно циркулировать вирусу кори среди населения.

Однако существующая эпидемиологическая ситуация указывает на необходимость не только поддерживать настороженность медицинских работников и населения в отношении данной инфекции, но и сохранять темпы плановой иммунизации детского населения против кори, иммунизации взрослых непривитых лиц, а также проводить действенную информационную работу с населением по профилактике кори.

Цель работы – изучить клинико-эпидемиологические особенности коревой инфекции у госпитализированных привитых и непривитых детей.

Материалы и методы. Исследование выполнено на базе учреждения здравоохранения «Городская детская инфекционная клиническая больница» г. Минска (ГДИКБ). Объектом исследования являлись 56 детей с коревой инфекцией, получавшие стационарное лечение с 1 ноября 2023 г. по 2 февраля 2024 г. В основу сбора необходимой информации для проведения ретроспективного эпидемиологического анализа клинико-эпидемиологических особенностей коревой инфекции у детей включены данные из первичной медицинской документации пациентов, вносимые в специально разработанные карты и таблицы.

Условиями включения в исследование явились: возраст до 18 лет, наличие клиники коревой инфекции, специфических иммуноглобулинов IgM к вирусу кори и верификация диагноза, проведенная молекулярно-биологическим методом (ПЦР) в лаборатории вакциноуправляемых инфекций государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр микробиологии и эпидемиологии».

Полученные цифровые данные обработаны с использованием методов статистики, адекватных поставленным задачам и объемам выборочных совокупностей.

Обработку полученных данных проводили с применением пакета статистических программ Excel 2010. Доверительные интервалы (95% ДИ)

и статистическую значимость различий рассчитывали с помощью онлайн-калькулятора [6].

Результаты и их обсуждение. В этом исследовании из 56 пациентов, госпитализированных с коревой инфекцией, дети в возрастной группе 6–18 лет составили 25 (44,6 %; 95% ДИ

31,58–57,62) человек, в других возрастных группах до 1 года и 1–6 лет – 17 (30,4 %; 95% ДИ 18,35–42,45) и 14 (25 %; 95% ДИ 13,66–36,34) человек соответственно. При гендерном сравнении доли лиц мужского и женского пола было установлено, что 29 (51,8 %; 95% ДИ 38,71–64,89) составили девочки и 27 (48,2 %; 95% ДИ 35,11–61,29) – мальчики.

Таблица 1 – Возрастная и гендерная структура госпитализированных пациентов с корью

Возрастная группа	Число пациентов		Гендерная структура пациентов			
			Девочки		Мальчики	
	абс.	% (95% ДИ)	абс.	% (95% ДИ)	абс.	% (95% ДИ)
До 1 года	17	30,4 (18,35–42,45)	5	29,4 (7,74–51,06)	12	70,6 (48,94–92,26)
1–6 лет	14	25 (13,66–36,34)	7	50 (23,81–6,19)	7	50 (23,81–76,19)
6–18 лет	25	44,6 (31,58–57,62)	17	68 (49,71–86,29)	8	32 (13,71–50,29)
Всего	56	100	29	51,8 (38,71–4,89)	27	48,2 (29,26–55,14)

Из 27 мальчиков количество лиц возрастной группы 6–18 лет составило только 8 (32 %; 95% ДИ 13,71–50,29) человек, тогда как доля мальчиков в возрасте до 1 года была наибольшей — 12 (70,6 %; 95% ДИ 48,94–92,26) человек. Распределение мальчиков и девочек в возрастной группе от 1 года до 6 лет было одинаковым — 7 (50 %; 95% ДИ 23,81–76,19) человек.

В соответствии с Национальным календарем профилактических прививок Республики Беларусь первую дозу вакцины против кори вводят

девочки чаще болели, и наибольшая доля пациентов женского пола отмечалась в возрастной группе от 6 до 18 лет.

Так, из 29 девочек количество лиц возрастной группы 6–18 лет составило 17 (68 %; 95% ДИ 49,71–86,29) человек, тогда как в возрастной группе до 1 года – 5 (29,4 %; 95% ДИ 7,74–51,06) человек (таблица 1).

детям в возрасте 12 месяцев, вторую дозу — в 6 лет. Для этих целей использую живую аттенуированную вакцину, содержащую вирусы кори, краснухи и паротита.

По данным нашего исследования установлено, что большую часть заболевших составили дети, непривитые от кори, — 44 (78,6 %; 95% ДИ 67,82–89,32) человека, в том числе дети, которые еще не достигли года. Среди заболевших доля привитых детей составила 12 (21,43 %; 95% ДИ 10,68–32,18) человек (таблица 2).

Таблица 2 – Доля привитых и непривитых детей с коревой инфекцией

Возрастная группа	Число пациентов	Прививочный статус пациентов				p	
		Вакцинированные		Невакцинированные			
		абс.	% (95% ДИ)	абс.	% (95% ДИ)		
До 1 года	17	–	–	17	100	–	
1–6	14	5	35,7 (10,60–60,80)	9	64,3 (39,20–89,40)	>0,05	
6–18	25	7	28 (10,40–45,60)	18	72 (54,40–89,60)	<0,05	
Всего	56	12	21,43 (10,68–32,18)	44	78,57 (67,82–89,32)	<0,05	

Как видно из представленных данных таблицы 2, доля детей, непривитых от коревой инфекции, была в 3,67 раза статистически значимо большей, $p < 0,05$. Исходя из анализа данных, мы

пришли к заключению о низкой приверженности к вакцинации родителей заболевших детей. По данным нашего исследования, основными клиническими симптомами катарального

периода кори являлись лихорадка, гиперемия слизистых оболочек полости рта, ротоглотки и конъюнктивы глаз, светобоязнь, частота и выраженность которых находились в зависимости от возраста больного ребенка. Характерные признаки катарального периода кори – пятна Бельского–Филатова–Коплика выявлялись у 48 (85,7%; 95% ДИ 46,04–71,82) пациентов. Срок появления энантемы — в среднем на 2–3-й день заболевания. Сроки появления сыпи: на 1–2-й день – у 14 (25%; 95% ДИ 13,66–36,34) человек, на 3–4-й день – у 27 (48,21%; 95% ДИ 35,12–61,30) человек, на 5–6-й день – у 13 (23,21%; 95% ДИ 12,15–34,27) человек, на 10-й день – у 2 (3,57%; 95% ДИ -1,29–8,43) человек. У 53 (94,64%; 95% ДИ 88,68–100,52) пациентов сыпь развивалась по «классическому сценарию», с четко выраженной этапностью высыпания: лицо,

шея, верхняя часть туловища, затем вся поверхность туловища и проксимальные отделы рук, затем нижние конечности. У 3 (5,36%; 95% ДИ -0,54–11,26) пациентов первое появление сыпи отмечалось в паховой области.

Характер сыпи у 30 (53,57%; 95% ДИ 40,51–66,63) детей был пятнисто-папулезный, у 18 (32,14%; 95% ДИ 19,91–44,37) детей сыпь была мелкопятнистой и у 8 (14,29%; 95% ДИ 5,12–23,46) детей носила геморрагический характер. Продолжительность сыпи составляла в среднем ($4,9 \pm 0,3$) дня.

Заболевание протекало без осложнений у 38 (67,8%; 95% ДИ 55,56–80,04) пациентов, с осложнениями – у 18 (32,2%; 95% ДИ 19,96–44,44) детей. Доля пациентов без осложнений была статистически значимо большей в 2,1 раза ($p < 0,05$) (таблица 3).

Таблица 3 – Доля осложнений у детей с коревой инфекцией в возрастных группах

Возрастная группа	Число пациентов	Пациенты с коревой инфекцией				р	
		Нет осложнений		Осложнения			
		абс.	% (95% ДИ)	абс.	% (95% ДИ)		
До 1 года	17	9	52,9 (29,21–76,67)	8	47,1 (23,31–70,77)	>0,05	
1–6 лет	14	10	71,4 (47,73–95,07)	4	28,6 (4,93–52,27)	>0,05	
6–18 лет	25	19	76 (59,26–92,74)	6	24 (7,26–40,74)	<0,05	
Всего	56	38	67,8 (55,56–80,04)	18	32,2 (19,96–44,44)	<0,05	

Заключение. Наиболее часто без осложнений коревая инфекция протекала у пациентов в возрастной группе 6–18 лет – 19 (76%; 95% ДИ 59,26–92,74) случаев, в возрастных группах до 1 года и 1–6 лет – 9 (52,94%; 95% ДИ 29,21–76,67) и 10 (71,4%; 95% ДИ 47,73–95,07) пациентов соответственно ($p > 0,05$). Из 18 пациентов с осложненным течением кори в возрастной группе до 1 года таких пациентов наблюдали наиболее часто – 8 (47,06%; 95% ДИ 23,31–70,77) человек; а в возрастных группах 1–6 и 6–18 лет наблюдали 4 (28,6%; 95% ДИ 4,93–52,27) и 6 (24%; 95% ДИ 7,26–40,74) человек соответственно. Однако эти данные не имели статистически значимых различий ($p > 0,05$). Мы также отметили, что среди невакцинированных пациентов осложнения встречались чаще. Основными клиническими проявлениями осложнений были отит – у 8 (44,44%; 95% ДИ 21,48–67,40) детей, пневмония – у 4 (22,22%; 95% ДИ 3,01–41,43) заболевших, бронхит – у 3

(16,67%; 95% ДИ -0,55–33,89) пациентов. Сочетанные осложнения наблюдали у 3 (16,67%; 95% ДИ -0,55–33,89) заболевших лиц с корью.

Все находившиеся на стационарном лечении пациенты не имели тяжелых форм коревой инфекции и были выписаны в удовлетворительном состоянии.

У детей с неосложненным течением заболевания среднее количество дней пребывания в стационаре составило ($6,6 \pm 0,4$).

Среднее время пребывания в стационаре детей с корью и диагностированным отитом составило ($7,80 \pm 0,89$) дня, пневмонией – ($12,75 \pm 1,75$) дня, бронхитом – ($11,6 \pm 1,85$) дня, у имеющих несколько осложнений (2 и более) – ($11,6 \pm 2,3$) дня.

Таким образом, преимущественно болеют непривитые против кори дети, заболевание протекает типично и с минимальным количеством осложнений.

**Список цитированных источников**

1. Корь: достижения и проблемы / О. Н. Романова [и др.] // Клиническая инфектология и паразитология. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 88–105.
2. Measles. Key facts [Electronic resource] // World Health Organization. – WHO, 16 April 2024. – Mode of access: https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/measles?gad_source=1&gclid=EA1aIQobChMIw7eb-5vahgMVOIODOBx3BFwj5EAAYASAAEgKpwvD_BwE – Date of access: 28.05.2024.
3. Gans, H. Measles: Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention [Electronic resource] / H. Gans, Y. Maldonado. – Mode of access: <https://www.uptodate.com/contents/measles-clinical-manifestations-diagnosis-treatment-and-prevention>. – Date of access: 28.05.2024.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Measles Cases and Outbreaks. – Mode of access: <https://www.cdc.gov/measles/hcp/index.html> – Date of access: 17.05.2024.
5. Hübschen, J. M. Measles / J. M. Hübschen, I. Gouandjika-Vasilache, J. Dina // Lancet. – 2022. – Vol. 399. – P. 678–690.
6. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Республике Беларусь в 2022 году: государственный доклад. – Минск, 2023. – 159 с.

Clinical and epidemiological features of measles in hospitalized children

Kolomiets N. D.¹, Romanova O. N.¹, Hanenko O. N.¹, Tonko O. V.¹, Vysotskaya V. S.², Dashkevich A. M.², Sokolova M. V.³, Samoilovich E. O.⁴, Bayko A. D.¹, Khvatyuk A. Y.¹, Domarad V. R.¹

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

²*Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus.*

³*City Children's Infectious Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus.*

⁴*Republican Scientific and Practical Center for Microbiology and Epidemiology, Minsk, Republic of Belarus*

The object of the study was 56 children with measles infection confirmed by serological method (presence of specific IgM antibodies to the measles virus) and molecular biological method (PCR), hospitalized in the period 2023–2024. The main age group — patients 6–18 years old — 25 (44,6 %) children; in the age groups up to 1 year and 1–6 years old, 17 (30,4 %) and 14 (25,0 %) people were observed, respectively. Among the observed patients by gender, 29 (51,8 %) were girls and 27 (48,2 %) were boys. Most of the sick children — 44 (78,6 %) were not vaccinated against measles in accordance with the National Preventive Vaccination Calendar ($p<0.05$). In most cases — in 55 children (98,2 %), the infection proceeded in a typical, mild form; 1 patient (1,8 %) had an atypical abortive form. Characteristic signs of the catarrhal period of measles — Belsky–Filatov–Koplik spots were detected in 48 children (85,7 %). The duration of the rash averaged (4.9 ± 0.3) days. The disease proceeded without complications in 38 (67,8 %) and with complications in 18 (32,2 %) ($p<0.05$). In children with an uncomplicated course of the disease, the average number of days of hospital stay was (6.6 ± 0.4) days. The average hospital stay for children with measles and diagnosed otitis was (7.8 ± 0.89) days, for pneumonia — (12.75 ± 1.75) days, for bronchitis — (11.6 ± 1.85) , for those with several complications — (11.6 ± 2.3) days.

Keywords: measles, children, otitis, pneumonia, exanthema, vaccine.

Поступила 05.06.2024

УДК 611.013.85:577.175.14-07

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЕЙ НОРМАЛИЗОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ПАРАФИНИЗИРОВАННЫХ ОБРАЗЦАХ ТКАНЕЙ ПЛАЦЕНТЫ

Полуян О. С., Костюк С. А.

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

Реферат. Беременные женщины являются группой высокого риска в связи с сердечно-сосудистыми, легочными, гормональными и иммунологическими изменениями в период гестации. Инфекция, вызванная SARS-CoV-2, увеличивает вероятность таких осложнений и неблагоприятных исходов беременности, как выкидыши, мертворождение, преждевременные роды, гестационный диабет, преэклампсия, задержка роста плода, пороки развития у новорожденных. Метаанализ показал, что у беременных женщин значительно повышен риск тяжелого течения COVID-19, характеризующегося цитокиновым штормом. В настоящей статье представлен протокол разработки и клинической апробации молекулярно-генетического метода определения уровней нормализованной экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α в парафинизированных образцах тканей плаценты, который в дальнейшем будет использован для проведения исследований непосредственно на образцах плаценты пациентов с COVID-19 с целью оценки их диагностической значимости для прогнозирования развития осложнений беременности и родов.

Ключевые слова: плацента, провоспалительные цитокины, ПЦР, уровень нормализованной экспрессии, COVID-19.

Введение. Образцы плаценты могут использоваться как для изучения этапов нормального развития плаценты, выяснения процессов метаболизма и межтканевого обмена, так и для оценки влияния внешней среды и патологии матери на развитие плода. Доказано, что экспрессия различных генов изменяется (уменьшается или увеличивается) в зависимости от действия большого количества факторов [1]. Так, например, увеличение длительности периода родов сопровождается повышением в плацентарной ткани концентрации маркеров оксидативного стресса, в том числе перекисного окисления липидов, а также экспрессии антиоксидантных ферментов (каталазы, супероксиддисмутазы), что приводит к увеличению концентрации шоковых белков и активации сигнальных путей NF-кВ и p38 [2]. Показано, что под действием гипоксии значительно изменяется экспрессия различных генов, в большинстве случаев она снижается [3].

Таким образом, если для рутинного гистологического исследования пригоден материал плаценты, хранившийся в течение 48 ч при температуре 4 °C, то для молекулярно-генетических

исследований необходимо максимально быстро произвести процесс фиксации образцов тканей с последующей парафинизацией. Анализ данных литературы свидетельствует о том, что при инфицировании COVID-19 у беременных женщин возникает синдром системного воспалительного ответа, который, в свою очередь, приводит к активации процессов воспаления и изменению иммунного ответа. Цитокины, представляющие собой семейство низкомолекулярных белков, секретируемых различными типами клеток, обладают плейотропными функциями и образуют четко регулируемую сеть, играя главенствующую роль в функционировании иммунной системы. Цитокины, разделенные на различные группы, такие как интерлейкины (IL), интерфероны (IFN), колониестимулирующие факторы (CSF), факторы некроза опухоли (TNF), факторы роста опухоли (TGF) и хемокины, участвуют в дифференцировке, пролиферации, миграции и обеспечении эффекторных функций иммунных клеток. Взаимодействуя друг с другом, они играют решающую роль в регуляции иммунного ответа [4].

В настоящее время фактически отсутствуют фундаментальные научные данные о патогенетических механизмах формирования плацентарных нарушений у беременных, перенесших COVID-19 в различные триместры гестации. Получение новых данных позволит своевременно прогнозировать течение и исходы беременности и родов у SARS-CoV-2-инфицированных женщин и выбирать оптимальную тактику ведения беременных для предотвращения неблагоприятных материнских, перинатальных и неонатальных исходов, связанных с COVID-19.

Цель работы – разработка и клиническая апробация молекулярно-генетического метода определения уровней нормализованной экспрессии генов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α в парафинизированных образцах тканей плаценты.

Материалы и методы. Для проведения молекулярно-генетических исследований в качестве биологического материала использовали парафинизированные образцы тканей плаценты.

Выделение РНК из парафинизированных образцов тканей плаценты проводилось с использованием набора реагентов ReliaPrep FFPE Total RNA Miniprep System (Promega, США).

Для выделения РНК из парафинизированных образцов первоначально проводили подготовку срезов. С помощью стерильного лезвия удаляли излишки парафина с блока ткани и выполняли срезы толщиной 5–50 мкм из парафинизированных блоков с помощью микротома. При необходимости выделения РНК из срезов тканей, нанесенных на предметные стекла, использовали стерильные лезвия, чтобы соскоблить срезы с предметного стекла. Подготовленные таким образом срезы помещали в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, при этом для анализа образца ткани от 1 пациента за 1 реакцию обрабатывали эквивалент срезов ткани размером не более 100 мкм.

Затем проводили подготовку разведений основных реагентов. Следующим этапом осуществляли депарафинизацию образцов с использованием минерального масла. Для этого в пробирки, содержащие срезы парафинизированных блоков, добавляли по 300 (для срезов размером ≤ 50 микрон) или 500 мкл (для срезов размером > 50 микрон) минерального масла, инкубировали при 80 °C в течение 1 мин и перемешивали на вортексе. Затем проводили лизис образцов путем добавления лизирующего буфера. Смесь центрифугировали при 10 000 g в течение 15 с при комнатной температуре. После окончания центрифугирования в пробирке образовывались две фазы: нижняя синяя (водная) фаза и верхняя (масляная)

фаза. В нижнюю водную фазу добавляли протеиназу K и перемешивали пипетированием. Смесь инкубировали последовательно сначала при 56 °C в течение 15 мин, затем при 80 °C в течение 1 ч, после чего пробирки незамедлительно помещали на лед на 1 мин для охлаждения, а затем оставляли на 2 мин при комнатной температуре. В случае необходимости, подготовленные таким образом образцы можно хранить в течение 12 ч (в течение ночи) при температуре 2–8 °C (в условиях холодильника).

На следующем этапе проводили обработку образцов ДНКазой. Фермент ДНКаза является чувствительным к физической активации, поэтому все работы с ним следует проводить только путем осторожного пипетирования и только при хранении на льду во время использования. Фермент ДНКазу вносили непосредственно в нижнюю водную фазу образца, перемешивали путем осторожного пипетирования и инкубировали 15 мин при комнатной температуре.

Для связывания нуклеиновых кислот к образцу добавляли соответствующий буфер, изопропанол, перемешивали содержимое путем кратковременного вортексирования, а затем центрифугировали при 10 000 g в течение 15 с при комнатной температуре. После окончания центрифугирования в пробирке образовывались две фазы: нижняя синяя (водная) фаза и верхняя (масляная) фаза. Нижнюю водную фазу переносили в специальную колонку и центрифугировали при 10 000 g в течение 30 с при комнатной температуре. Удаляли содержимое пробирки и проводили отмытку колонки. Для промывки колонки и элюции содержимого в колонку добавляли промывочный раствор, содержащий этанол, центрифугировали при 10 000 g в течение 30 с при комнатной температуре. Процедуры отмытки проводили дважды.

Затем колонку центрифугировали при 16 000 g в течение 3 мин с при комнатной температуре для высушивания колонки (данний этап необходимо проводить с обязательным тщательным высушиванием колонки для предотвращения переноса этанола в элюат).

Затем помещали колонку в чистую пробирку, добавляли деионизированную воду и центрифугировали при 16 000 g в течение 1 мин при комнатной температуре. Выделенную таки образом РНК использовали для определения концентрации и степени очистки, а затем сразу же замораживали для последующего хранения при температуре –80 °C.

Для определения концентрации РНК и степени чистоты выделенной нуклеиновой кислоты

проводили спектрофотометрические исследования (NanoDrop 1000, Thermo scientific, США) на длине волны $\lambda = 230$ нм. Степень чистоты выделенной РНК оценивали по соотношениям 260/280 и 260/230. Полученный раствор после оценки качества РНК подвергали обратной транскрипции. Полученную в результате обратной транскрипции кДНК использовали для постановки ПЦР в режиме реального времени с участием специально подобранных пар праймеров для каждого гена, включая housekeeping ген, с использованием программного обеспечения VectorNTI. Расчет уровней нормализованной экспрессии (УНЭ) таргетных генов провоспалительных цитокинов осуществляли по формуле (1):

$$\% \text{ уровня экспрессии} = 2^{-(Ct \text{ интересующего гена} - Ct \text{ гена } \beta\text{-actin})} \times 100\%, \quad (1)$$

где Ct — пороговый цикл [5].

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ SPSS версия 16.0 (SPSS Inc.). Все количественные данные имели непараметрическое распределение (проверку на нормальность проводили с использованием критерия Колмогорова–Смирнова) и представлены в виде значений медианы и квартилей ($Me (Q25/75)$).

Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принял уровень $p < 0,05$ [6].

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследования с использованием

программного обеспечения Vector NTI нами были подобраны специфические олигонуклеотидные пары праймеров (forward и reverse) для определения УНЭ генов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α .

С помощью демонстрационной версии коммерческого программного пакета Vector NTI Advance 11.0 и встроенного приложения AlignX выбранные последовательности ДНК «выравнивали» для выбора наиболее консервативных участков. Далее проводили «выравнивание» последовательностей ДНК исследуемого гена.

Дизайн олигонуклеотидов осуществляли последовательно для каждого выбранного гомологичного участка с использованием бесплатного программного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 и бесплатного онлайн-алгоритма mfold/DNAfold.

Параметры праймеров: оптимальный размер ПЦР продукта около 50-80 пар оснований (п.о.) длиной 15–25 оснований (гуанин (G), цитозин (C), аденин (A), тимин (T)). Дизайн олигонуклеотидов начали с последовательности IL_1 для гена IL-1 β . Для данной последовательности были выбраны специфические праймеры (таблица 1). Перед началом анализа последовательностей олигонуклеотидных праймеров осуществлен анализ последовательности предполагаемого ампликона. Анализ наличия вероятных гомо- и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров проводили с использованием встроенного алгоритма Vector NTI – Oligo Duplexes. Условия проведения анализа: +60 °C (таблица 2).

Таблица 1 – Последовательности выбранных специфических олигонуклеотидных праймеров для амплификации уникальных участков гена IL-1 β с использованием ПЦР в режиме реального времени

Ген	Олигонуклеотид	Последовательность	Длина, п.о.
IL_1_1	IL_1_1_F	GAGGCTGACAGACCCAAAAGAT	23
	IL_1_1_R	GCACGAGGCATTTTGTGTTCA	23
IL_1_2	IL_1_2_F	ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA	21
	IL_1_2_R	GTCGGAGATTCTAGCTGGAT	21

Таблица 2 – Результаты анализа термодинамических характеристик вероятных гомо- и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров варианта IL_1_1

Олигонуклеотид	Стабильные /Всего	ΔG , kcal/mol
Вероятные гомодимеры		
IL_1_1_F / IL_1_1_F	0/0	—
IL_1_1_R / IL_1_1_R	0/2	—
Вероятные гетеродимеры		
IL_1_1_F / IL_1_1_R	0/2	—

Примечание: ΔG – свободная энергия Гиббса.

Результат анализа показал, что в условиях проведения ПЦР в режиме реального времени вероятность образования стабильных гомо- и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров отсутствует. Согласно алгоритмам mfold, во время протекания ПЦР в режиме реального времени все вероятные вторичные шпилечные структуры будут нестабильны.

Анализ вероятности образования вторичных шпилечных структур для ампликона, ограничивающего альтернативным набором олигонуклеотидных праймеров IL_1_2, также показал наличие схожих конструкций. Дальнейший анализ предполагаемого ампликона с

использованием встроенного алгоритма Vector NTI показал наличие 26 (против 23 в случае IL_1_1) вероятных вторичных шпилечных структур, однако в модельных условиях все они характеризовались низкой стабильностью и, как следствие, низкой вероятностью образования. Анализ вероятности образования стабильных гомо- и гетеродимеров ампликонов показал отсутствие стабильных структур.

Анализ наличия вероятных гомо- и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров (алгоритм Vector NTI) показал наличие большего числа гомодимеров обратного праймера, а также гетеродимеров (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты анализа термодинамических характеристик вероятных гомо- и гетеродимеров альтернативного набора олигонуклеотидных праймеров IL_1_2

Олигонуклеотид	Стабильные /Всего	ΔG , kcal/mol
Вероятные гомодимеры		
IL_1_2_F / IL_1_2_F	0/0	–
IL_1_2_R / IL_1_2_R	0/3	–
Вероятные гетеродимеры		
IL_1_2_F / IL_1_2_R	0/4	–

Результат анализа показал, что в условиях проведения ПЦР в режиме реального времени вероятность образования стабильных гомо- и гетеродимеров олигонуклеотидных праймеров отсутствует. В отличие от набора IL_1_2 в случае IL_1_1 присутствует меньшее количество гомо- и

гетеродимеров, что позволяет выбрать набор IL_1_2 для последующей работы. Аналогичным образом были подобраны олигонуклеотидные праймеры для амплификации специфических участков генов провоспалительных цитокинов IL-6, IL-15, TNF- α (таблица 4).

Таблица 4 – Выбранные для экспериментальной работы последовательности олигонуклеотидных праймеров специфических участков исследуемых генов

Название олигонуклеотида	Количество, ОЕ ₂₆₀	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'
IL1 β -F	1	GAGGCTGACAGACCCCAAAGAT
IL1 β -R	1	GCACGAGGCATTTTGTGTTCA
IL-6-F	1	ATGCAATAACCACCCCT
IL-6-R	1	AGTGTCTAACGCTCATAAC
IL-15-F	1	CCATCCAGTGCTACTTGTGTTACTT
IL-15-R	1	CCAGTTGGCTCTGTTTAGGAA
TNF α -F	1	GTGACAAGCCTGTAGCCCA
TNF α -R	1	ACTCGGCAAAGTCGAGATAG

Затем нами была проведена оценка специфичности выбранного набора олигонуклеотидных праймеров с использованием онлайн-приложения NCBI/Blast, в результате которой установлена 100% гомология геному человека и отсутствие гомологии с другими организмами.

Выбор референсного гена из числа housekeeping генов человека, таких как GAPDH, HGUS, β -актин, HPRT1 проводили исходя из

рассчитанных значений коэффициента вариации (CV) по формуле (2) [7]:

$$CV = |1 - \frac{\text{рассчитанная концентрация ДНК}}{\text{известная концентрация ДНК}}| \times 100 \% \quad (2)$$

В связи с тем, что рассчитанные значения коэффициентов вариации для генов GAPDH, HGUS, β -актин, HPRT1 находились на уровне

12,5, 11,8, 13,1 12,7 % соответственно, достоверных различий для housekeeping генов человека выявлено не было, на данном этапе все исследуемые гены были включены в дальнейшую работу.

Таблица 5 – Выбранные для экспериментальной работы последовательности олигонуклеотидных праймеров специфических участков исследуемых генов

Название олигонуклеотида	Количество, OE ₂₆₀	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'
GAPDH-F	1	ATCATCCCTGCCTACTGG
GAPDH-R	1	CCCTCCGACGCCCTGCTTCAC
HGUS-F	1	CTCATTGGAATTGCGATT
HGUS-R	1	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTA
β-actin-F	1	CGTACCACTGGCATCGTGAT
β-actin-R	1	GTGTTGGCGTACAGGTCTTG
HPRT1-F	1	CCTTGGTCAAGCAGTATAATC
HPRT1-R	1	GGGCATATCCTACAAACAAAC

Перед началом анализа последовательностей олигонуклеотидных праймеров был осуществлен анализ последовательностей предполагаемых ампликонов. В результате анализа с использованием алгоритма *mfold* установлено, что во время протекания ПЦР, а именно на стадии отжига/элонгации при +60 °C все вероятные вторичные шпилечные структуры будут нестабильны. Анализ с использованием алгоритма Vector NTI показал наличие от 11 до 23 вероятных вторичных шпилечных структур. Стабильных структур выявлено не было.

Результаты анализа олигонуклеотидных праймеров показали практически полное отсутствие негативных эффектов за счет гомо- и гетеродимеров. Анализ вероятности совместного протекания специфических мультиплексных реакций с наборами олигонуклеотидов таргетных генов и всех вариантов внутренних контролей показал отсутствие стабильных гетеродимеров в условиях протекания этапа отжига/элонгации ПЦР.

Для анализа возможности использования подобранных пар праймеров при определении экспрессии генов провоспалительных цитокинов

Для дизайна олигонуклеотидных праймеров внутреннего контроля ПЦР в режиме реального времени использовали последовательности ДНК генов GAPDH, HGUS, β-actin и HPRT1 генома человека (таблица 5).

IL-1β, IL-6, IL-15, TNF-α, проводили моноплексную ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию для каждого гена проводили в 10 случайных образцах, пробы ставили в дублях.

Для проведения обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени одношаговым методом использовали набор реагентов «Премикс ArtMix-RT ревертаза» («АртБиоТех», Республика Беларусь). Состав реакционной смеси: 5 мкл реагента ArtMix-RT (5-кратная смесь), 0,5 мкл forward-праймера (в концентрации 50 мкМ), 0,5 мкл reverse-праймера (в концентрации 50 мкМ), 5 мкл выделенной РНК-матрицы, 14 мкл воды, обработанной диэтилпирокарбонатом (DEPC); конечный объем — 25 мкл.

Температурный профиль амплификации: 52 °C – 45 мин; 95 °C – 2 мин; 95 °C – 10 с, 60 °C – 60 с (40 циклов); плавление 60–95 °C с использованием термоциклира Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия). Значения пороговых циклов, полученные при выполнении моноплексной ПЦР в режиме реального времени (таблица 6), для всех исследуемых генов находились в пределах от 18,77 (для гена IL-1β) до 31,17 (для гена IL-15).

Таблица 6 – Значения пороговых циклов для генов IL-1β, IL-6, IL-15, TNF-α, полученные при выполнении моноплексной ПЦР

№ образца	Значения пороговых циклов (Ct) для генов			
	IL-1β	IL-6	IL-15	TNF-α
1	1.1	18,77	20,29	21,18
	1.2	19,02	20,56	22,41
			20,84	22,13

Окончание табл. 6

2	2.1	24,87	26,63	20,59	22,85
	2.2	25,11	26,48	20,33	23,09
3	3.1	24,49	26,54	27,20	22,54
	3.2	24,82	26,38	26,86	22,28
4	4.1	20,43	19,38	26,52	29,87
	4.2	20,18	19,77	26,76	30,16
5	5.1	24,62	28,11	19,61	20,24
	5.2	25,00	28,38	19,49	20,37
6	6.1	23,67	26,43	26,51	27,34
	6.2	24,05	26,87	27,03	27,69
7	7.1	25,92	26,60	28,74	27,29
	7.2	26,28	26,43	29,05	27,53
8	8.1	28,15	26,81	29,55	27,83
	8.2	28,29	27,16	29,94	28,14
9	9.1	23,48	22,65	20,65	19,42
	9.2	23,81	22,94	20,83	19,68
10	10.1	28,72	29,44	30,87	29,95
	10.2	29,06	29,83	31,17	30,24

Для оценки уровня амплификации неспецифических фрагментов ДНК дополнительно был проведен электрофоретический анализ полученных ампликонов. На электрофорограмме присутствовали четкие полоски на уровне детекции специфических фрагментов ДНК во всех анализируемых образцах.

После проведения электрофореза из геля извлекли фрагменты ДНК с использованием набора реагентов QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Германия) для проведения секвенирования с целью анализа нуклеотидной последовательности полученных фрагментов ДНК для оценки аналитической специфичности разработанной методики.

Сиквенс-анализ проводили с использованием набора реагентов BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, США) и forward-праймера для каждого гена. Отсеквенированные фрагменты ДНК подвергались очистке с использованием DyeEx 2.0 Spin kit (Qiagen, Германия) и последующему электрофоретическому анализу на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) [7].

Полученные данные о нуклеотидной последовательности образцов сравнивали с зарегистрированными последовательностями анализируемых генов в поисковой онлайн-системе BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) для идентификации принадлежности той или

иной последовательности к определенному гену. Все анализируемые образцы имели 100% гомологию с зарегистрированными в базе данных последовательностями, что свидетельствовало о 100% специфичности разработанной методики.

По результатам анализа кривых амплификации были выбраны два образца (№ 1, 4) для проведения оценки эффективности (Е) ПЦР для генов IL-1 β и IL-6, а также два образца (№ 5, 9) для генов IL-15 и TNF- α , так как значения пороговых циклов амплификации для указанных генов в данных образцах были самыми низкими.

Для оценки эффективности протекания ПЦР проводили амплификацию 10-кратных разведений образцов кДНК с целью построения стандартной кривой. Концентрацию кДНК в неразведенном образце условно принимали за 100 и делали 2 разведения (10, 1). Амплификацию проб проводили в дублях.

При анализе результатов амплификации проводили построение стандартной кривой корреляции между значениями пороговых циклов Ct и log10 условной концентрации кДНК для изучаемых генов.

Корреляция (R^2) между значениями пороговых циклов Ct и log10 условной концентрации кДНК в образце составила от 0,995 до 0,999. Полученные значения эффективности ПЦР (таблица 7) находились в пределах от 1,58 (для гена IL-15) до 1,75 (для гена TNF- α).

Таблица 7 – Значения пороговых циклов, эффективности ПЦР (E) и корреляции (R^2) для генов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α

Ген	№ образца	Значения пороговых циклов (Ct)						E	R^2		
		100		10		1					
		100.1	100.2	10.1	10.2	1.1	1.1				
IL-1 β	1	18,77	19,02	22,91	23,15	27,08	27,52	1,65	0,997		
	4	20,43	20,18	24,62	24,47	28,86	28,73	1,66	0,997		
IL-6	1	20,29	20,56	24,36	24,49	28,52	28,74	1,68	0,997		
	4	19,38	19,77	23,55	23,81	27,74	27,93	1,70	0,998		
IL-15	5	19,61	19,49	23,97	23,69	28,21	27,85	1,58	0,995		
	9	20,65	20,83	24,82	25,13	29,00	29,37	1,61	0,996		
TNF- α	5	20,24	20,37	24,83	24,95	29,08	29,27	1,71	0,998		
	9	19,42	19,68	23,46	23,84	27,73	27,97	1,75	0,999		

Количественное определение housekeeping генов проводили в тех же образцах, в которых оценивали амплификацию таргетных генов, для оценки концентрации применяли плазмидный стандарт. Амплификацию всех проб проводили в дублях, для расчета коэффициента вариации использовали средние значения концентраций.

В ходе оценки эффективности протекания реакции амплификации генов GAPDH, HGUS, β -actin и HPRT1 было установлено, что при использовании подобранных пар праймеров, состава амплификационной смеси и условий термоциклирования (аналогично таковым, использовавшимся для амплификации таргетных генов) рассчитанные значения эффективности протекания реакции составили 1,48 (для гена GAPDH), 1,69 (для гена HGUS), 1,72 (для гена β -actin) и 1,54 (для гена HPRT1). На основании данного параметра для изучения уровней нормализованной экспрессии генов провоспалительных цитокинов в качестве референсного нами был выбран ген β -actin. Сравнение эффективностей протекания реакции для референсного гена β -actin и исследуемых таргетных генов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α позволило сделать вывод о возможности проведения мультиплексной ПЦР для одновременной амплификации таргетного и референсного гена (последовательно для каждой пары генов) в одной пробирке. В ходе оптимизации мультиплексной ПЦР в режиме реального времени в одной пробирке одновременно амплифицировали один из исследуемых генов (IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α) и референсный ген β -actin. В пробирки для амплификации вносили: 5 мкл реагента ArtMix-RT (5-кратная смесь), 0,2 мкл таргетного forward-праймера (в концентрации 50 мкМ), 0,2 мкл таргетного reverse-праймера (в концентрации 50 мкМ), 0,2 мкл forward-праймера гена β -actin (в концентрации 50 мкМ), 0,2 мкл reverse-праймера гена β -actin (в концентрации 50 мкМ), 5 мкл выделенной РНК-

матрицы, 14,2 мкл воды, обработанной диэтилпирокарбонатом (DEPC); конечный объем – 25 мкл.

Для выбора оптимального режима амплификации для каждого из исследуемых генов при проведении мультиплексной ПЦР были опробованы 4 режима (таблица 8) с учетом оптимальной температуры отжига праймеров и одновременной амплификации двух генов в одной пробирке.

Амплификацию проводили с использованием термоциклира Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия). Наилучший результат амплификации для генов IL-1 β , IL-6, IL-15 и β -actin был достигнут при использовании режима 2, TNF- α и β -actin — режима 1. Значения пороговых циклов для таргетных генов находились в пределах от 21,29 до 33,18, для референсного гена β -actin — от 17,87 до 28,45.

Для апробации разработанного метода расчет УНЭ таргетных генов (таблица 9) осуществляли по формуле (2).

Таблица 8 – Программы амплификации для генов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α

Режим №	Программа амплификации
1	Ревертирование: 52 °C — 30 мин 1 цикл: 95 °C — 2 мин; 45 циклов: 95 °C — 10 с, 60 °C — 15 с; плавление 60–95 °C
2	Ревертирование: 52 °C — 30 мин 1 цикл: 95 °C — 2 мин; 45 циклов: 95 °C — 10 с, 60 °C — 30 с; плавление 60–95 °C
3	Ревертирование: 52 °C — 30 мин 1 цикл: 95 °C — 2 мин; 45 циклов: 95 °C — 10 с, 60 °C — 60 с; плавление 60–95 °C
4	Ревертирование: 52 °C — 45 мин 1 цикл: 95 °C — 2 мин; 45 циклов: 95 °C — 10 с, 60 °C — 60 с; плавление 60–95 °C

Таблица 9 – Значения пороговых циклов и УНЭ для таргетных генов

Ген	Значения пороговых циклов (Ct) для образцов									
	1		1		1		1		1	
IL-1β	23,19	25,77	27,02	23,84	27,89	25,145	26,38	28,33	25,69	23,87
β-actin	19,76	21,18	25,79	25,02	23,73	27,79	20,84	25,47	20,29	25,88
% УНЭ	9,28	4,15	42,63	226,58	5,59	623,33	2,15	13,77	2,37	402,78
IL-6	28,65	22,98	28,72	31,14	24,20	29,84	20,98	22,96	25,28	23,85
β-actin	21,74	19,38	21,03	20,54	18,15	27,76	23,78	18,87	21,01	26,42
% УНЭ	0,83	8,25	0,49	0,06	1,51	23,75	692,77	5,88	5,17	591,17
IL-15	25,22	27,52	21,85	33,18	25,00	25,95	29,74	29,56	24,40	31,23
β-actin	27,36	21,05	20,44	28,45	20,42	23,65	27,31	21,51	25,57	20,51
% УНЭ	440,38	1,13	37,69	3,77	4,17	20,31	18,60	0,38	223,75	0,06
TNF-α	32,23	31,83	23,09	25,17	31,17	23,56	30,01	21,20	23,76	28,91
β-actin	21,96	26,56	21,82	19,58	20,74	23,97	26,81	21,48	24,50	17,87
% УНЭ	0,08	2,58	41,47	2,08	0,07	132,76	10,87	121,06	166,48	0,05

Анализ результатов, полученных в ходе оптимизации мультиплексной ПЦР в режиме реального времени, позволил сделать вывод, что разработанный метод можно использовать для одновременной амплификации одного из таргетных генов (IL-1β, IL-6, IL-15, TNF-α) и референсного гена β-actin. Полученные с использованием

разработанного метода данные можно использовать для расчета процента УНЭ генов IL-1β, IL-6, IL-15, TNF-α. Рассчитанные значения процента УНЭ генов находились в пределах от 0,05 до 692,77 %.

Заключение. Подобранные нуклеотидные последовательности пар праймеров позволяют

проводить амплификацию генов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α , а также гена человека β -actin в парафинизированных образцах тканей плаценты при проведении ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией в формате мультиплекс.

Анализ результатов, полученных в ходе разработки, оптимизации и клинической апробации, позволяет утверждать, что разработанный

метод, основанный на использовании специфических пар праймеров, состава реакционной смеси и условий термоциклирования, можно использовать для одновременной амплификации одного из таргетных генов провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α и референсного гена β -actin при определении УНЭ указанных генов в парафинизированных образцах тканей плаценты.

Список цитированных источников

1. Optimising sample collection for placental research / G. J. Burton [et al.] // Placenta. – 2014. – Vol. 35. – P. 9–22.
2. Heat shock protein 70 expression is spatially distributed in human placenta and selectively upregulated during labor and preeclampsia / A. Abdulsid, K. Hanretty, F. Lyall // PLoS One. – 2013. – Vol. 8 (1). – e 54540.
3. Global gene expression changes induced in the human placenta during labor / K. J. Lee [et al.] // Placenta. – 2010. – Vol. 31. – P. 698–704.
4. CyProQuant-PCR: a real time RT-PCR technique for profiling human cytokines, based on external RNA standards, readily automatable for clinical use / P. Boeuf [et al.] // BMC Immunology. – 2005. – Vol. 6 (5). – P. 1–14.
5. Полуян, О. С. Усовершенствование метода определения уровней нормализованной экспрессии генов белков теплового шока Chlamydia trachomatis для оценки риска диссеминации возбудителя из урогенитального тракта / О. С. Полуян // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2017. – № 3. – С. 333–342.
6. Наследов, А. Д. SPSS 15: профессиональный статистический анализ данных / А. Д. Наследов. – Санкт-Петербург : Питер, 2008. – 416 с.
7. Метод определения уровней экспрессии генов, обеспечивающих синтез коллагена и эластина. в пунктах кожи пациентов с хроническими дерматозами, сопровождающимися атрофией кожи / С. А. Костюк [и др.] // Дерматовенерология. Косметология. – 2017. – № 2. – С. 179–187.

Molecular genetic method for determining the levels of pro-inflammatory cytokine genes normalized expression in paraffinized placenta tissue samples

Poluyan O. S., Kostiuik S. A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Pregnant women are at high risk due to cardiovascular, pulmonary, hormonal and immunological changes during gestation. Infection with SARS-CoV-2 increases the likelihood of complications and adverse pregnancy outcomes such as miscarriage, stillbirth, preterm birth, gestational diabetes, preeclampsia, fetal growth restriction and birth defects. A meta-analysis found that pregnant women have a significantly increased risk of severe COVID-19, characterized by a cytokine storm. In this article, the authors present a protocol for the development and clinical testing of a molecular genetic method for determining the levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α normalized expression in paraffinized placental tissue samples, which will subsequently be used for direct research on placenta samples from patients with COVID-19 in order to assess their diagnostic significance for predicting the development of complications of pregnancy and child-birth.

Keywords: placenta, proinflammatory cytokines, PCR, normalized expression level, COVID-19.

Поступила 05.06.2024



УДК 616.9:579.862-036.2-082.4-053.2"2016/2023"

ПНЕВМОКОККОВАЯ ИНФЕКЦИЯ У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ (ПЕРИОД НАБЛЮДЕНИЯ 2016–2023 ГОДЫ)

¹Соколова М. В., ²Ханенко О. Н., ²Коломиец Н. Д., ²Тонко О. В.,
²Романова О. Н., ²Мартыненко У. С., ²Долгина Ю. Н., ²Русикович С. С.

¹Учреждение здравоохранения «Городская детская инфекционная клиническая больница»,
г. Минск, Республика Беларусь;

²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Объект исследования – 1099 детей, госпитализированных на стационарное лечение в УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница» г. Минска в период с 2016 по 2023 г. с различными клиническими формами пневмококковой инфекции, подтвержденной бактериологическим методом. В этом исследовании мы проанализировали возрастные, гендерные особенности детей с различными клиническими формами пневмококковой инфекции. В допандемический период 2016–2019 гг. (–COVID-19) наблюдали в 1,7 раз больше пациентов в сравнении с периодом 2020–2023 гг. (+COVID-19) – 698 (63,5 %) и 401 (36,5 %) заболевших детей соответственно ($p<0,05$). При этом не установлено существенных различий в периоды –COVID-19 и +COVID-19 как по возрасту, так и по гендерным признакам заболевших детей внутри возрастных групп, хотя доля пациентов мужского пола в целом оказалась статистически значимо большей. Среди клинических форм превалировали отиты – 67,6 %. Во все годы наблюдения наибольшее число детей с пневмококковой инфекцией – 96,0 % – пришлось на возраст до 7 лет.

Ключевые слова: пневмококк, COVID-19, дети, отит, пневмония, менингит, SARS-CoV-2, вакцинация.

Введение. *Streptococcus pneumoniae*, также известный как пневмококк, представляет собой бактериальный патоген, который вызывает широкий спектр заболеваний, включая пневмонию, острый средний отит, синусит, менингит и даже редкие случаи эндокардита и первичного перитонита. Этот микроорганизм особенно опасен для детского населения, среди которого частота госпитализаций по поводу пневмококковой пневмонии, сепсиса и менингита остается чрезвычайно высокой [1, 2].

Одним из наиболее распространенных неинвазивных заболеваний, вызываемых пневмококком, является острый средний отит. Исследования показывают, что дети, перенесшие первый эпизод этого заболевания в раннем возрасте, имеют повышенный риск развития хронической рецидивирующей инфекции, требующей длительного лечения антибиотиками. Это влечет за собой значительные расходы на медицинское обслуживание, исчисляемые миллионами евро ежегодно [3, 4]. Несмотря на завершение пандемии COVID-19, вирус SARS-CoV-2 продолжает

оказывать серьезное давление на системы здравоохранения по всему миру. В начале пандемии наблюдалось временное снижение циркуляции других патогенов, включая пневмококк, однако этот эффект был краткосрочным. В настоящее время недостаточно исследований, чтобы точно определить, как пандемия COVID-19 повлияла на распространение пневмококка и других респираторных патогенов [5].

Для улучшения диагностики, лечения и профилактики заболеваний, вызываемых пневмококком, необходимо проведение более обширных научных исследований. Это позволит разработать эффективные стратегии борьбы с инфекциями, вызываемыми этим опасным микроорганизмом, и снизить бремя, которое они оказывают на общественное здоровье и экономику [6].

Цель работы – изучить клинико-эпидемиологические особенности пневмококковых инфекций у детей, госпитализированных в 2016–2023 гг.

Материалы и методы. Исследование выполнено на базе УЗ «Городская детская

инфекционная клиническая больница» г. Минска. Объектом исследования явились 1099 пациентов с различными клиническими формами пневмококковой инфекции, проходивших стационарное лечение в период с 2016 по 2023 г.

В основу сбора необходимой информации для проведения ретроспективного эпидемиологического анализа клинико-эпидемиологических особенностей пневмококковых инфекций у детей включены данные из первичной медицинской документации пациентов.

Условиями включения в исследование явились: возраст до 18 лет, наличие клиники пневмококковой инфекции и обнаружение *S. pneumoniae*.

Идентификация пневмококков выполнена с использованием автоматического микробиологического анализатора VITEK 2 Compact (bioMérieux, Франция), а также методом матричной лазерной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF) на анализаторе Autof MS 1000 (Autobio Diagnostics, Китай). Для определения серотипов пневмококков использовали молекуллярно-биологический метод.

Полученные цифровые данные обработаны с использованием методов статистики, адекватных поставленным задачам и объемам выборочных совокупностей. Обработку полученных данных проводили с применением пакета статистических программ Excel 2010. Доверительные интервалы (95% ДИ) и статистическую значимость различий рассчитывали с помощью online-калькулятора.

Результаты и их обсуждение. В этом исследовании мы выделили два периода наблюдения – допандемический, с 2016 по 2019 г. (–COVID-19), в который число госпитализированных детей с пневмококковыми инфекциями составило 698 (63,5 %, 95 % ДИ 60,65–66,35) человек, и период с 2020 по 2023 г. (+COVID-19), когда наблюдали 401 (36,5 %, 95% ДИ 33,65–39,35) пациента. Таким образом, удельный вес детей, госпитализированных в период –COVID-19, оказался в 1,7 раз больше в сравнении с периодом +COVID-19 ($p<0,05$).

Частота госпитализации детей с пневмококковыми инфекциями в отдельные годы периода –COVID-19 не претерпевала существенных изменений.

Например, в 2016 г. этот показатель составил 5,8 (95% ДИ 4,8–6,8) случая на 1000 госпитализаций или 147 детей; в 2017 г. – 7,7 (95% ДИ 6,7–8,7) случаев на 1000 госпитализаций или 195 пациентов, в 2018 г. – 7,6 (95% ДИ 6,4–8,8) случаев на 1000 госпитализаций или 173 ребенка и в 2019 г. – 8,3 (95% ДИ 7,1–9,5) случаев на 1000 госпитализаций или 183 ребенка, $p>0,05$ (рисунок 1).

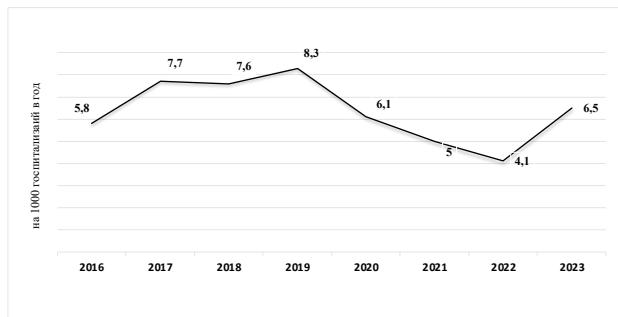


Рисунок 1 – Частота госпитализаций детей с пневмококковыми инфекциями (на 1000 госпитализаций в год) в 2016–2023 гг.

В 2020–2022 гг. в сравнении с тремя годами до пандемии наблюдалось снижение показателя частоты встречаемости случаев пневмококковых инфекций среди госпитализированных детей с наименьшим показателем в 2022 г. – 4,1 (95% ДИ 3,3–4,9) случаев на 1000 госпитализированных пациентов или 84 ребенка. В 2023 г. отмечено увеличение числа случаев инфекции среди госпитализированных лиц, пневмококковая инфекция диагностирована у 134 детей или в 6,5 (95% ДИ 5,3–7,1) случаях на 1000 госпитализаций, то есть в сравнении с 2022 г. выше в 1,6 раза ($p<0,05$).

Анализ возрастной структуры пациентов с диагнозом пневмококковой инфекции (таблица 1) демонстрирует, что среди 147 пациентов, находившихся на стационарном лечении в 2016 г., преобладали дети в возрасте 1–3 лет, на долю которых пришлось более половины госпитализированных лиц (83 человека или 56,5 %; 95% ДИ 48,49–64,51). В последующие годы периода –COVID-19 в этой возрастной группе дети продолжали болеть чаще, но при этом в 2017 г. удельный вес заболевших составил 52,3 % (95% ДИ 45,29–59,31), далее снизился до 46,8 % (95% ДИ 39,36–54,24) и 36,0 % (95% ДИ 29,05–42,95).

Таблица 1 – Возрастная структура детей с диагнозом пневмококковой инфекции, госпитализированных в ДИКБ в 2016–2019 гг.

Воз- раст	Количество пациентов									
	2016 г.		2017 г.		2018 г.		2019 г.		2016–2019 гг.	
	Абс.	% (95% ДИ)	Абс.	% (95% ДИ)	Абс.	% (95% ДИ)	Абс.	% (95% ДИ)	Абс.	% (95% ДИ)
0–1	40	27,2 (15,93– 29,47)	44	22,6 (16,73– 28,57)	63	36,4 (29,23– 43,57)	59	32,4 (25,62– 39,18)	206	29,5 (26,12– 32,88)
1–3	83	56,5 (48,49– 64,51)	102	52,3 (45,29– 59,31)	81	46,8 (39,36– 54,24)	66	36,0 (29,05– 42,95)	332	47,6 (43,89– 51,31)
3–7	22	15,0 (9,3– 20,77)	45	23,1 (17,09– 28,91)	26	15,0 (9,68– 20,32)	53	28,9 (22,33– 35,47)	146	20,9 (17,88– 23,92)
7–14	2	1,3 (-0,53– 3,13)	4	2,0 (0,03– 3,97)	3	1,7 (-0,23– 3,63)	5	2,7 (0,35– 5,05)	14	2,0 (0,96– 3,04)
Всего	147	100	195	100	173	100	183	100	698	100

Следующими наиболее уязвимыми группами являются дети до 1 года и 3–7 лет. В 2016 г. в возрасте 0–1 год было госпитализировано 40 (27,2 %, 95% ДИ 15,93–29,47) детей, в 2017 г. – 44 (22,6 %, 95% ДИ 16,73–28,57), а в последующие 2018 и 2019 г. их доля незначительно увеличилась и составила 36,4 % (95% ДИ 29,23–43,57) и 32,4 % (95%, ДИ 25,62–39,18) пациентов соответственно.

В 2016 и 2018 г. в возрасте 3–7 лет удельный вес госпитализированных детей был одинаков и составил 22 (15,0 %, 95% ДИ 9,3–20,77) и 26 (15,0 %, 95% ДИ 9,68–20,32) соответственно. В другие годы наблюдения периода –COVID-19 госпитализированных детей с пневмококковой инфекцией в этом возрасте было больше: в 2017 г. – 45 (23,1 %, 95% ДИ 17,09–28,91) человек, в 2019 г. – 53 (28,9 %, 95% ДИ 22,33–35,47) пациента. В группе лиц 7–14 лет всего в этот период наблюдали 14 пациентов.

Как показали результаты настоящего исследования, в допандемический период среди госпитализированных детей пневмококковая инфекция наиболее часто наблюдалась в возрастной группе 1–3 года – 332 (47,6 %, 95% ДИ 43,89–51,31) пациента, в сравнении с которой удельный

вес детей до 1 года оказался меньше в 1,6 раза и 3–7 лет – меньше в 2,3 раза ($p<0,05$), тогда как доля пациентов от 7 до 14 лет была самой наименьшей, составив 2,0 % (95% ДИ 0,96–3,04) всех госпитализаций.

В пандемический период и после его официального окончания (+COVID-19) в 2020–2023 гг. мы наблюдали 401 пациента (таблица 2). Ежегодно на протяжении с 2020 по 2022 г. количество детей с пневмококковой инфекцией, поступивших в инфекционный стационар, было примерно одинаковым – 81 (20,2 %; 95% ДИ 16,27–24,13) пациент в 2020 г., 102 (25,4 %; 95% ДИ 21,14–29,66) – в 2021 г. и 84 (21,0 %; 95% ДИ 17,01–24,99) ребенка в 2022 г., а в 2023 г. увеличилось до 134 (33,4 %, 95% ДИ 28,78–38,02). В 2020 г. доля пациентов 0–1 года, 1–3 и 3–7 лет составила 38,3 % (95% ДИ 27,71–48,89), 34,6 % (95% ДИ 24,24–44,96) и 25,9 % (95% ДИ 16,36–35,44) соответственно.

В 2021 г. распределение по возрасту в указанных группах было еще более равномерным: 30,4 % (95% ДИ 21,47–39,33) пришлось на детей до 1 года, 31,4 % (95% ДИ 22,39–40,41) – на лиц от 1 до 3 лет и 34,5 % (95% ДИ 25,09–43,51) для детей в возрасте 3–7 лет.

Таблица 2 – Возрастная структура детей с диагнозом пневмококковой инфекции, госпитализированных в 2020–2023 гг.

Воз-раст	Количество пациентов									
	2020 г.		2021 г.		2022 г.		2023 г.		2020–2023 гг.	
	Абс.	% (95% ДИ)	Абс.	% (95% ДИ)	Абс.	% (95% ДИ)	Абс.	% (95% ДИ)	Абс.	% (95% ДИ)
0–1	31	38,3 (27,71– 48,89)	31	30,4 (21,47– 39,33)	31	36,9 (26,58– 47,22)	34	25,4 (18,03– 32,77)	127	31,7 (27,15– 36,2 %)
1–3	28	34,6 (24,24– 44,96)	32	31,4 (22,39– 40,41)	34	40,5 (30,00– 51,00)	39	29,1 (21,41– 36,79)	133	33,2 (28,59– 37,81)
3–7	21	25,9 (16,36– 35,44)	35	34,3 (25,09– 43,51)	16	19,0 (10,61– 27,39)	44	32,8 (24,85– 40,75)	116	28,9 (24,46– 33,34)
7–14	1	1,2 (-1,17– 3,57)	4	3,9 (0,14– 7,66)	2	2,4 (-0,87– 5,67)	16	11,9 (6,42– 17,38)	23	5,7 (3,43– 7,97)
14–18	0	–	0	–	1	1,2 (-1,13– 3,53)	1	0,8 (-0,71– 2,31)	2	0,5 (-0,19– 1,19)
Всего	81	100	102	100	84	100	134	100	401	100

В 2022 г. среди детей разного возраста наиболее часто болели дети до года и от 1 года до 3 лет: 31 (36,9 %; 95% ДИ 26,58–47,22) и 34 (40,5 %; 95% ДИ 30,00–51,00) пациента соответственно, тогда как доля заболевших в этом году детей от 3 до 7 лет уменьшилась до 19,0 % (95% ДИ 10,61–27,39).

В 2023 г. чаще болели дети в возрасте 3–7 лет – 44 (32,8 %, 95% ДИ 24,85–40,75) человека, число детей в возрасте 1–3 года составило 39 (29,15 %, 95% ДИ 21,41–36,79) пациентов и в возрасте 0–1 год наблюдали 34 (25,4 %, 95% ДИ 18,03–32,77) пациента.

В совокупности в период +COVID-19 дети в возрасте 0–1 год и 1–3 года болели с почти одинаковой частотой – 127 (31,7 %, 95% ДИ 27,15–36,2) и 133 (33,2 %, 95% ДИ 28,59–37,81) пациента соответственно. Незначительно реже пневмококковая инфекция наблюдалась в группе детей 3–7 лет – 116 (28,9 %, 95% ДИ 24,46–33,34) пациентов, а в группе детей в возрасте 7–14 лет в долевом отношении возросла в 2,9 раза по отношению к периоду –COVID-19. В 2022–2023 гг. с пневмококковой инфекцией было также госпитализировано по одному пациенту старше 14 лет.

Таким образом, доля детей, госпитализированных с пневмококковой инфекцией в период –COVID-19 с 2016–2019 гг., то есть в условиях отсутствия циркуляции SARS-CoV-2, составила

63,5 % (95% ДИ 60,65–66,35), что в 1,7 раза больше чем в период +COVID-19 – 36,5 % (95% ДИ 33,65–39,35) ($p<0,05$). Во все годы наблюдения с пневмококковой инфекцией госпитализировались дети в основном от 0 до 7 лет.

В период –COVID-19 в этом возрасте на стационарном лечении находилось 684 (98,0 %; 95% ДИ 96,96–99,04) ребенка, в период +COVID-19 – 376 (94,0 %; 95% ДИ 91,68–96,32) человек ($p>0,05$). Суммарно за весь период наблюдения 2016–2023 гг. в возрасте от 0 до 7 лет болели 1060 (96,5 %; 95% ДИ 95,41–97,59) из 1099 детей.

В гендерной структуре из 1099 детей с пневмококковой инфекцией 627 (57,0 %; 95% ДИ 54,07–59,93) составили мальчики и 472 (43,0 %; 95% ДИ 40,07–45,93) – девочки, то есть доля лиц мужского пола оказалась большей в 1,3 раза ($p<0,05$). Аналогичная закономерность имела место как в период –COVID-19, так и в период +COVID-19. В 2016–2019 гг. пациентами являлись 397 (56,9 %, 95% ДИ 53,23–60,57) мальчиков и 301 (43,1 %, 95% ДИ 39,43–46,77) девочка. В 2020–2023 гг. мы наблюдали 230 (57,4 %, 95% ДИ 52,56–62,24) мальчиков и 171 (42,6 %, 95% ДИ 37,76–47,44) девочку.

Распределение мальчиков и девочек по возрастным группам в период 2016–2019 гг. было примерно одинаковым. В возрастной группе 0–1 год мы наблюдали 118 (29,7 %, 95% ДИ 25,21–

34,19) мальчиков и 88 (29,2 %, 95% ДИ 24,06–34,34) девочек; в группе 1–3 года – 191 (48,1 %, 95% ДИ 43,19–53,01) мальчика и 141 (46,8 %, 95% ДИ 41,16–52,44) девочку; в группе 3–7 лет – 80 (20,2 %, 95 % ДИ 16,25–24,15) мальчиков и 66 (21,9 %, 95 % ДИ 17,23–26,57) девочек.

В возрасте 7–14 лет наблюдали всего 14 пациентов, из которых 8 (2,0 %, 95% ДИ 0,62–3,38) составили мальчики и 6 (2,0 %, 95% ДИ 0,42–3,58) – девочки (рисунок 2).

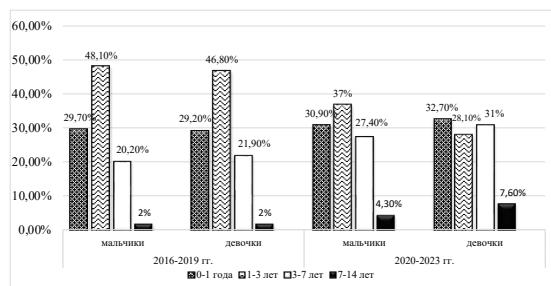


Рисунок 2 – Доля мальчиков и девочек с пневмококковыми инфекциями среди детей разных возрастных групп, находившихся на стационарном лечении в периоды 2016–2019 гг. и 2020–2023 гг.

В период 2020–2023 гг. среди детей до 1 года мальчики составили 71 (30,9 %; 95% ДИ 24,93–36,87) человек, девочки — 56 (32,7 %; 95% ДИ 25,67–39,73) детей; в группе 1–3 года — 85 (37,0 %; 95% ДИ 30,76–43,24) мальчиков и 48 (28,1 %; 95% ДИ 21,36–34,84) девочек.

Таблица 3 – Нозологическая структура пневмококковой инфекции у госпитализированных детей

Клинические формы пневмококковой инфекции	Количество наблюдений (n=1099)					
	2016–2019 гг. (n=698)			2020–2023 гг. (n=401)		
	Абс.	%	95% ДИ	Абс.	%	95% ДИ
Отиты, в том числе:	498	71,3	67,94–74,66	245	61,1	56,33–68,87
односторонний	112	22,5	19,60–25,40	56	22,9	17,64–28,16
двуихсторонний	386	77,5	74,60–80,40	189	77,1	71,84–82,36
Другие неинвазивные формы	121	17,3	14,49–20,11	101	25,2	20,95–29,45
Пневмонии	74	10,6	8,32–12,88	50	12,5	9,26–15,74
Менингит	4	1,0	0,03–1,97	4	1,0	0,03–1,97
Сепсис	1	0,2	-0,24–0,64	1	0,2	-0,24–0,64

Кроме отитов мы наблюдали также 222 (20,2 %; 95% ДИ 17,83–22,57) детей с такими клиническими формами, как гнойные конъюнктивиты, синуситы, риниты, бронхиты, тонзиллиты,

В группе 3–7 лет – 63 (27,4 %; 95% ДИ 21,64–33,16) мальчика и 53 (31,0 %; 95% ДИ 24,07–37,93) девочки. В возрасте 7–14 лет наблюдали в этот период 10 (4,3 %, 95% ДИ 1,68–6,92) мальчиков и 13 (7,6 %, 95% ДИ 3,63–11,57) девочек, а в возрастной группе 14 лет и старше среди заболевших пневмококковой инфекцией детей был только 1 мальчик и 1 девочка.

Проведенный нами анализ показал, что, хотя мальчики болели несколько чаще, достоверных отличий по гендерному признаку не наблюдалось как по периодам наблюдения, так и по возрастным группам.

В этом исследовании мы также проанализировали структуру различных клинических форм пневмококковой инфекции у госпитализированных детей. Наиболее часто у детей встречались отиты – 743 (67,6 %; 95% ДИ 64,83–70,37) случаев, при этом из них односторонние отиты составили 168 (22,6 %; 95% ДИ 19,59–25,61) случаев, а двусторонние встречались достоверно чаще – 575 (77,4 %; 95% ДИ 74,39–80,41) случаев ($p<0,05$).

В период –COVID-19 суммарно наблюдали 498 (71,3 %; 95% ДИ 67,94–74,66) пациентов с клиникой отитов, а в период +COVID-19 – 245 (61,1 %; 95% ДИ 56,33–68,87) пациентов.

Независимо от периода наблюдения в основном регистрировали двухсторонние отиты: 386 (77,5 %; 95% ДИ 74,60–80,40) и 189 (77,1 %; 95% ДИ 74,60–89,40) случаев в 2016–2019 и 2020–2023 гг. соответственно (таблица 3).

трахеиты, аденоидиты в моно- и сочетанных вариантах, которые ввиду малочисленности мы объединили в группу «другие неинвазивные формы». В этой группе в 2016–2019 гг. удельный

вес детей составил 17,3 % (95% ДИ 14,49–20,11) или 121 ребенок из 698, что было достоверно меньше чем в период 2020–2023 гг. — 25,2 % (95% ДИ 20,95–29,45) или 101 случай из 401 ($p<0,05$).

За все годы наблюдения были зарегистрированы: 124 (11,3 %; 95% ДИ 9,43–13,17) случая пневмонии; 8 (0,73 %; 95% ДИ 0,23–1,23) пациентов с клиникой менингита; у 2 (0,18 %; 95% ДИ 0,07–0,43) детей инфекционный процесс протекал с клиникой сепсиса. При этом пневмонии в период –COVID-19 наблюдали у 74 (10,6 %; 95% ДИ 8,32–12,88) пациентов, а в период +COVID-19 — у 50 (12,5 %; 95% ДИ 9,26–15,74) детей ($p>0,05$). Распределение случаев менингита и сепсиса по периодам наблюдения было одинаковым. Поскольку все описанные нами случаи пневмококковой инфекции основывались на выделении пневмококка классическим бактериологическим методом, мы имели возможность провести ограниченное исследование по серотипированию штаммов *S. pneumoniae*, выделенных после завершения пандемии COVID-19 (2023 г.). Всего было исследовано 26 культур, из них 6 оказались нетипируемыми, 7 были отнесены к серотипу 19F, 6 штаммов — к серотипу 3, по 2 — к серотипам 5 и 19A, 3 штамма — к серотипу 23F.

Заключение. В этом исследовании мы проанализировали возрастные, гендерные особенности детей с различными клиническими формами пневмококковой инфекции, находившихся на стационарном лечении в период с 2016 по 2023 г. В допандемический период 2016–2019 гг. –COVID-19 наблюдали в 1,7 раз больше пациентов в сравнении с периодом 2020–2023 гг. +COVID-19 — 698 (63,5 %) и 401 (36,5 %) заболевших детей соответственно ($p<0,05$). При этом не установлено существенных различий в периоды —

COVID-19 и +COVID-19 как по возрасту, так и по гендерным признакам заболевших детей внутри возрастных групп, хотя доля пациентов мужского пола в целом оказалась статистически значимо большей. Среди клинических форм превалировали отиты — 67,6 %, тогда как удельный вес других неинвазивных форм инфекции составил 20,2 %, что согласуется с данными других исследователей, согласно которым почти две трети детей, достигших трехлетнего возраста, переносят более одного случая острого среднего отита [2, 4]. Во все годы наблюдения наибольшее число детей с пневмококковой инфекцией — 96,0 %, пришлось на возраст до 7 лет.

Представленные нами данные о распространенности детской пневмококковой инфекции и ограниченные исследования по определению пейзажа циркулирующих пневмококков убедительно свидетельствуют о необходимости введения вакцинации против пневмококковой инфекции в Национальный календарь профилактических прививок по схеме 2, 4, 12 месяцев после рождения и по эпидемическим показаниям для детей до 5 лет, относящихся к следующим группам риска: иммунодефицитные состояния (ВИЧ-инфекция, хроническая почечная недостаточность, нефротический синдром, хронический гепатит, цирроз печени, заболевания, связанные с назначением иммуносупрессивной или лучевой терапии, злокачественные новообразования, лейкозы, лимфомы, болезнь Ходжкина, после трансплантации донорского органа, врожденный иммунодефицит, функциональная или анатомическая аспления (серповидно-клеточная анемия, другие гемоглобинопатии, врожденная или приобретенная аспления)); рецидивирующий острый гнойный средний отит (более 3 эпизодов в течение года); рецидивирующие пневмонии.

Список цитированных источников

1. Burden of Hospitalizations Related to Pneumococcal Infection in Spain (2016–2020) / R. Gil-Prieto [et al.] // Antibiotics (Basel). – 2023. – Vol. 12 (1). – P. 172.
2. Invasive pneumococcal diseases in Chinese children: a multicentre hospital-based active surveillance from 2019 to 2021 / X. Ning [et al.] // Emerg Microbes Infect. – 2024. – Vol. 13 (1): 2332670.
3. Acute otitis media pneumococcal disease burden and nasopharyngeal colonization in children due to serotypes included and not included in current and new pneumococcal conjugate vaccines / M. Pichichero [et al.] // Expert Rev Vaccines. – 2023. – Vol. 22 (1). P. 118–138.
4. Macaj, M. Streptococcus pneumoniae as cause of acute otitis media (AOM) in Slovak children in the pneumococcal conjugate vaccine era (2008–2019) / M. Macaj, L. Perdochova, J. Jakubikova // Vaccine. – 2023. – Vol. 41 (2). – P. 452–459.
5. Pneumococcal superinfection in COVID-19 patients: A series of 5 cases / D. Cucchiaria [et al.] // Medicina Clínica. – 2020. – Vol. 155, N 11. – P. 502–505.
6. Распространенность пневмококковой инфекции среди госпитализированных детей (период наблюдения 2017–2022 годы) / М. В. Соколова [и др.] // Медицинские новости. – 2023. – № 4. – С. 16–20.



Pneumococcal infection in hospitalized children (observation period 2016 – 2023)

Sokolova M. V.¹, Hanenko O. N.², Kolomiets N. D.², Tonko O. V.², Romanova O. N.²,
Martynenka U. S.², Dolgina J. N.², Rusikevich S. S.²

¹City Children's Infectious Diseases Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus;

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The object of the study was 1099 children with various clinical forms of pneumococcal infection, confirmed by bacteriological method, hospitalized for inpatient treatment in the period from 2016 to 2023. Mostly children under 7 years of age were affected. In this study, we analyzed the age and gender characteristics of children with various clinical forms of pneumococcal infection who were hospitalized from 2016 to 2023. In the pre-pandemic period 2016–2019 (–COVID-19) observed 1,7 times more patients compared to the period 2020–2023 (+COVID-19) — 698 (63,5 %) and 401 (36,5 %) sick children, respectively, $p < 0.05$. At the same time, no significant differences were established during the –COVID-19 and +COVID-19 periods either in age or gender characteristics of sick children within age groups, although the proportion of male patients in general turned out to be statistically significantly larger. Among the clinical forms, otitis prevailed — 67,6 %. In all years of observation, the largest number of children with pneumococcal infection — 96,0 %, were under the age of 7 years.

Keywords: pneumococcus, COVID-19, children, otitis media, pneumonia, meningitis, SARS-CoV-2, vaccination.

Поступила 05.06.2024

УДК 614.88:616.12-008.313.315-08:374.7

БАЗОВАЯ СЕРДЕЧНО-ЛЕГОЧНАЯ РЕАНИМАЦИЯ: БАРЬЕРЫ ПРАКТИЧЕСКОЙ РЕАЛИЗАЦИИ НА МЕСТЕ ПРОИСШЕСТВИЯ И ИХ ПРЕДИКТОРЫ

Станишевский А. Л.¹, Соколов Ю. А.¹, Новикова Н. П.¹, Тимошук А. Л.²

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Государственный институт повышения квалификации и
переподготовки кадров в области газоснабжения «ГАЗ-ИНСТИТУТ»
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Несмотря на доказанную эффективность быстрого начала сердечно-легочной реанимации (СЛР) пострадавшим с внегоспитальной остановкой сердца (ВГОС), частота проведения СЛР очевидцами происшествия остается весьма низкой. Для планирования мер, направленных на повышение эффективности оказания первой помощи (ПП) и снижение числа неблагоприятных исходов при ВГОС, необходимо определение факторов, препятствующих проведению СЛР очевидцам происшествия.

В работе приведены результаты анализа данных анонимного анкетирования по вопросам готовности населения к проведению СЛР, на основании которого определены основные барьеры для проведения СЛР очевидцами и их предикторы, предложены приоритетные направления оптимизации системы оказания ПП пострадавшим с ВГОС.

Ключевые слова: первая помощь, сердечно-легочная реанимация, внегоспитальная остановка сердца, обучение, барьеры, предикторы, опрос.

Введение. ВГОС является серьезной проблемой для здравоохранения во всем мире. Несмотря на определенный прогресс, достигнутый в последнее время, выживаемость при ВГОС во многих странах остается очень низкой. Еще ниже выживаемость с благоприятным неврологическим исходом.

Своевременная, качественная СЛР и использование автоматического наружного дефибриллятора (АНД) в максимально ранний срок являются ключевыми факторами успешной реанимации при ВГОС.

В настоящее время известно, что указанный выше комплекс мер на месте происшествия коррелирует с трехкратным увеличением выживаемости и, что особенно важно, с благоприятным неврологическим исходом. По этой причине во всем мире предпринимаются меры по внедрению современных рекомендаций по СЛР [1, 2, 3]. И если до недавнего времени исследования и процессы обучения были сосредоточены только на практических навыках, то теперь все большее внимание уделяется человеческому фактору.

В руководстве Европейского совета по реанимации (European Resuscitation Council) от 2021 года подчеркивается, что основной целью обучения СЛР должно быть увеличение частоты ее проведения при ВГОС [4]. Ключевым аспектом к достижению повышения выживаемости и улучшению неврологических исходов при ВГОС является готовность очевидцев к реализации необходимых экстренных мероприятий на месте происшествия. По этой причине факторы, влияющие на эту готовность, в настоящее время стали предметом многочисленных исследований [5, 6, 7].

Цель работы – на основании комплексной оценки результатов тестирования респондентов по вопросам оказания ПП определить основные барьеры проведения СЛР случайными свидетелями на месте происшествия, их предикторы и на основании полученных данных предложить организационные мероприятия, направленные на повышение эффективности оказания ПП пострадавшим с ВГОС.

Материалы и методы. В январе – июне 2023 года проведено анонимное анкетирование слушателей учреждения образования «Государственный институт повышения квалификации и переподготовки кадров в области газоснабжения «ГАЗ-ИНСТИТУТ» с использованием разработанной анкеты «Готовность к оказанию первой помощи».

Целевая группа: работники топливно-энергетического комплекса г. Минска. Участие респондентов в анкетировании было анонимным и добровольным. Критерий включения в

исследования – отсутствие медицинского образования у респондента. Анкета содержала два блока вопросов: первый – тематический, второй – социально-демографическая характеристика респондентов.

Статистический анализ включал описательную статистику, оценку взаимосвязей между качественными переменными в таблицах сопряженности с применением критерия χ^2 Пирсона и сравнение трех и более выборок с помощью одноФакторного дисперсионного анализа и критерия Краскела–Уоллиса (Н).

Для сравнения показателей в малых выборках использовались: критерий χ^2 Пирсона с поправкой на непрерывность Йейтса и точный критерий Фишера.

Статистически значимыми считали различия при значении $p < 0,05$. С целью идентификации и оценки факторов, определяющих вероятность возникновения барьеров к инициации СЛР, переменные с подтвержденной взаимосвязью ($p < 0,05$) после проверки на отсутствие коллинеарности включались в математические модели бинарной логистической регрессии. Для количественного описания результатов регрессионного анализа использовались отношение шансов (ОШ) и 95% доверительный интервал (95% ДИ).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2021 (Microsoft, США) и IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM Corporation, США).

Результаты и их обсуждение. В исследование включено 318 анкет, корректно заполненных респондентами, проживающими в г. Минске.

Для определения основных барьеров инициации СЛР респондентам предлагалось ответить на вопрос: «Вам необходимо провести пострадавшему, абсолютно незнакомому человеку СЛР – начать компрессии грудной клетки и искусственное дыхание.

Что может послужить препятствиями для ее проведения?» Результаты анкетирования представлены на рисунке 1.

Для последующего анализа, оценки связи характеристик выборки с полученными данными и определения соответствующих предикторов, выбраны пять барьеров, имеющих статистически значимые отличия по социально-демографическим данным респондентов и прохождению обучения практическим навыкам СЛР.

Результаты анализа взаимосвязи основных факторов, влияющих на готовность респондентов предпринять попытку реанимационных мероприятий, с их социально-демографической характеристикой и предшествующим обучением СЛР представлены в таблице 1..

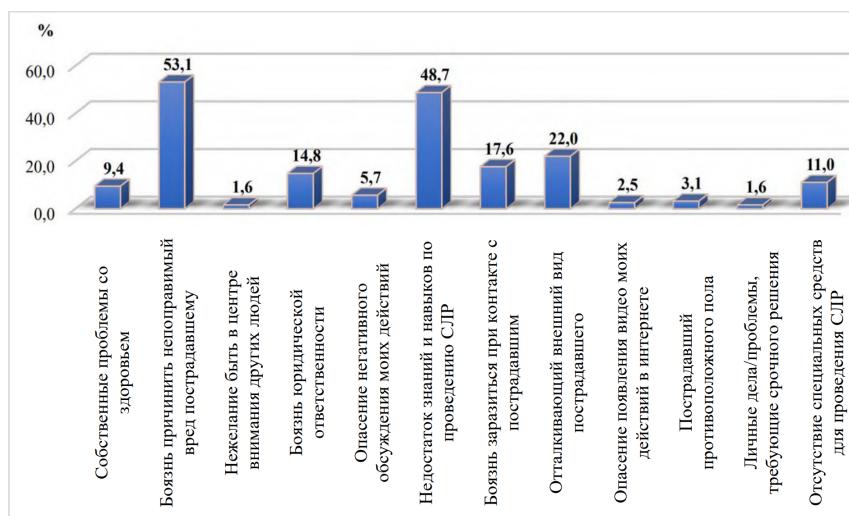


Рисунок 1 – Основные барьеры инициации СЛР случайными свидетелями на месте происшествия

Таблица 1 – Связь основных барьеров, влияющих на готовность к инициации СЛР, с социально-демографической характеристикой респондентов и обучением СЛР

Параметры	Всего, n (%)	Барьеры инициации СЛР, n (%)				
		Собственные проблемы со здоровьем	Боязнь причинить непоправимый вред пострадавшему	Боязнь юридической ответственности	Недостаток знаний и навыков по СЛР	Отталкивающий внешний вид пострадавшего
		30 (9,4)	169 (53,1)	47 (14,8)	155 (48,7)	70 (22,0)
Пол						
Мужской	273 (85,8)	25 (9,2)	137 (50,2)	40 (14,7)	129 (47,3)	53 (19,4)
Женский	45 (14,2)	5 (11,1)	32 (71,1)	7 (15,6)	26 (57,8)	17 (37,8)
		$\chi^2=0,173$ $p=0,678$	$\chi^2=6,795$ $p=0,009$	$\chi^2=0,025$ $p=0,874$	$\chi^2=1,713$ $p=0,191$	$\chi^2=7,589$ $p=0,006$
Личное образование						
ОСО	12 (3,8)	4 (33,3)	3 (25,0)	1 (8,3)	4 (33,3)	0 (0,0)
ПТО	21 (6,6)	2 (9,5)	11 (52,4)	1 (4,8)	12 (57,1)	3 (14,3)
ССО	88 (27,7)	8 (9,1)	50 (56,8)	10 (11,4)	34 (38,6)	14 (15,9)
ВО	197 (61,9)	16 (8,1)	105 (53,3)	35 (17,8)	105 (53,3)	53 (26,9)
		$H=8,405$ $p=0,038$	$H=4,287$ $p=0,232$	$H=4,266$ $p=0,234$	$H=6,946$ $p=0,074$	$H=8,745$ $p=0,033$
Возраст, лет						
18–24	23 (7,2)	2 (8,7)	16 (69,6)	8 (34,8)	12 (52,2)	4 (17,4)
25–29	32 (10,1)	5 (15,6)	18 (56,3)	6 (18,8)	13 (40,6)	10 (31,1)
30–39	100 (31,4)	9 (9,0)	52 (52,0)	16 (16,0)	55 (55,0)	28 (28,0)
40–49	73 (23,0)	3 (4,1)	38 (52,1)	9 (12,3)	39 (53,4)	14 (19,2)
50–59	59 (18,6)	3 (5,1)	32 (54,2)	6 (10,2)	28 (47,5)	10 (16,9)
60–69	31 (9,7)	8 (25,8)	13 (41,9)	2 (6,5)	8 (25,8)	4 (12,9)
		$H=14,880$ $p=0,011$	$H=4,281$ $p=0,510$	$H=10,842$ $p=0,055$	$H=9,696$ $p=0,084$	$H=6,665$ $p=0,247$
Прохождение обучения практическим навыкам СЛР						
Проходил	68 (21,4)	6 (8,8)	32 (47,1)	17 (25,0)	23 (33,8)	20 (29,4)
Изучал сам	29 (9,1)	4 (13,8)	16 (55,2)	3 (10,3)	8 (27,6)	6 (20,7)
Не проходил	221 (69,5)	20 (9,0)	121 (54,8)	27 (12,2)	124 (56,1)	44 (19,9)
		$H=0,711$ $p=0,701$	$H=1,284$ $p=0,526$	$H=7,221$ $p=0,027$	$H=16,002$ $p=0,000$	$H=2,759$ $p=0,252$

Примечание. В выделенных ячейках показаны статистически значимые различия. ОСО — общее среднее образование; ПТО — профессионально-техническое образование; ССО — среднее специальное образование; ВО — высшее образование. В группу ВО включены 2 респондента с научно-ориентированным образованием. В группу 60–69 лет включены 3 респондента в возрасте от 70 лет и старше.

Проведенный регрессионный анализ показал, что достоверными предикторами для возникновения барьеров «Собственные проблемы со здоровьем» является возраст респондентов 60–69 лет и выше (ОШ: 4,4; 95% ДИ: 1,6–12,0; $p=0,003$), «Боязнь причинить непоправимый вред пострадавшему» и «Отталкивающий внешний вид пострадавшего» – женский пол (ОШ: 2,4; 95% ДИ: 1,2–4,8; $p=0,013$ и ОШ: 2,5; 95% ДИ: 1,3–5,1; $p=0,009$ соответственно), «Боязнь юридической ответственности» – возраст респондентов от 18 до 24 лет (ОШ: 3,8; 95% ДИ: 1,4–12,6; $p=0,010$) и «Недостаток знаний и навыков по проведению СЛР» – отсутствие обучения навыкам СЛР (ОШ: 2,8; 95% ДИ: 1,7–4,8; $p=0,000$).

На основании полученных данных и результатов их комплексной оценки мы считаем целесообразным разделение выявленных барьеров на «Личностные барьеры», «Барьеры, связанные с процедурными вопросами» и «Барьеры, основанные на знаниях о СЛР». Данное разделение необходимо для определения организационных мероприятий, направленных на оптимизацию методов обучения, преодоление установленных барьеров проведения СЛР в рамках учебных курсов, повышение мотивации населения посредством соответствующего социально-психологического воздействия и, как следствие, повышения эффективности оказания ПП пострадавшим с ВГОС.

В категорию «Личностные барьеры» были включены такие аспекты, как нежелание быть в центре внимания других людей, опасение негативного обсуждения проводимых действий, опасение появления видеоматериалов оказания ПП в интернете, отталкивающий внешний вид пострадавшего, пострадавший противоположного пола, личные дела/проблемы, требующие срочного решения – 36,5 % респондентов, а также ограниченные возможности по проведению СЛР (собственные проблемы со здоровьем – 9,4 %).

Для преодоления психологических барьеров необходима разработка соответствующего научного и методического сопровождения учебного процесса, включающего компоненты формирования психологической готовности населения (мотивационной, социально-личностной, эмоционально-волевой) к оказанию необходимой ПП и повышение информированности населения о проблеме ВГОС, важности оказания ПП свидетелями происшествия и необходимости соответствующего обучения.

Для лиц с ограниченными возможностями здоровья целесообразны адаптация существующих учебных программ и разработка новых целенаправленных инклюзивных обучающих мероприятий, повышение доступности интернет-

ресурсов и онлайн-обучения, разработка специальных мобильных приложений (в Республике Беларусь уже существует центр приема-передачи обращений от людей с нарушениями слуха с возможностью общения посредством Skype, Viber, SMS-сообщений и др.).

В категорию «Барьеры, связанные с процедурными вопросами» включены проблемные аспекты, связанные с нормативно-правовым (боязнь юридической ответственности – 14,8 %) и материально-техническим обеспечением ее оказания (отсутствие специальных средств для проведения СЛР – 11,0 %) обеспечением оказания ПП.

Для преодоления барьеров, связанных с нормативно-правовым обеспечением оказания ПП необходимо обязательное включение в учебные программы и учебные издания по ПП соответствующих разделов, содержащих доступную и понятную информацию о нормативно-правовом обеспечении оказания ПП, ответственности за неоказание ПП и обязанностей соответствующих контингентов по ее оказанию.

Для соответствия *материально-технического обеспечения оказания ПП* современным требованиям по безопасному ее оказанию, проведению СЛР необходимо обязательное включение в перечень вложений, входящих в аптечки ПП, барьерных устройств для проведения искусственной вентиляции легких.

Категорию «Барьеры, основанные на знаниях о СЛР» можно условно разделить на недостаток теоретических знаний (боязнь причинить непоправимый вред пострадавшему – 53,1 %; боязнь заразиться при контакте с пострадавшим – 17,6 %) и отсутствие сформированных навыков по проведению СЛР (48,7 %).

Для преодоления теоретических барьеров необходимо включение соответствующей информации (преимущества потенциального спасения над риском причинения вреда пострадавшему в критическом состоянии, правила применения средств индивидуальной защиты, возможности проведения СЛР только компрессией грудной клетки) как в учебно-методическое обеспечение учебного процесса, так и в информационные кампании по популяризации ПП. Необходима унификация обучения: 1) разработка межведомственных нормативно-правовых актов, регулирующих вопросы нормативно-правового и организационно-методического обеспечения ПП и, соответственно, внедрение единых подходов к обучению ПП на всех этапах получения образования; 2) создание национального учебно-методического комплекса «Первая помощь», включающего разноуровневые образовательные

программы и учебные пособия, видеоматериалы, средства наглядной агитации, и формирование электронной базы размещения информационных материалов – национального сайта «Первая помощь», содержащего доступную и актуальную информацию.

Для преодоления практических барьеров необходимы повышение степени охвата населения обучением необходимым навыкам оказания ПП путем введения обязательной учебной дисциплины (учебного предмета) «Первая помощь», подготовка соответствующих специалистов (инструкторов и преподавателей по ПП) для проведения обучения при реализации образовательных программ профессиональной подготовки рабочих (служащих), образовательных программ переподготовки рабочих (служащих) и непосредственно на рабочих местах. Перспективным направлением также считаем расширение возможностей по онлайн-обучению населения.

Заключение. Основными барьерами инициации комплекса базовой СЛР на месте происшествия являются: боязнь причинить непоправимый вред пострадавшему (53,1 %); недостаток знаний и навыков по проведению СЛР (48,7 %) и психологические барьеры (пострадавший противоположного пола, нежелание быть в центре внимания других людей, опасение негативного обсуждения проводимых действий и появления видеоматериалов оказания ПП в интернете, отталкивающий внешний вид пострадавшего, личные проблемы, требующие срочного решения – 36,5 %). По данным исследования можно сделать вывод, что готовность населения к проведению СЛР ограничивают личностные барьеры, барьеры, связанные с процедурными вопросами, и

барьеры, основанные на знаниях о СЛР. Для повышения готовности населения к инициации СЛР необходимо внести некоторые корректизы в существующую систему обучения населения методами оказания ПП.

Во-первых, это повышение мотивации населения к обучению ПП и ее оказанию посредством полноценного информирования через интернет, социальные сети, телевидение, печатные издания, средства наглядной агитации о важности ПП, правовых и практических аспектах ее оказания, существующих возможностях обучения, проведения флеш-мобов и обучающих проектов.

Во-вторых, это меры по унификации обучения: разработка единого национального учебно-методического комплекса «Первая помощь», включающего разноуровневые образовательные программы и учебные пособия, а также видеоматериалы, средства наглядной агитации; формирование электронной базы размещения данных материалов – национального сайта «Первая помощь».

В-третьих, оптимизация существующих нормативно-правовых актов, регулирующих вопросы нормативно-правового, организационно-методического и материально-технического обеспечения ПП, введение обязательной учебной дисциплины (учебного предмета) «Первая помощь», подготовка соответствующих специалистов (инструкторов и преподавателей по ПП) для проведения обучения при реализации образовательных программ профессиональной подготовки рабочих (служащих), переподготовки рабочих (служащих) и непосредственно на рабочих местах.

Список цитированных источников

1. Out-of-hospital cardiac arrest across the World: First report from the International Liaison Committee on Resuscitation (ILCOR) / T. Kiguchi [et al.] // Resuscitation. – 2020. – Vol. 152. – P. 39–49.
2. European resuscitation council guidelines 2021: basic life support / T. M. Olasveengen [et al.] // Resuscitation. – 2021. – Vol. 161. – P. 98–114.
3. Impact of bystander cardiopulmonary resuscitation and dispatcher assistance on survival after out-of-hospital cardiac arrest among adult patients by location of arrest / T. Shimamoto [et al.] // International Heart Journal. – 2020. – Vol. 61, N 1. – P. 46–53.
4. European resuscitation council guidelines 2021: education for resuscitation / R. Greif [et al.] // Resuscitation. – 2021. – Vol. 161. – P. 388–407.
5. A scoping review to determine the barriers and facilitators to initiation and performance of bystander cardiopulmonary resuscitation during emergency calls / E. S. Aldridge [et al.] // Resuscitation Plus. – 2022. – Vol. 11. – P. 100290.
6. Willingness and barriers to undertaking cardiopulmonary resuscitation reported by medical students after the SARS-CoV-2 pandemic – single-center study / F. Jaskiewicz [et al.] // Journal of Clinical Medicine. – 2024. – Vol. 13, N 2. – P. 438.
7. Barriers and facilitators to delivering bystander cardiopulmonary resuscitation in deprived communities: a systematic review / I. Uny [et al.] // Perspectives in Public Health. – 2023. – Vol. 143, N 1. – P. 43–53.

Basic cardiopulmonary resuscitation: barriers for carrying out at the scene of accident and their predictors

Stanishevsky A. L.¹, Sokolov Y. A.¹, Novikova N. P.¹, Timoshuk A. L.²

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

²*State Institute of Advanced Studies and Retraining in the Field of Gas Supply «GAZ-INSTITUT», Minsk, Republic of Belarus*

Despite the proven effectiveness of rapid initiation of cardiopulmonary resuscitation (CPR) for victims of out-of-hospital cardiac arrest (OHCA), the rate by bystanders CPR remains very low. In order to plan measures aimed at improving the effectiveness of first aid (FA) and reducing the number of adverse outcomes in cardiac arrest, it is necessary to identify the factors that hinder the initiation of CPR by bystanders.

The article presents the results of an analysis of data from an anonymous survey on the readiness of the population to perform CPR, based on which the main barriers to the initiation of CPR and their predictors are identified, and the priority areas for optimizing the system of CPR for victims of OHCA are proposed.

Keywords: first aid, cardiopulmonary resuscitation, out-of-hospital cardiac arrest, training, barriers, predictors, survey.

Поступила 05.06.2024

УДК 614.88:616.12-008.313.315-08:374.7

ГОТОВНОСТЬ НАСЕЛЕНИЯ МЕГАПОЛИСА К ПРОВЕДЕНИЮ СЕРДЕЧНО-ЛЕГОЧНОЙ РЕАНИМАЦИИ

Станишевский А. Л.¹, Соколов Ю. А.¹, Новикова Н. П.¹, Тимошук А. Л.²

¹*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь*

²*Учреждение образования «Государственный институт повышения квалификации и переподготовки кадров в области газоснабжения «ГАЗ-ИНСТИТУТ» г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Ключевым звеном для спасения жизни пострадавшего при внегоспитальной остановке сердца (ВГОС) является проведение сердечно-легочной реанимации (СЛР) на месте происшествия случайными свидетелями. Для планирования мер, направленных на повышение эффективности оказания первой помощи (ПП) и снижение числа неблагоприятных исходов, необходимо четкое представление о степени готовности населения к проведению СЛР и факторах, ее определяющих.

Приведены результаты анализа данных анонимного анкетирования по вопросам готовности населения к проведению СЛР, на основании которого установлены основные определяющие детерминанты и предложены приоритетные направления оптимизации системы оказания ПП пострадавшим с ВГОС.

Ключевые слова: первая помощь, готовность, сердечно-легочная реанимация, внегоспитальная остановка сердца, обучение, мотивация, опрос.

Введение. Несмотря на прогрессивное развитие научных знаний и непрерывное совершенствование алгоритмов реанимационных мероприятий на месте происшествия, летальность и исходы оказания первой и экстренной медицинской помощи при ВГОС остаются неутешительными.

Не вызывая сомнений в высокой актуальности, ПП пострадавшим на месте происшествия при ВГОС остается слабым звеном в «цепочке выживания».

При этом время от момента начала эпизода до начала реанимационных мероприятий

является наиболее важным предиктором исхода экстренного состояния: даже незначительная задержка может стоить человеческой жизни. И если при механических травмах, не сопровождающихся жизнеугрожающим наружным кровотечением, временной интервал оказания первой и экстренной медицинской помощи укладывается в так называемый золотой час, то при ВГОС уместно говорить о «бриллиантовых минутах», определяющих прогноз для жизни.

Остановка сердца может возникнуть где и когда угодно – на улице или дома, а также в любой организации здравоохранения, оказывающей амбулаторную или стационарную медицинскую помощь. И если выживаемость пациентов с внезапной остановкой сердца, развившейся в организациях здравоохранения, может превышать 25 %, то ВГОС может приводить к летальному исходу более чем в 90 % случаев [1, 2].

Таблица 1 – Частота проведения СЛР и применения АНД случайными свидетелями происшествия (непрофессионалами) при ВГОС

Показатель, %	Источник данных					
	Girotra S. et al. (2016)	Larribau R. et al. (2018)	Bujak K. et al. (2021)	Birkun A. (2022)	Scquizzato T. et al. (2022)	Tsao C. et al. (2022)
Проведение СЛР	34,4	31,5	54,4	28,8	26,0	40,2
Применение АНД	2,3	3,5	4,6	–	3,2	9,0

Основными причинами неоказания полноценной помощи пострадавшим являются: отсутствие знаний и практических навыков по оказанию ПП (33–82 %), боязнь навредить пострадавшему при оказании ПП (54–70 %), незнание нормативно-правовой базы и боязнь юридической ответственности (37–64 %) [3]. Причины, лежащие в основе нежелания использовать АНД (для стран, где разрешено применение), включают не знание того, как работает устройство (40–85 %), неудобство его использования (72–84 %), боязнь причинения вреда пострадавшему (14–88 %) и юридической ответственности (4–38 %) [4].

Практический опыт зарубежных систем догоспитальной помощи свидетельствует, что организационные меры, направленные на повышение готовности населения к оказанию необходимой ПП (проведению СЛР и применению АНД до прибытия бригады скорой медицинской помощи при ВГОС, способствуют многократному снижению летальности при данной патологии [5].

Цель работы – на основании комплексной оценки результатов тестирования респондентов

ВГОС, являясь одной из ведущих причин смерти взрослого населения, по сути не только медицинская, но и медико-социальная проблема. Среднемировой показатель заболеваемости (инцидентности) ВГОС составляет 95,9 на 100 тыс. человек в год. В Европе ВГОС ежегодно развивается примерно у 275 тыс., в США — 350 тыс., а в КНР — 550 тыс. человек. На основании экстраполяции среднемирового показателя заболеваемости ВГОС на всю популяцию Республики Беларусь можно предполагать, что ежегодно в стране происходит более 8,8 тыс. таких случаев [3].

Одной из основных причин низкой выживаемости пострадавших с ВГОС является невысокая активность случайных свидетелей происшествия по оказанию необходимой ПП (проведение СЛР и использование автоматического наружного дефибриллятора (АНД), при разрешенном его применении) (таблица 1) [3].

Таблица 1 – Частота проведения СЛР и применения АНД случайными свидетелями происшествия (непрофессионалами) при ВГОС

по вопросам оказания ПП определить основные предикторы вероятности ее оказания на месте происшествия, а также предложить организационные мероприятия, направленные на повышение эффективности оказания ПП пострадавшим с ВГОС.

Материалы и методы. В рамках инициативной научно-исследовательской работы «Оптимизация оказания первой и экстренной медицинской помощи пострадавшим с тяжелой механической травмой на догоспитальном и госпитальном этапе», проводимой на кафедре скорой медицинской помощи и медицины катастроф, проведено анонимное анкетирование работников топливно-энергетического комплекса Республики Беларусь с использованием разработанных анкет «Готовность к оказанию первой помощи» и «Информированность о первой помощи» (январь – июнь 2023 г.).

Участие респондентов в анкетировании было анонимным и добровольным.

Анкеты содержали два блока вопросов: первый – тематический, второй – социально-демографическая характеристика респондентов.

Статистический анализ включал описательную статистику, оценку взаимосвязей между качественными переменными в таблицах сопряженности с применением критерия χ^2 Пирсона и сравнение трех и более выборок с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия Краскела–Уоллеса (Н). Для сравнения показателей в малых выборках использовались: критерий χ^2 Пирсона с поправкой на непрерывность Йейтса и точный критерий Фишера. Тесноту связи определяли с помощью коэффициента V Крамера (ϕ_c).

Статистически значимыми считали различия при значении $p < 0,05$. С целью идентификации и оценки факторов, определяющих вероятность проведения СЛР респондентами в реальных условиях, переменные с подтвержденной взаимосвязью ($p < 0,05$) после проверки на отсутствие коллинеарности включались в математические модели бинарной логистической регрессии. Для количественного описания результатов регрессионного анализа использовались отношение шансов (ОШ) и 95 % доверительный интервал (95 % ДИ). Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2021 (Microsoft, США) и IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM Corporation, США).

Результаты и их обсуждение. В исследование включено 636 анкет, корректно заполненных 318 респондентами, проживающими в г. Минске и не имеющими медицинского образования. В их числе 273 (85,8 %) мужчины и 45 (14,2 %) женщин.

Среди респондентов были представлены все возрастные группы взрослого населения: 23 (7,2 %) – от 18 до 24 лет, 32 (10,1 %) – от 25 до 29 лет, 100 (31,4 %) – от 30 до 39 лет, 73 (23,0 %) – от 40 до 49 лет, 59 (18,6 %) – от 50 до 59 лет, 28 (8,8 %) – от 60 до 69 лет и 3 (0,9 %) – от 70 лет и

старше (при анализе включены в группу от 60 до 69 лет).

По уровню образования 12 (3,8 %) составили респонденты с общим средним образованием, 21 (6,6 %) – с профессионально-техническим, 88 (27,7 %) – со средним специальным, 195 (61,3 %) – с высшим и 2 (0,6 %) – с научно-ориентированным (при анализе включены в группу высшее образование).

Опрос позволил определить степень готовности респондентов к проведению СЛР и некоторые определяющие ее факторы.

Для оценки степени готовности к проведению СЛР респондентам предлагалось ответить на вопрос «Какова вероятность того, что Вы предпримете попытку проведения СЛР пострадавшему в критическом состоянии (отсутствие сознания, дыхания) в реальных условиях?», оценив себя по шкале от 0 до 10 баллов (рисунок 1).

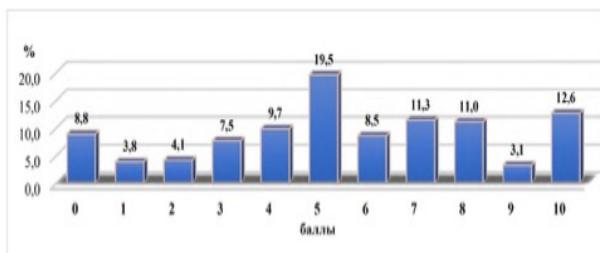


Рисунок 1 – Субъективная оценка респондентами степени своей готовности к проведению СЛР

Для последующих анализа, оценки связи характеристик выборки с полученными данными и определения соответствующих предикторов результаты ответов разделены на пять групп по степени готовности: крайне низкая – 0 и 1 балл; низкая – 2 и 3 балла; средняя – 4, 5 и 6 баллов; выше средней – 7 и 8 баллов; высокая – 9 и 10 баллов.

Анализ связи степени готовности респондентов к проведению СЛР с их социально-демографической характеристикой представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Связь степени готовности респондентов к проведению СЛР с их социально-демографической характеристикой

Параметры	Степень готовности, n (%)				
	крайне низкая	низкая	средняя	выше средней	высокая
Всего	40 (12,6)	37 (11,6)	120 (37,7)	71 (22,3)	50 (15,7)
Пол					
Мужской	28 (10,3)	31 (11,4)	105 (38,5)	62 (22,7)	47 (17,2)
Женский	12 (26,7)	6 (13,3)	15 (33,3)	9 (20,0)	3 (6,7)

Окончание табл. 2

	$\chi^2=9,461$ $p=0,002$	$\chi^2=0,147$ $p=0,701$	$\chi^2=0,432$ $p=0,511$	$\chi^2=0,164$ $p=0,686$	$\chi^2=3,245$ $p=0,072$
Личное образование					
ОСО	3 (25,0)	2 (16,7)	4 (33,3)	1 (8,3)	2 (16,7)
ПТО	2 (9,5)	5 (23,8)	11 (52,4)	2 (9,5)	1 (4,8)
ССО	15 (17,0)	10 (11,4)	35 (39,8)	15 (17,0)	13 (14,8)
ВО	20 (10,2)	20 (10,2)	70 (35,5)	53 (26,9)	34 (17,3)
	H=4,499 $p=0,212$	H=3,739 $p=0,291$	H=2,570 $p=0,463$	H=7,112 $p=0,068$	H=2,315 $p=0,510$
Возраст, лет					
18–24	1 (4,3)	3 (13,0)	8 (34,8)	6 (26,1)	5 (21,7)
25–29	2 (6,3)	2 (6,3)	17 (53,1)	9 (28,1)	2 (6,3)
30–39	8 (8,0)	8 (8,0)	39 (39,0)	25 (25,0)	20 (20,0)
40–49	10 (13,7)	9 (12,3)	24 (32,9)	19 (26,0)	11 (15,1)
50–59	10 (16,9)	12 (20,3)	18 (30,5)	10 (16,9)	9 (15,3)
60–69	9 (29,0)	3 (9,7)	14 (45,2)	2 (6,5)	3 (9,7)
	H=13,187 $p=0,022$	H=6,708 $p=0,243$	H=6,132 $p=0,294$	H=7,262 $p=0,202$	H=5,048 $p=0,410$

Примечание. В выделенных ячейках показаны статистически значимые отличия. ОСО – общее среднее образование; ПТО – профессионально-техническое образование; ССО – среднее специальное образование; ВО – высшее образование

Данные таблицы 2 демонстрируют, что статистически значимые различия определяются только в группе «Крайне низкая степень готовности» по критериям «Пол» ($\chi^2=9,461$; $p=0,002$; $\phi=0,172$) и «Возраст» ($H=13,187$; $p=0,022$; $\phi=0,204$).

В ходе анкетирования респондентам также было предложено ответить на следующие вопросы: «Проходили ли Вы обучение практическим навыкам СЛР?» и «Сталкивались ли Вы

когда-либо со случаями внезапной смерти вне организации здравоохранения (на улице, в транспорте, садоводческом товариществе и др.?)»

В таблице 3 представлены данные о прохождении респондентами обучения практическим навыкам СЛР, степени участия в проведении СЛР при внезапной смерти пострадавшего в реальных условиях и оценка связи полученных данных со степенью готовности респондентов к проведению СЛР.

Таблица 3 – Связь степени готовности респондентов к проведению СЛР с обучением практическим навыкам СЛР и участием в проведении СЛР в реальных условиях

Параметры	Всего, n (%)	Степень готовности, n (%)				
		Крайне низкая	Низкая	Средняя	Выше средней	Высокая
		40 (12,6)	37 (11,6)	120 (37,7)	71 (22,3)	50 (15,7)
Прохождение обучения практическим навыкам СЛР						
Проходил обучение	68 (21,4)	1 (1,5)	3 (4,4)	16 (23,5)	28 (41,2)	20 (29,4)
Изучал самостоятельно	29 (9,1)	1 (3,4)	4 (13,8)	8 (27,6)	8 (27,6)	8 (27,6)
Обучение не проходил	221 (69,5)	38 (17,2)	30 (13,6)	96 (43,4)	35 (15,8)	22 (10,0)
	H=14,066 $p=0,001$	H=4,377 $p=0,112$	H=10,140 $p=0,006$	H=19,700 $p=0,000$	H=18,188 $p=0,000$	
Участие в проведении СЛР в реальных условиях						
Принимал участие в проведении СЛР	9 (2,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (11,1)	4 (44,4)	4 (44,4)

Окончание табл. 3

За проведением СЛР наблюдал со стороны	50 (15,7)	4 (8,0)	5 (10,0)	23 (46,0)	8 (16,0)	10 (20,0)
Видел, но СЛР не проводилась	16 (5,0)	3 (18,8)	1 (6,3)	6 (37,5)	5 (31,3)	1 (6,3)
Не видел/не оказывал	243 (76,4)	33 (13,6)	31 (12,8)	90 (37,0)	54 (22,2)	35 (14,4)
	H=3,015 p=0,389	H=2,057 p=0,561	H=4,206 p=0,240	H=4,415 p=0,220	H=7,672 p=0,053	

Примечание. В выделенных ячейках показаны статистически значимые отличия.

Данные, приведенные в таблице 3, демонстрируют, что высокая степень готовности к проведению СЛР имеет четкую связь с прохождением обучения практическим навыкам СЛР ($H=18,188$; $p=0,000$; $\phi=0,0,240$).

Проведенный регрессионный анализ показал, что достоверными предикторами высокой готовности респондентов к проведению СЛР являются: предшествующее практическое (ОШ: 3,4; 95 % ДИ: 1,7–6,8; $p=0,001$) или самостоятельное обучение навыкам СЛР (ОШ: 3,2; 95 % ДИ: 1,3–8,2; $p=0,015$).

Для крайне низкой степени готовности характерными предикторами являются: отсутствие необходимого обучения правилам оказания ПП (ОШ: 8,6; 95 % ДИ: 2,0–37,0; $p=0,004$), женский пол (ОШ: 3,2; 95 % ДИ: 1,4–7,3; $p=0,005$) и возраст респондентов 60–69 лет и выше (ОШ: 3,1; 95 % ДИ: 1,2–7,4; $p=0,017$).

Наличие предиктора «Женский пол» в группе «Крайне низкая степень готовности» вполне объяснима: мужчины проходят обучение по долгу службы, на военных кафедрах и чаще являются автолюбителями, проходя обучение в автошколах (из 164 респондентов, указавших, что проходили обучение на курсах вождения, 144 (87,8 %) являлись мужчинами), а из 68 респондентов, прошедших обучение навыкам СЛР, 60 (88,2 %) составили мужчины и лишь 8 (11,8 %) — женщины.

Таким образом, по результатам комплексной оценки полученных данных был сформулирован вывод о том, что основным фактором, определяющим высокий уровень готовности респондентов к проведению СЛР, является предшествующее обучение навыкам СЛР. Следовательно, повышение степени охвата населения обучением необходимым навыкам оказания ПП является одним из ключевых направлений повышения готовности населения к оказанию ПП.

Вместе с тем следует отметить существующие в настоящее время определенные

проблемные вопросы в практической реализации данного направления.

В настоящее время не в полной мере реализованы информирование о важности ПП, правовых и практических аспектах ее оказания, существующих возможностях обучения (до 50,3 % респондентов не доводили информацию о наличии учебно-тренировочных центров и возможности дополнительного обучения, а прошли обучение в них лишь 1,9 % опрошенных) и мотивация населения к обучению ПП посредством телевидения, печатные издания, средства наглядной агитации, социальных сетей (50,9 % респондентов считают «понимание важности обучения» основным фактором для прохождения дополнительного обучения). Учебные издания по ПП, используемые для обучения вне учебно-тренировочных центров, содержат противоречивую и, зачастую, неактуальную информацию наряду с не соответствующими нормативно-правовой базе рекомендациями [6].

На официальных сайтах учреждений здравоохранения достаточно часто встречается краткая и неструктурированная информация о ПП и порядке действий на месте происшествия до приезда бригады скорой медицинской помощи. Вместе с тем целенаправленный поиск необходимой информации в интернете требует значительных временных затрат, а поисковые системы нередко предоставляют советы, не соответствующие актуальным рекомендациям или не соответствующие уровню подготовленности людей, что несет в себе потенциальную угрозу причинения дополнительного вреда пострадавшему [7].

Приведенные данные подтверждаются и ответами на вопрос анкеты (с возможностью множественного выбора ответов) «Представьте, что сейчас Вам необходимо провести пострадавшему СЛР — начать компрессии грудной клетки и искусственное дыхание.

Что может послужить препятствиями для ее проведения (абсолютно незнакомому Вам человеку/родному (близкому) Вам человеку)?», где

подавляющее большинство респондентов выбрало ответы «Боязнь причинить непоправимый вред пострадавшему» – 169 (53,1 %) / 149 (46,9 %) и «Недостаток знаний и навыков по проведению СЛР» — 155 (48,7 %) / 133 (41,8 %), соответственно.

Заключение. По данным исследования, субъективно степень своей готовности к проведению СЛР пострадавшему в критическом состоянии оценили как высокую лишь 15,7 % респондентов. Достоверным предиктором высокой готовности к проведению СЛР является предшествующее практическое или самостоятельное обучение навыкам СЛР, а основными барьерами — боязнь причинить непоправимый вред пострадавшему и недостаток знаний и навыков по проведению СЛР.

Перспективными направлениями оптимизации существующей системы обучения

населения правилам оказания ПП считаем: повышение мотивации населения к обучению посредством социально-психологического воздействия через приоритетные для каждой социальной группы источники информации; унификации обучения через законодательное внедрение единых подходов к обучению ПП на всех этапах получения образования и формирование электронной базы размещения информационных материалов – национального сайта «Первая помощь», содержащего доступную и нормативно закрепленную информацию; введение обязательной учебной дисциплины (учебного предмета) «Первая помощь» и подготовка соответствующих специалистов (инструкторов и преподавателей по ПП) для проведения обучения при реализации образовательных программ профессиональной подготовки и переподготовки рабочих (служащих) непосредственно на рабочих местах.

Список цитированных источников

1. The global survival rate among adult out-of-hospital cardiac arrest patients who received cardiopulmonary resuscitation: a systematic review and meta-analysis / S. Yan [et al.] // Critical care. – 2020. – Vol. 24, N 1. – P. 1–13.
2. Heart disease and stroke statistics — 2022 update: a report from the American Heart Association / C. W. Tsao [et al.] // Circulation. – 2022. – Vol. 14, N 8. – P. e504.
3. Актуальность и проблемы оказания первой помощи при внегоспитальной остановке сердца / А. Л. Станишевский, О. В. Солтан, А. В. Евтух // Военная и экстремальная медицина: перспективы развития и проблемы преподавания : сб. науч. статей Междунар. науч.-метод. конф., посвящ. 30-летию основания военной кафедры, Гомель, 21–22 марта 2023 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Гомельский гос. мед. ун-т ; редкол. : И. О. Стома, Е. В. Воропаев, А. О. Шпаньков [и др.]. – Гомель : ГомГМУ, 2023. – С. 78–84.
4. Barriers and facilitators to public access defibrillation in out-of-hospital cardiac arrest: a systematic review / C. M. Smith // European heart journal. Quality of care and clinical outcomes. – 2017. – Vol. 3, N 4. – P. 264–273.
5. Биркун, А. А. Внегоспитальная остановка сердца: оценка статуса проблемы и определение приоритетных направлений усовершенствования оказания помощи по данным Крымского регистра за 2020–2022 гг. / А. А. Биркун, Л. П. Фролова, Г. Н. Буглак // Российский кардиологический журнал. – 2024. – Т. 29, № 1. – С. 20–28.
6. Станишевский, А. Л. Обучение первой помощи: проблемы и решения / А. Л. Станишевский // Фундаментальная наука и образовательная практика : материалы III Респ. науч.-метод. конф. с междунар. участием «Актуальные проблемы современного естествознания», Минск, 30 нояб. 2023 г. / Респ. ин-т высш. шк. ; редкол. : В. А. Гайсенок, О. Н. Григорьева, Е. Н. Артеменок [и др.]. – Минск : РИВШ, 2023. С. 307–311.
7. Birkun, A. A. Google's advice on first aid: evaluation of the search engine's question-answering system responses to queries seeking help in health emergencies / A. A. Birkun, A. Dr. Gautam // Prehospital and disaster medicine. – 2023. – Vol. 38, N 8. – P. 345–351.

Readiness of the metropolitan population to perform cardiopulmonary resuscitation

Stanishevsky A. L.¹, Sokolov Y. A.², Novikava N. P.¹, Timoshuk A. L.³

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

*²State Institute of Advanced Studies and Retraining in the Field of Gas Supply «GAZ-INSTITUT»,
Minsk, Republic of Belarus*

Cardiopulmonary resuscitation (CPR) given by bystanders at the scene is key to saving the life of a victim of out-of-hospital cardiac arrest (OHCA). Planning activities to improve the effectiveness of first aid and reduce unfavorable outcomes requires a clear understanding of the extent to which people are prepared to give CPR and its determinants. The article presents the analysis of anonymous questionnaire data on the readiness of the population to give CPR, on the basis of which the factors determining it are revealed and the priority directions of improving the provision of first aid to victims with OHCA were proposed.

Keywords: first aid, readiness, cardiopulmonary resuscitation, out-of-hospital cardiac arrest, training, motivation, survey.

Поступила 05.06.2024

УДК 616.9:579.869.1

ЛИСТЕРИОЗ И ИЗОЛЯТЫ *L. MONOCYTOGENES*, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

*¹Тонко О. В.,¹Коломиец Н. Д.,¹Ханенко О. Н.,¹Романова О. Н.,²Левшина Н. Н.,
²Ромашко Ю. В.,³Клюйко Н. Л.,³Смаль А. П.,⁴Суховерхая В. В.*

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

*²Государственное учреждение «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии»,
г. Минск, Республика Беларусь;*

*³Учреждение здравоохранения «Городская детская инфекционная клиническая больница»,
г. Минск, Республика Беларусь;*

*⁴Государственное учреждение «Минский зональный центр гигиены и эпидемиологии»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Изучены особенности клинико-лабораторных данных листериоза на современном этапе в Республике Беларусь и изоляты *Listeria monocytogenes*, выделенные из клинического материала, пищевых продуктов и окружающей среды. Установлено, что динамика заболеваемости листериозом за 2017–2023 гг. характеризуется тенденцией к стабилизации с темпом прироста в 2023 г. 87,5% и распространением среди групп риска (беременные женщины, люди с хроническими заболеваниями и дети) с тяжелым течением и высокими показателями летальности. Показано значительное распространение антибиотикорезистентных штаммов *L. monocytogenes* как клинического так и пищевого происхождения, при этом 33,3% (95% ДИ 20,7–45,9) из них имели резистентность к эритромицину и 85,2% (95% ДИ 75,7–94,7) к сульфаметоксазолу/триметоприму. Предложено выявление близкородственных связей между клиническими изолятами и листериями из пищевых продуктов и среды технологического окружения пищевых производств методом матричной лазерной времепролетной масс-спектрометрии для эпидемиологического типирования с целью установления путей и факторов передачи.

Ключевые слова: листериоз, *L. monocytogenes*, пациенты группы риска, устойчивость к антибиотикам, масс-спектрометрия, пищевые продукты.

Введение. Безопасная пища является основным фактором, определяющим здоровье и благополучие человека. Однако люди во всем мире страдают от болезней пищевого происхождения, оказывающих значительное влияние на общественное здравоохранение и развитие стран. Ежегодно, по оценкам ВОЗ, 600 миллионов человек, почти каждый десятый в мире, заболевают после употребления зараженной пищи, что в пересчете в глобальном ежегодном бремени выражается в 33 миллиона лет жизни с поправкой на инвалидность (DALY) и 420 тысяч смертей, в том числе 125 тысяч смертей детей моложе пяти лет [1].

В 2022 году в Европейском союзе (ЕС) листерiosis был отнесен к одному из наиболее тяжелых зоонозных заболеваний с высоким количеством госпитализаций и смертей. В ЕС число зарегистрированных вспышек и случаев заболеваний пищевого происхождения, госпитализаций и смертей в 2022 г. было выше, чем в 2021 г.

Самым высоким в ЕС за последние 10 лет было число смертей от вспышек, в основном вызванных *L. monocytogenes* и в меньшей степени сальмонеллой. В 2022 г 27 государств-членов сообщили о 2738 подтвержденных инвазивных случаях заражения *L. monocytogenes* у людей.

Эти случаи привели к 1330 госпитализациям и 286 смертям. Таким образом, в настоящее время листерiosis является одним из наиболее серьезных заболеваний пищевого происхождения, находящихся под эпидемиологическим надзором [2].

L. monocytogenes – грамположительная полиморфная палочка, способная вызывать разной степени тяжести заболевания, вплоть до тяжелой генерализованной инфекции, проявляющейся поражением различных органов и систем, в том числе поражением ЦНС, а у беременных – внутриутробным инфицированием плода, часто сопровождающимся абортами, мертворождениями и высокой летальностью среди новорожденных. Наряду с этим проблема листериоза становится все более актуальной в связи с увеличением случаев заражения его возбудителем людей со сниженным иммунитетом. *L. monocytogenes* широко распространена в окружающей среде и относится к сапрофитическим микроорганизмам, то есть способным длительно сохраняться и размножаться вне макроорганизма.

Листериоз передается преимущественно с пищевыми продуктами. До 1980-х г. XX в. это была относительно редкая инфекция, регистрируемая преимущественно среди людей, связанных с животноводством. В настоящее время это

заболевание является одной из ведущих пищевых инфекций во всем мире с летальностью при менингеальных и/или септических формах до 20–40 %, достигая при внутриутробном инфицировании 80 %.

Причины подобного изменения эпидемической ситуации до сих пор остаются до конца невыясненными. Отчасти увеличение заболеваемости листериозом связано с удлинением сроков хранения пищевых продуктов при низкой температуре, что способствует размножению в них листерий, несмотря даже на первично незначительную контаминацию.

С другой стороны, нельзя исключать возможности того, что со временем изменились свойства штаммов листерий, циркулирующих в окружающей среде и представляющих опасность для человека [3, 4].

Остаются невыясненными биологические особенности *L. monocytogenes*, обитающих в разных экологических условиях. Особый интерес представляет вопрос о патогенных свойствах листерий, выделяемых из пищевых продуктов и объектов окружающей среды.

Так, известно, что *L. monocytogenes* обладает природной устойчивостью к полимиксину, фосфомицину, фузидиевой кислоте, цефалоспоринам II и III поколения, в том числе к цефотаксиму, цефтриаксону, цефуроксиму. При этом отмечается, что увеличивается частота штаммов, характеризующихся наличием приобретенной устойчивости к антибиотикам, как среди клинических, так и среди изолятов, выделенных из окружающей среды, что требует проведения мониторинга резистентности среди *L. Monocytogenes* [5].

Внутривидовое типирование *L. monocytogenes* подразумевает деление на несколько филогенетических линий, однако установлено, что большинство спорадических случаев и все вспышки обусловлены штаммами листерий, относящимися к сравнительно узкой филогенетической группе внутри вида *L. monocytogenes*, характеризующейся принадлежностью к серогруппам 4b (около 90 % эпидемических случаев), ½a и ½b.

Кроме того, для данного маркирования штаммов в основном проводится длительное и дорогостоящее исследование – мультилокусное секвенирование (MLST) [6], которое чаще является недоступным для использования в практическом здравоохранении и требует разработки для лабораторий исследований по эпидемиологическому сравнению выделенных из биологического материала и из пищевого продукта и/или

окружающей среды изолятов. Практически отсутствуют работы, в которых были бы отражены характеристика листерий, обитающих в среде технологического окружения пищевых предприятий и в пищевых продуктах, а также сравнение изолятов с клинически значимыми штаммами, вызывающими заболевания у людей, что в настоящее время представляется важным ввиду возможности заноса высоковирулентных штаммов *L. monocytogenes* в окружение человека.

Цель работы – изучить фенотипические особенности *L. monocytogenes*, выделенных из клинического материала, пищевых продуктов и среды технологического окружения, и предложить технологию для проведения эпидемиологического типирования изолятов при расшифровке путей и факторов передачи.

Материалы и методы. Объектом исследования явились истории болезни пациентов с различными клиническими формами листериоза, госпитализированных в период с 2017 по 2023 гг., и 55 штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из клинического материала, пищевых продуктов и среды технологического окружения.

В основу сбора необходимой информации для проведения ретроспективного анализа клинико-лабораторных характеристик включены данные из первичной медицинской документации пациентов, вносимые в специально разработанные карты и таблицы.

Условиями включения в исследование явились наличие клиники листериозной инфекции и обнаружение *L. monocytogenes* в биологическом материале бактериологическим методом.

Штаммы *L. monocytogenes*, предварительно выделенные с использованием стандартных микробиологических методов в чистом виде на питательных средах, предназначенных для их роста и обнаружения, идентифицировали с использованием биохимических тестов системой API Listeria (bioMérieux, Франция), автоматического микробиологического анализатора VITEK 2 Compact, а также методом матричной лазерной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF) на анализаторе Autof MS 1000 (Autobio Diagnostics, Китай).

Для определения чувствительности листерий к антибиотикам использовали диско-дифузионный метод, метод серийных микроразведений и метод оценки риска формирования антибиотикорезистентности, разработанный нами и отраженный в инструкции по применению [7]. Полученные цифровые данные обработаны с использованием методов статистики, адекватных

поставленным задачам и объемам выборочных совокупностей. Обработку проводили с применением Excel 2010.

Для эпидемиологического типирования изолятов листерий, с целью определения близости родства между ними, использовали технологию матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией на анализаторе Autof MS 1000 и метод кластерного анализа с обработкой данных в программе STATISTICA Версия 10 (SNBXXR207F383502FA-D).

Результаты и обсуждение. Многолетняя динамика заболеваемости листериозом за 2017–2023 гг. характеризуется тенденцией к стабилизации, однако темп прироста в 2023 г. составил +87,5 %.

По данным государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», в 2023 г. официально зарегистрировано 14 случаев заболевания (0,15 на 100 тысяч населения), при этом в 2022 г. в 2 раза меньше – 0,08 на 100 тысяч населения (рисунок 1). Заболеваемость листериозом в нашей стране существенно ниже, чем, например, в странах ЕС. Так, заболеваемость в 2022 г. в ЕС составила 0,62 случая на 100 тысяч населения, что было на 15,9 % больше по сравнению с 2021 г. (0,53 случая на 100 тысяч населения) и являлось самым высоким показателем случаев, зарегистрированных с 2007 г.

Общая тенденция по листериозу в ЕС не показала какого-либо существенного изменения [2].

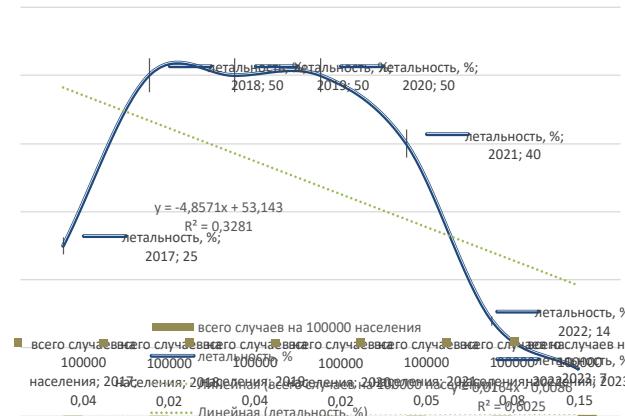


Рисунок 1 – Динамика заболеваемости листериозом и летальности в Республике Беларусь за 2017–2023 гг.

Однако из данных рисунка 1 видно, что, в отличие от других кишечных заболеваний от листериоза, в Республике Беларусь регистрируются случаи летального исхода от 50 % в 2018–2020 гг.



до 7 % в 2023 г. При этом, по данным официальной статистики, в 2022 г. в странах ЕС летальность составила 18,1 %, что было выше, чем в 2021 и 2020 гг. (13,7 и 13,0 % соответственно). Причиной высокой летальности от листериоза во всем мире является то, что часто заболевание возникает у пациентов групп риска: беременных женщин, людей с хроническими заболеваниями и детей. Кроме того, в официальную статистику попадают в основном только случаи тяжелого течения заболевания.

Случай из клинической практики. Нами проведена оценка клинико-лабораторных данных пациентов с листериозом. В качестве примера мы представляем случай из клинической практики.

Пациентка Т. (2 года) поступила 25.06 в ГДИКБ переводом из РНПЦ детской хирургии с диагнозом острой респираторной инфекции и синдромом раздраженного кишечника. Состояние пациентки при поступлении тяжелое, жалобы на повышение температуры до 39 °C, рвоту, вялость, сонливость, снижение аппетита. Госпитализирована в отделение интенсивной терапии и реанимации (ОИТР). При осмотре: состояние тяжелое, обусловлено дегидратацией, синдромом системного воспалительного ответа. В сознании, вялая, негативно реагирует на осмотр. Оценка по

шкале комы Глазго – 14 баллов. Менингеальные симптомы отрицательны, очаговой симптоматики нет. Кожные покровы бледные, чистые, тургор снижен. Конечности прохладные. Температура – 37,9 °C. Слизистые клейкие. Зев раздражен. Катаральных симптомов нет. Дыхание спонтанное, аускультативно пуэрильное, проводится во все отделы, хрипов нет. Кислородной зависимости нет. Сатурация SpO₂ 97–100 %. Участия вспомогательной мускулатуры в акте дыхания нет. Гемодинамика стабильная. Тоны сердца ясные, ритмичные. ЧСС 110, АД 109/70. Симптом бледного пятна менее 3 с. Аппетит снижен. Рвоты в день поступления не было. Живот мягкий, вздутый, доступен глубокой пальпации. Печень у края реберной дуги. Селезенка не пальпируется. Перистальтика активная. Стула не было с 21.06. Диурез сохранен.

Клинико-лабораторные данные течения заболевания отражены в таблице 1.

Пациентка Т. находилась в ОИТР по 28.06, после чего была переведена в отделение № 11 и находилась там до выписки (20.07).

В качестве инструментальных исследований были назначены ЭКГ по стандартной методике, МРТ и УЗИ сердца и брюшной полости. Данные исследования отклонений не выявили.

Таблица 1 – Схема истории болезни пациентки Т., 2 года

Пациентка Т., 2 года, девочка, 17.03.2016 г. р., история болезни №12209 поступила 25.06.2018	Июнь-июль 2018											
	Переведена из РНПЦ детской хирургии											
Госпитализирована	ОИТР				Отделение № 11							
Даты госпитализации	25.06	26.06	27.06	28.06.	29.06	03.07	05.07	06.07	09.07	10.07	12.07	13.07
Дополнительные исследования				ЭКГ				МРТ ГМ		УЗИ ОБП		УЗИ сердца
Симптомы	Состояние тяжелое. Дегидратация, синдромом системного воспалительного ответа				Улучшение							

Окончание табл. 1

Лабораторные данные			
Кровь	Лейкоциты — $27,99 \cdot 10^9 /л$; СОЭ — 40 мм/ч; гемоглобин — 97 г/л; тромбоциты — $502 \cdot 10^9 /л$; СРБ — 17	Лейкоциты — $18,27 \cdot 10^9 /л$; СОЭ — 32 мм/ч; гемоглобин — 110 г/л; тромбоциты — $445 \cdot 10^9 /л$; СРБ — 9,3; прокальцитонин — 0,53	Лейкоциты — $7,72 \cdot 10^9 /л$; СОЭ — 15 мм/ч; гемоглобин — 127 г/л; тромбоциты — $291 \cdot 10^9 /л$; СРБ — 1,7; прокальцитонин — 0,05
Моча	Кетоновые тела; лейкоциты — 7–9	Кетоновые тела; лейкоциты — 10–15; белок; бактерии	кетоновые тела лейкоциты — 1–3
Ликвор	Цитоз — 505 кл/ $мм^3$; глюкоза — 48,6 мг/дл; белок — 2,7 ммоль/л	Цитоз — 34 кл/ $мм^3$; глюкоза — 2,2 ммоль/л; белок — 15,4 мг/дл	—
Бактериологические исследования	L. monocytogenes из ликвора		
ПЦР	ДНК Эпштейна–Барр — 29 МЕ/мл		
Диагноз	Острый гнойный бактериальный менингит		

В общем анализе крови при поступлении высокая СОЭ (40 мм/ч при норме 4–12 мм/ч), сниженный гемоглобин (97 г/л при норме 110–140 г/л). Ярко выражено повышение уровня тромбоцитов ($502 \cdot 10^9 /л$ при верхней границе нормы в $390 \cdot 10^9 /л$) и лейкоцитов ($27,99 \cdot 10^9 /л$ при верхней границе нормы в $12,2 \cdot 10^9 /л$). Стоит также отметить повышение уровня палочкоядерных нейтрофилов до 14 % (при норме 1–4 %), лимфоцитопению (12 % при норме 26–60 %) и моноцитоз (14 % при норме 2–10 %).

По биохимическому анализу на 25.06, 27.06 и 05.07 отмечался повышенный уровень СРБ, составляющий 17, 8,7 и 9,3 мг/л соответственно, и высокий уровень прокальцитонина, что подтверждало наличие у ребенка системной воспалительной реакции.

В ходе проведения лабораторных исследований ликвора установлен воспалительный процесс в ЦНС и бактериологическим методом идентифицирована *L. monocytogenes*, что послужило основанием для клинического диагноза «Острый гнойный бактериальный менингит».

В связи с тем, что у детей до 6–7 лет активно формируется иммунитет, они так же являются группой риска и более уязвимы к заражению

кишечными инфекциями, в том числе и к листериозу, при этом течение данного заболевания у детей более тяжелое, чем у взрослых пациентов.

Исследование антибиотикочувствительности *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* не связывали ранее с проблемой антибиотикорезистентности. Считается, что этот вид бактерий чувствителен к антибактериальным препаратам, имеющим спектр действия против грамположительных бактерий. Препаратами основного ряда при антибиотикотерапии листериоза являются пенициллины. Препаратами второго ряда — эритромицин, сульфаметоксазол/триметоприм, меропенем. Однако в литературе стали появляться публикации, отмечающие рост частоты циркуляции штаммов *L. monocytogenes*, устойчивых к антибиотикам.

Для изучения антибиотикочувствительности были отобраны культуры *L. monocytogenes*, выделенные из пищевого сырья, продуктов и среды технологического окружения пищевых производств в результате проведенной ранее научно-исследовательской работы.

На первом этапе изоляты *L. Monocytogenes* были проанализированы на чувствительность к антибактериальным препаратам диско-

диффузионным методом. Всего было протестировано 54 культуры к 5 антибактериальным препаратам: пенициллину, ампициллину, меропенему, эритромицину, сульфаметоксазолу/триметоприму. Установлено, что из 54 протестированных культур устойчивыми к эритромицину являются 33,3 % (95% ДИ 20,7–45,9) и к сульфаметоксазолу/триметоприму 85,2 % (95% ДИ 75,7–94,7), при этом все 100 % штаммов *L. monocytogenes* были чувствительны к пенициллину, ампициллину и меропенему.

Кроме того, был проведен анализ антибиотикочувствительности изолятов, выделенных из мочи и крови пациентов. Установлено, что клинические *L. monocytogenes* были чувствительны к пенициллину и эритромицину и устойчивы к сульфаметоксазолу/триметоприму.

Таблица 2 – Результаты исследования чувствительности к антибиотикам изолята *L. monocytogenes*

Откуда выделен	Антибиотик	ПК, мг/л	НПК, мг/л	ВПК, мг/л	МИК, мг/л	Диапазон МИК	Вероятность риска, баллы
Биточки свиные	Меропенем	0,25	0,016	1	0,06	¼ ПК	1
	Эритромицин	1	0,06	4	0,25	¼ ПК	1
	Сульфометоксазол/триметоприм	0,06	0,004	0,25	0,016	¼ ПК	1
	Бензил-пенициллин	1	0,06	4	0,5	½ ПК	2
	Ампициллин	1	0,06	4	1	ПК	2

Примечание: НПК – нижняя ПК; ВПК – верхняя ПК; МИК – минимальная ингибирующая концентрация

Учет результатов определения МИК к антибиотикам изолятов, выделенных из пищевых продуктов, проведен в соответствии с инструкцией [7]. Установлено, что данный изолят *L. monocytogenes* имеет по одному значению МИК = ПК, МИК = ½ ПК и МИК = ¼ ПК. В соответствии с алгоритмом риск оценен в 5 баллов, а изолят отнесен к штаммам с низкой степенью риска формирования антибиотикорезистентности.

Анализ масс-спектров и типирование изолятов *L. Monocytogenes*. Для эпидемиологического типирования с целью определения близости родства между ними 55 изолятов листерий реидентифицированы на масс-спектрометре. Результаты проведенного анализа были взяты с точность до 9,6 и показали повторение нескольких пиков, которые мы оценили как характерные для *L. monocytogenes*. В основном, отмечалось

Для некоторых изолятов *L. monocytogenes*, выделенных из пищевых продуктов, была проведена оценка пороговой концентрации (ПК (мг/мл)) методом серийных микроразведений. Чтобы оценить степень риска формирования антибиотикорезистентности, оценивались значения антибиотиков для изолятов, выделенных из пищевых продуктов. Затем для анализа из всех результатов выбирались три значения, которые наиболее приближены или равны ПК, и по ним проводилась оценка степени риска в баллах в соответствии с алгоритмом.

Результаты исследования чувствительности к антибиотикам изолята *L. monocytogenes*, выделенного из продуктов животного происхождения методом микроразведений, представлены в таблице 2.

повторение пиков с отношением массы к заряду (*m/z*) равными 4322, 5300, 6385, 6421, 9745, которые зачастую являлись и самыми высокими по оси интенсивности ионизации (рисунок 3).

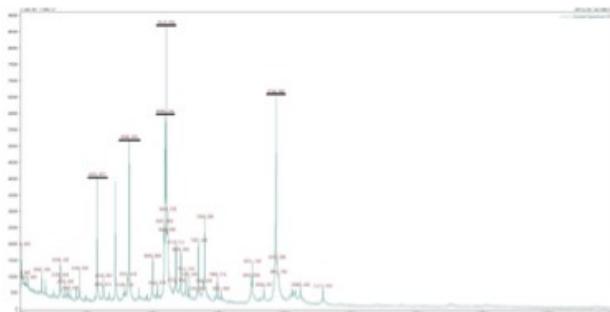


Рисунок 3 – Полученный масс-спектр изолята *L. monocytogenes* из продукта животного происхождения

Подтверждено, что каждый штамм имеет уникальный белковый профиль, что стало основой для анализа степени родства изолятов. Результаты MALDI-TOF были занесены в программу для дальнейшего построения схемы родства изолятов листерии. Объединение схожих спектров в группы проводили методом кластерного анализа, в качестве метрики задавали евклидово расстояние.

Степень сходства масс-спектров представили как величину, тождественно равную расстоянию между объектами.

Построена матрица расстояний, учитывавшая значение m/z и интенсивность каждого сигнала. Иерархическую кластеризацию штаммов отразили в виде дендрограммы. Расстояние между кластерами определяли методом Варда, отражающим объединение субгрупп, характеризующихся наибольшим сходством.

В сравнение были включены изоляты листерий, выделенные из крови (1h), мочи (2h) и ликвора (3h) (рисунок 4).

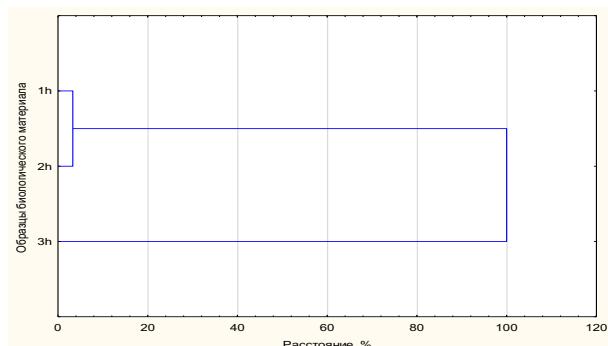


Рисунок 4 – Схема родства изолятов *L. monocytogenes*, выделенных из биологического материала

Установлено, что близкородственными являются изоляты листерий, выделенные из образцов крови (1h) и мочи (2h). А изолят, выделенный из образца ликвора (3h), находится в некоторой отдаленности от них. В дальнейшем данные образцы сравнивались с листериями, выделенными из разных групп продуктов для выявления близкородственных связей между ними и предполагаемыми факторами передачи (рисунок 5).

Так, установлено: что изолят, выделенный из образца крови (1h), имеет близкородственные связи с изолятом из образца фарша куриного № 4 (41c); изолят, выделенный из образца мочи (2h), находится в близкородственных связях с изолятом из образца колбасок (26р); изолят, выделенный из образца ликвора (3h), находится в отдалении от всех штаммов, указанных на рисунке 5.

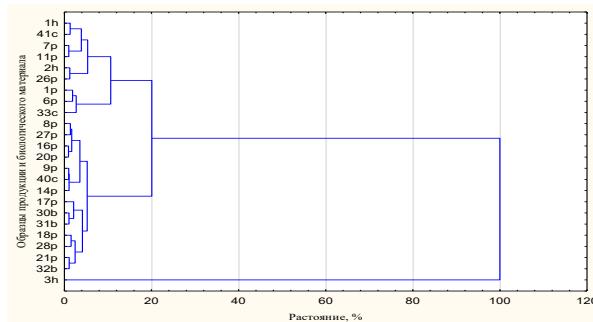


Рисунок 5 – Схема родства изолятов *L. monocytogenes*, выделенных из биологического материала и продукции животного происхождения

Заключение. На основании проведенных исследований установлено, что динамика заболеваемости листериозом за 2017–2023 гг. характеризуется тенденцией к стабилизации с темпом прироста в 2023 г. 87,5 % и распространением среди групп риска (беременные женщины, люди с хроническими заболеваниями и дети) с тяжелым течением и высокими показателями летальности (до 50 %). Среди пациентов с хроническими заболеваниями наиболее часто наблюдается тяжелое течение, сопровождающееся поражением ЦНС. У беременных обычно листериоз протекает бессимптомно и не диагностируется на начальных стадиях заболевания, при этом диагноз устанавливается только при угрозе выкидыша, преждевременных родов и при подозрении на врожденный листериоз у новорожденного. Дети до 6–7 лет, у которых еще активно формируется иммунитет, являются уязвимым контингентом к заражению кишечными инфекциями, имеют повышенный риск инфицирования *L. Monocytogenes* и развития генерализованной формы заболевания. Это свидетельствует о необходимости внедрения унифицированного алгоритма диагностики листериоза у пациентов групп риска. Проведена оценка фенотипических характеристик, в том числе исследована чувствительность к антибактериальным препаратам 54 изолятов *L. monocytogenes*, выделенных из клинического материала, пищевых продуктов и среды технологического окружения. Показано значительное распространение антибиотикорезистентных штаммов *L. monocytogenes* как клинического, так и пищевого происхождения, при этом 33,3 % (95% ДИ 20,7–45,9) из них имели резистентность к эритромицину и 85,2 % (95% ДИ 75,7–94,7) – к сульфаметоксазолу/триметоприму.

Методом времяпролетной масс-спектрометрии изучены белковые профили 55 изолятов *L. Monocytogenes* и выявлены



близкородственные связи между клиническими изолятами и изолятами из пищевых продуктов и среды технологического окружения, что указывает на возможность применения данной

технологии для проведения эпидемиологического типирования при расшифровке путей и факторов передачи листерий с пищевыми продуктами.

Список цитированных источников

1. WHO global strategy for food safety 2022–2030: towards stronger food safety systems and global cooperation. – Geneva : World Health Organization, 2022. – 74 p.
2. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report / EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) // EFSA Journal. – 2023. – Vol. 21, Issue 12. – 222 p (e8442).
3. Pagliano, P. Epidemiology and treatment of the commonest form of listeriosis: meningitis and bacteraemia / P. Pagliano, F. Arslan, T. Ascione // Le Infez Med. – 2017. – Vol. 25, N 3. – P. 210–216.
4. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis / C. M. de Noordhout [et al.] // Lancet Infect Dis. – 2014. – Vol. 14, N 11. – P. 1073–1082.
5. Распространение антимикробной устойчивости среди клинических и пищевых изолятов *Listeria monocytogenes*, выделенных в Москве в 2019–2021 гг. / С. А. Ермолова [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2022. – Т. 24, № 2. – С. 156–164.
6. Анализ спорадических случаев инвазивного листериоза в мегаполисе / О. Л. Воронина [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2020. – Т. 97, № 6. – С. 546–555.
7. Метод оценки риска формирования антибиотикорезистентности у бактерий, выделенных из продовольственного сырья и пищевых продуктов : инструкция по применению 017-1221 : утв. постановлением Гл. гос. санитар. врача Респ. Беларусь 28.01.2022. – Минск, 2022. – 22 с.

Listeriosis and *L.monocytogenes* isolated from the environment and biological material

¹Tonko O. V., ¹Kolomiets N. D., ¹Hanenko O. N., ¹Romanova O. N., ¹Levshina N. N.,

²Romashko J. V., ³Klyuiko N. L., ³Smal A. P., ⁴Sukhoverkhaya V. V.

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

²Minsk City Center for Hygiene and Epidemiology, Minsk, Republic of Belarus;

³City Children's Infectious Diseases Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus;

⁴Minsk Zonal Center for Hygiene and Epidemiology, Minsk, Republic of Belarus

The clinical and laboratory characteristics of listeriosis and *Listeria monocytogenes* isolated from clinical material, food products and the environment have been studied at the present stage in the Republic of Belarus. It has been established that the long-term dynamics of listeriosis incidence for 2017–2023 is characterized by a tendency to stabilization, with an increase rate of 87,5 % in 2023 and spread among risk groups (pregnant women, people with chronic diseases and children), with a severe course and high mortality rates. A significant spread of antibiotic-resistant strains of *L. monocytogenes* of both clinical and food origin has been shown, with 33,3 % of them having resistance to erythromycin and 85,2 % to trimethoprim/sulfamethoxazole. It is proposed to identify closely related relationships between clinical isolates and *Listeria* strains from food products and the technological environment of food enterprises using the method of matrix laser time-of-flight mass spectrometry for epidemiological typing in order to establish transmission routes and factors.

Keywords: listeriosis, *L. monocytogenes*, risk group patients, antibiotic resistance, mass spectrometry, food products

Поступила 05.06.2024

УДК616-056.25-001.37:547.223

ОЦЕНКА АЛИМЕНТАРНЫХ РИСКОВ ЗДОРОВЬЮ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОТДЕЛЬНЫМИ ПОЛИБРОМОРИРОВАННЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

Федоренко Е. В.

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», Минск,
Республика Беларусь*

Реферат. Полибромдифениловые эфиры (ПБДЭ), относящиеся к стойким органическим загрязнителям, широко используются в качестве антипаренов при производстве различных видов продукции. Данные липофильные, способные к биоаккумуляции соединения воздействуют на эндокринную, репродуктивную и нервную системы. Приоритетными при алиментарном пути поступления являются БДЭ-47, БДЭ-99 и БДЭ-209, ведущий их источник – рыба и рыбная продукция. Национальными гигиеническими нормативами наличие указанных соединений выше предела количественного определения аналитического метода не допускается. Исследования показывают высокую вероятность контаминации пищевой продукции ПБДЭ. Проведена оценка прогнозируемой алиментарной экспозиции БДЭ-47, БДЭ-99 и БДЭ-209 с учетом национальных данных потребления пищевых продуктов среди взрослых. Оценка рисков здоровью, ассоциированных с прогнозируемым поступлением приоритетных полибромированных соединений с рационом, свидетельствует, что наименьшие значения алиментарной экспозиции характерны для БДЭ-99 (0,1–1,6 нг/кг МТ/сутки), наибольшие — для БДЭ-209 (от 1,1 до 9,7 нг/кг МТ/сутки). Уровни риска здоровью, рассчитанные на основании оценки диапазона экспозиции, могут рассматриваться как приемлемые.

Ключевые слова: полибромдифениловые эфиры, пищевые продукты, прогнозируемая алиментарная экспозиция, риски здоровью, диапазон экспозиции.

Введение. ПБДЭ являются одной из групп стойких органических загрязнителей. Эти вещества, относящиеся к антипаренам (антивоспламенителям), широко применяются при производстве мебели, пластика, электрооборудования в концентрациях от 5 до 30 %. ПБДЭ относятся к классу бромированных углеводородов с базовой структурой, состоящей из двух бензольных колец, соединенных атомом кислорода. Идентифицировано более 200 соединений – конгенеров ПБДЭ с различным количеством и положением атомов брома в двух ароматических кольцах. Указанные вещества смешиваются с материалами и не связаны химически с основной матрицей (текстилем или полимером), поэтому на разных этапах жизненного цикла продукции (производство, эксплуатация или утилизация) могут попадать в среду обитания; являются чрезвычайно стойкими липофильными соединениями, мигрируют по пищевым цепям и подвергаются биоаккумуляции [1]. Для данных веществ идентифицирован ряд токсичных свойств – основными

мишениями ПБДЭ рассматриваются печень, эндокринную, репродуктивную и нервную системы. Имеются данные, свидетельствующие о значительном спектре негативных последствий экспозиции ПБДЭ, включая диабет, ожирение, различные локализации рака, воздействие на иммунную и сердечно-сосудистую системы. Исследования не установили мутагенные эффекты, однако были выявлены вторичные повреждения ДНК за счет индукции реактивных форм кислорода, а также потенцирования действия иных генотоксичных соединений. По результатам биомониторинга установлено, что указанные соединения в основном депонируются в жировой ткани, обнаруживаются в печени, плазме и цельной крови, плаценте, особую озабоченность вызывает их наличие в женском грудном молоке. При этом отмечено, что имеющиеся токсикологические данные весьма разнородны, исследования зачастую проведены в отношении не чистых веществ, а коммерческих смесей, которые содержат ПБДЭ в различных соотношениях и могут быть загрязнены

побочными продуктами, например полихлорированными дибензодиоксинами и дибензофуранами, обладающими схожими токсичными свойствами. Кроме того, отдельные конгнегеры имеют различную токсикодинамику, биодоступность, степень биоаккумуляции в жировой ткани, а также период полувыведения, значительно превышающий таковой у лабораторных животных и составляющий от 926 до 4530 дней, что необходимо учитывать при проведении оценки рисков [1].

Указанные соединения могут поступать в организм человека ингаляционно и алиментарно, при этом водный путь не характерен, а пищевой является превалирующим [2].

Данные исследований, проведенных в иных регионах, показали, что с учетом токсичности, распространенности в различных группах пищевой продукции приоритетными при алиментарном пути поступления являются 2,2',4,4'-тетрабромдифениловый эфир (БДЭ-47), 2,2',4,4',5-пентабромдифениловый эфир (БДЭ-99) и 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-декабромдифениловый эфир (БДЭ-209). С учетом биогенной циркуляции антропогенных контаминаントов максимальные уровни загрязнения были выявлены в рыбе и продуктах ее переработки, что определяет указанную группу продукции в качестве ведущего источника поступления ПБДЭ в организм человека [1].

Стокгольмской конвенцией о стойких органических загрязнителях некоторые ПБДЭ отнесены к соединениям, в отношении которых приняты запреты производства, использования, а также импорта и экспорта. Данные, полученные в различных регионах, свидетельствуют о значительной частоте контаминации отдельных видов пищевой продукции, в первую очередь животного происхождения, при этом значения

существенно различаются и зависят от многих факторов [1]. Это обуславливает необходимость формирования предпосылок для снижения рисков здоровью, ассоциированных с ПБДЭ в отдельных факторах среды обитания, в том числе пищевых продуктах, с учетом особенностей национальной системы нормирования и обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Для этих целей был обоснован гигиенический норматив максимально допустимых уровней отдельных ПБДЭ в питьевой воде [2], а также в рыбе и рыбной продукции, изложенный в формате «не допускается, ниже предела количественного определения (ПКО)», установлены условия контроля – в случаях обоснованного предположения о возможном наличии обсуждаемых соединений в воде, рыбе и рыбной продукции, при ухудшении экологической ситуации, связанной с инцидентами природного и техногенного характера, приводящими к попаданию ПБДЭ в среду обитания, разработана методика их определения методом газожидкостной хроматографии [3].

Цель работы – провести оценку рисков здоровью населения, ассоциированных с контаминацией пищевой продукции приоритетными ПБДЭ с учетом актуальной структуры потребления.

Материалы и методы. Для обоснования моделей потребления нами использовались методические подходы, описанные в [4]. Структура потребления основных групп пищевых продуктов в Республике в 2 периода (2011–2013 и 2018–2023 гг.) была установлена на основании общедоступных данных обследований в домашних хозяйствах согласно данным Национального статистического комитета Республики Беларусь (таблица 1).

Таблица 1 – Потребление основных видов пищевых продуктов в Республике Беларусь на основе данных обследований в домашних хозяйствах в 2013 и 2023 гг.

Группа продукции	Потребление			
	2013 г.		2023 г.	
	кг/чел./год	г/чел./сутки	кг/чел./год	г/чел./сутки
Мясо и мясопродукты	91	249	84	230
Молоко и молокопродукты	260	712	289	792
Яйца и яйцепродукты*	304	0,83	236	0,65
Рыба и рыбопродукты	14,9	41	14	38
Сахар	42	115	27	74
Растительное масло	17,7	48	11	30
Картофель	179	490	56	153
Овощи, бахчевые	146	400	87	238
Фрукты, ягоды	69	189	71	195

Примечание: * В штуках; при расчетах алиментарной экспозиции вес 1 яйца принят за 45 г.

Также использовались данные изучения фактического питания взрослого населения на основании [5], полученные с применением [6] (91 респондент в 2011–2013 гг. и 583 респондента в 2018 г., проживающие в г. Минске, старше 18 лет). Статистическая обработка, проведенная с использованием критериев W-теста Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk W-test) и Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса

(Kolmogorov–Smirnov & Lilliefors test for normality) пакета STATISTICA 13.0, показала распределение данных в выборке, отличное от нормального при уровне значимости $p<0,05$.

Указанное обусловило использование для характеристики уровней потребления пищевой продукции медианы (Me), интерквартильного размаха (25%; 75%) и 95-го процентиля (95P) (таблица 2).

Таблица 2 – Фактическое потребление основных видов пищевых продуктов в Республике Беларусь среди взрослых (г/чел./сутки)

Группа продукции	2011–2013 гг.		2018 г.	
	Me [25P; 75P]	95P	Me [25P; 75P]	95P
Мясопродукты	142,9 [109,1; 230,4]	403,5	153,9 [79,7; 294,4]	692,1
Молочные продукты	280,0 [127,0; 560,4]	1137,0	181,5 [90,9; 353,4]	760,0
Яйца	10,5 [5,3; 16,8]	32,7	15,8 [5,3; 32,1]	134,4
Животные и растительные жиры	26,3 [13,0; 39,9]	68,8	17,5 [6,8; 31,7]	81,7
Рыбопродукты	14,0 [7,7; 23,4]	58,2	14,0 [5,0; 29,1]	102,7
Хлебопродукты	162,7 [96,4; 295,7]	500,9	140,0 [74,7; 266,0]	517,0
Картофель	98,3 [40,9; 166,5]	338,1	230,9 [118,2; 393,0]	935,7
Овощи	430,5 [241,7; 637,1]	1056,8		
Фрукты	124,7 [54,8; 255,0]	835,4	149,5 [62,3; 302,6]	847,4

В качестве значений содержания отдельных конгенеров приоритетных ПБДЭ (БДЭ-47, БДЭ-99, БДЭ-209) в различных группах пищевой продукции были использованы данные исследований указанных веществ в европейском регионе

в диапазоне нижней (НГ) и верхней (ВГ) границ концентраций, рассчитанные на основании обнаруженных уровней контаминации (таблица 3) и характера распределения данных, а также незначимых результатов (ниже ПКО) [1].

Таблица 3 – Уровни контаминации отдельными конгенерами ПБДЭ различных групп пищевой продукции (нг/г)

Группа продукции	Конгенер					
	БДЭ-47		БДЭ-99		БДЭ-209	
	НГ	ВГ	НГ	ВГ	НГ	ВГ
Яйца	0,08	0,116	0,271	0,280	0,329	0,386
Молоко и молочные продукты	0,01	0,026	0,009	0,024	0,021	0,111
Мясо и мясные продукты	0,009	0,032	0,008	0,031	0,035	0,092
Животные и растительные жиры	0,06	0,0158	0,063	0,161	0,175	1,318
Рыба и морепродукты	1,299	1,324	0,132	0,17	0,044	0,401
Продукты растительного происхождения	0,001	0,004	0	0,004	0,125	0,153

Указанное допущение принято в связи с отсутствием национальных данных о содержании

отдельных конгенеров ПБДЭ в пищевой продукции, что будет рассматриваться одним из

источников неопределенности при проведении оценки рисков.

С учетом вариабельности и различной степени агрегации, диапазона уровней и характера распределения данных о контаминации пищевых

продуктов ПБДЭ в соответствии с [4] были обоснованы модели алиментарной экспозиции, охватывающие максимально возможный диапазон потенциального поступления ПБДЭ с рационом (таблица 4).

Таблица 4 – Модели алиментарной экспозиции приоритетных ПБДЭ

Концентрация	Потребление отдельных видов пищевой продукции		
	Данные домашних хозяйств	Фактическое питание	
		Ме	95Р
НГ	модель 1	модель 3	модель 5
ВГ	модель 2	модель 4	модель 6
НГ*	модель 7	модель 9	модель 11
ВГ*	модель 8	модель 10	модель 12

Примечание: * Модели 7–12 эквиваленты моделям 1–6, но уровень контаминации для рыбы как для НГ, так и для ВГ заменен на ПКО метода определения отдельных конгенеров согласно [3], составляющие 0,25 мкг/кг для БДЭ-47 и БДЭ-99 и 2,5 мкг/кг для БДЭ-209 с учетом неопределенности измерений.

Модели 1–6 охватывают диапазон значений прогнозируемых рисков для здоровья населения, ассоциированных с различными уровнями потребления пищевой продукции и ее контаминации обсуждаемыми соединениями.

Модели 7–12 позволяют дополнительную оценить достаточность чувствительности используемого метода определения ПБДЭ. ПБДЭ характеризуются медленным выведением из организма и, следовательно, их биоаккумулирующие свойства при многократном воздействии необходимо учитывать при оценке рисков.

В связи с указанным на основании бенчмарк-доз ($BMDL_{10}$), с учетом анализа данных о степени абсорбции отдельных конгенеров ПБДЭ в организме, периодах их полувыведения, в качестве критериев при оценке рисков были использованы значения хронической алиментарной нагрузки (body burden), составившие 172, 4,2 и 1700 нг/кг МТ/сутки для БДЭ-47, БДЭ-99 и БДЭ-209 соответственно [1].

Алиментарная экспозиция (общее суточное поступление с рационом, относительное – в расчете на килограмм массы тела в сутки) и полукачественные риски здоровью на основе диапазона экспозиции (ДЭ) рассчитывались в соответствии с [4]. В качестве уровня приемлемости рисков для здоровья, связанных с алиментарным поступлением приоритетных ПБДЭ, в соответствии с европейскими и международными подходами принимали ДЭ, равный или превышающий 2,5 [1].

Результаты и их обсуждение. Рассчитаны значения поступления БДЭ-47, БДЭ-99 и БДЭ-209

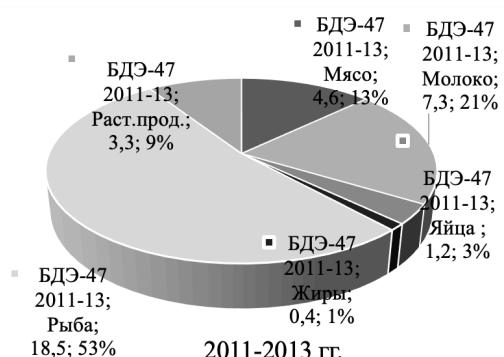
в составе рационов с учетом фактического их содержания для различных моделей алиментарной экспозиции, а также вклад отдельных видов пищевых продуктов для модели 4 (как наиболее реалистичной с незначительной агравацией) с учетом использования ВГ концентрации контаминанта.

Анализ полученных данных (таблица 5) показал, что наименьшие значения алиментарной экспозиции характерны для БДЭ-99 (0,1–1,6 нг/кг МТ/сутки), наибольшие – для БДЭ-209 (от 1,1 до 9,7 нг/кг МТ/сутки).

В целом для БДЭ-47 и БДЭ-99 в сравниваемые периоды (2011–2013 и 2018–2023 гг.) наблюдается тенденция к увеличению алиментарного поступления, а для БДЭ-209 – к снижению, обусловленная изменениями в структуре потребления. ДЭ был наибольшим для БДЭ-209 – $3,0 \times 10^5$ и более, самый низкий показатель был установлен в агравированных моделях 5 и 6, учитывающих 95Р потребления для БДЭ-99 (ДЭ – от 2,7), что вызывает наибольшее беспокойство. Оценка вклада отдельных групп пищевой продукции в 4-й модели экспозиции показала различный характер распределения отдельных конгенеров в рационе.

Так, вклад рыбы в оба изученных периода был превалирующим для БДЭ-47 (53–57 %). Растительные продукты вносили 6–9 %, жиры различного происхождения – около 1 %, остальная часть алиментарной нагрузки формировалась за счет продуктов животного происхождения – мяса, молока и продуктов их переработки, а также яиц (рисунок 1).

Иной характер распределения алиментарных источников был установлен для БДЭ-99. На долю продуктов животного происхождения (исключая рыбу) приходилось 58–65 % алиментарного поступления обсуждаемого конгенера, рыба формировалась около 10 % экспозиции. Вклад жиров и продуктов растительного происхождения составлял 14–18 % и 10–14 % соответственно



(рисунок 2). Растительные продукты были превалирующим источником БДЭ-209 в рационе, формируя 54–58 % алиментарной экспозиции. Суммарный вклад продуктов животного происхождения составлял 26–31 %.

Третьей по значимости группой являлись жиры, обусловливавшие около 15 % поступающей с пищей дозы (рисунок 3).

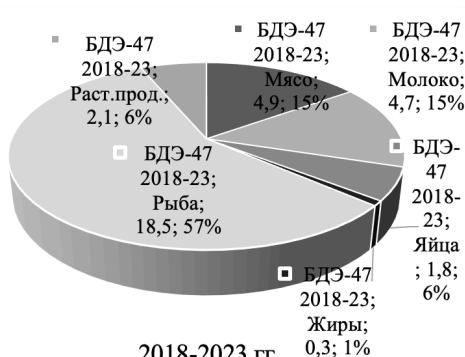


Рисунок 1 – Вклад (нг; %) отдельных пищевых продуктов в алиментарную экспозицию БДЭ-47

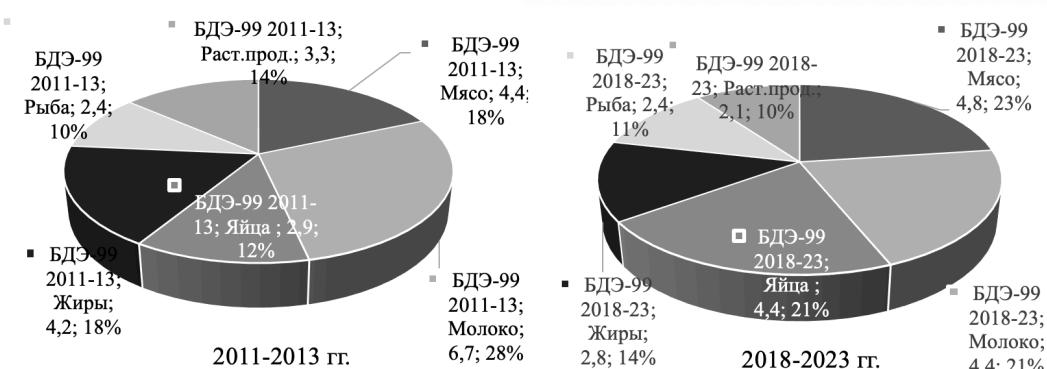


Рисунок 2 – Вклад (нг; %) отдельных пищевых продуктов в алиментарную экспозицию БДЭ-99

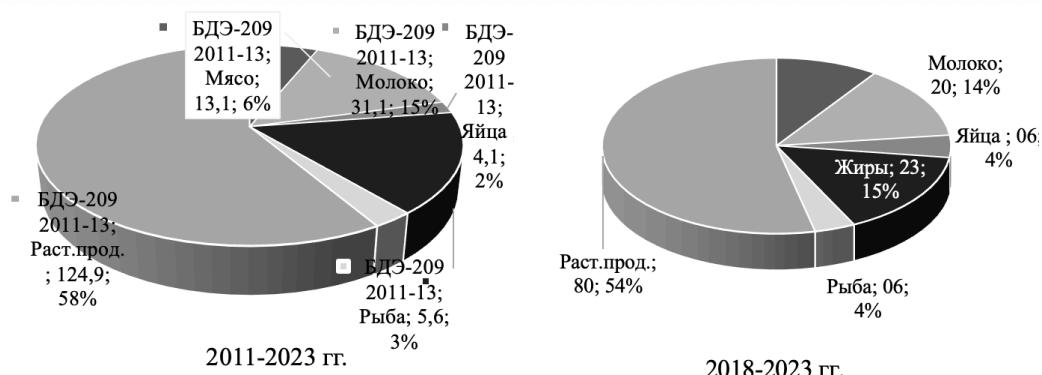


Рисунок 3 – Вклад (нг; %) отдельных пищевых продуктов в алиментарную экспозицию БДЭ-209

Таблица 5 – Алментарная экспозиция и значения ДЭ для отдельных контингентов ПБДЭ в различные периоды

Алментар- ная нагрузка	Период						Модель	
	2011–2013 гг.							
	1	2	3	4	5	6		
БДЭ-47								
Всего, нг/сутки	69,5	90,4	25,5	35,3	100,2	135,8	64,6	
Всего, нг/кг МТ/сутки	0,9	1,2	0,3	0,5	1,3	1,8	0,9	
ДЭ	186	143	506	366	129	95	200	
БДЭ-99								
Всего, нг/сутки	27,0	54,8	10,0	24,0	34,3	81,3	23,8	
Всего, нг/кг МТ/сутки	0,4	0,7	0,1	0,3	0,5	1,1	0,3	
ДЭ	11,7	5,7	31,5	13,1	9,2	3,9	13,2	
БДЭ-209								
Всего, нг/сутки	195,6	379,5	121,6	213,4	419,6	726,0	123,8	
Всего, нг/кг МТ/сутки	2,6	5,1	1,6	2,8	5,6	9,7	1,7	
ДЭ	$6,5 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	

Учитывая низкие концентрации отдельных ПБДЭ, регистрируемые, согласно литературным данным, в пищевых продуктах, важной прикладной задачей рассматривается моделирование алиментарного поступления с

учетом имеющейся чувствительности метода определения, что было реализовано путем расчета моделей экспозиции 7–12, основываясь на структуре потребления в 2011–2013 гг. (таблица 6).

Таблица 6 – Алиментарная экспозиция и значения ДЭ для отдельных конгенеров ПБДЭ (период 2011–2013 гг.) с учетом ПКО разработанного метода определения

Алиментарная нагрузка	Модель					
	7		7		7	
БДЭ-47						
Всего, нг/сутки	26,7	46,6	10,8	20,3	39,1	73,3
Всего, нг/кг МТ/сутки	0,4	0,6	0,1	0,3	0,5	1,0
ДЭ	484	277	1192	637	330	176
БДЭ-99						
Всего/сутки	31,8	58,1	11,7	25,1	41,2	86,0
Всего, нг/кг МТ/сутки	0,4	0,8	0,2	0,3	0,5	1,1
ДЭ	9,9	5,4	27,0	12,6	7,6	3,7
БДЭ-209						
Всего нг/сутки	3,9	6,2	2,1	3,2	7,5	11,3
Всего, нг/кг МТ/сутки	430 930	274 074	817 499	525 076	226 652	150 325
ДЭ	$4,3 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	$8,2 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$

Полученные значения алиментарной экспозиции подтвердили достаточную чувствительность метода определения БДЭ-47 в рыбе и рыбной продукции [3], поскольку ПКО значительно ниже по сравнению с выявленными уровнями контаминации согласно литературным данным [1]. Иной характер прогнозируемого поступления с рационом с учетом фактически зарегистрированных значений (таблица 3) закономерно был выявлен для БДЭ-99 и БДЭ-209 – рассчитанные показатели

имели тенденцию к повышению по сравнению с моделями, основанными на фактических данных контаминации. ДЭ для БДЭ-99 был наименьшим и составил 3,7–27. Учитывая, что для указанного конгнера и в реалистичных моделях, основанных на значениях, фактически определенных в пищевой продукции, также наблюдались наиболее низкие значения ДЭ (от 2,7), данный показатель был дополнительно рассчитан для периода 2018–2023 гг. (таблица 7)

Таблица 7 – Алиментарная экспозиция и значения ДЭ БДЭ-99 (период 2018–2023 гг.) с учетом ПКО разработанного метода определения

Алиментарная нагрузка	Модель					
	7	8	9	10	11	12
Всего/сутки	28,34	51,37	11,75	21,95	79,61	125,34
Всего, нг/кг МТ/сутки	0,38	0,68	0,16	0,29	1,06	1,67
ДЭ	11,1	6,1	26,8	14,4	4,0	2,5

Полученные значения свидетельствуют о сохранении негативной тенденции и озабоченности относительно рисков здоровью, ассоциированных с потенциальной контаминацией пищевой продукции БДЭ-99, поскольку в агравированной модели 12 значение ДЭ составляет 2,5, то есть равно критерию приемлемости рисков здоровью.

Допущения, принятые нами при проведении оценки рисков здоровью приоритетными ПБДЭ, формируют неопределенности, включающие использование значений контаминации пищевой продукции ПБДЭ на основании данных литературы, различную степень дифференцировки и группирования пищевых продуктов при оценке структуры потребления, ограниченную информацию о токсических свойствах конгенеров и, соответственно, использованных критериях оценки (хронической алиментарной нагрузки, body burden), отсутствие информации о концентрациях в пищевой продукции иных конгенеров ПБДЭ и учета их комбинированного действия. Учитывая описанные выше предпосылки, проведенную оценку можно рассматривать как консервативную, то есть «переоценивающую» риск здоровью.

Сравнение наших результатов с данными, полученными в иных регионах, показало, что в целом прогнозируемая алиментарная нагрузка отдельными ПБДЭ с учетом национальных особенностей потребления находится в сопоставимом диапазоне значений. Усредненные оценки, проведенные в Европе, показали, что средняя алиментарная экспозиция для БДЭ-47 варьирует от 0,29 до 1,91 нг/кг МТ/сутки, для БДЭ-99 достигает 0,18–0,35 нг/кг МТ/сутки, для БДЭ-209 находится в диапазоне 0,35–2,82 нг/кг МТ/сутки [7], а прогнозируемый национальный уровень составляет 0,3–1,2, 0,1–0,3 и 1,6–2,6 нг/кг МТ/сутки

соответственно (таблица 5). Как и в европейском регионе, согласно нашим данным БДЭ-99 является конгенером, вызывающим наибольшую обеспокоенность с точки зрения рисков для здоровья.

Заключение. Используемая методология оценки рисков является гибким и адаптируемым инструментом для оценки алиментарной химической нагрузки различными контаминалами химической природы, позволяет на основе фактических, прогнозируемых или нормируемых значений контаминации и национальной структуры потребления рассматривать модели, охватывающие различные варианты и диапазоны экспозиций, в том числе в агравированных условиях.

Проведенная оценка риска здоровью населения, ассоциированная с прогнозируемым алиментарным поступлением приоритетных полибромированных соединений свидетельствует, что наименьшие значения алиментарной экспозиции характерны для БДЭ-99 (0,1–1,6 нг/кг МТ/сутки), наибольшие – для БДЭ-209 (от 1,1 до 9,7 нг/кг МТ/сутки), а уровни риска здоровью могут рассматриваться как приемлемые, поскольку ДЭ по всем оцененным моделям составляет более 2,5. Приоритетным источником БДЭ-47 является рыбная продукция, БДЭ-99 – мясная, молочная продукция и яйца (суммарно), БДЭ-209 – продукты растительного происхождения.

Полученные данные об уровнях риска и их сопоставление с результатами исследований в иных странах свидетельствуют о необходимости адаптации аналитического метода для оценки содержания ПБДЭ в иных видах пищевой продукции животного происхождения, снижения его чувствительности и расширения спектра определяемых конгенеров ПБДЭ, проведения оценки рисков здоровью, связанных с комбинированным воздействием указанных контаминалов.

Список цитированных источников

1. Scientific Opinionon Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food [Electronic resource] / J. Alexander [et al.] // EFSAJ. – 2011. – Vol. 9, iss. 5. – Mode of access: <https://efsaj.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsaj.2011.2156>. – Date of access: 28.05.2024.
2. Дроздова, Е. В. Научное обоснование актуализации гигиенических нормативов безопасности питьевой воды / Е. В. Дроздова // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. трудов / редкол.: С. И. Сычик (гл. ред.), Г. Е. Косяченко (зам. гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2022. – Вып. 32. – С. 219–240.
3. Тимофеева, О. Н. Методика определения полибромдифениловых эфиров в рыбе и рыбной продукции методом газожидкостной хроматографии / О. Н. Тимофеева, И. С. Гринкевич, О. В. Шуляковская // Анализ риска здоровью. – 2016. – № 3. – С. 70–79.
4. Оценка алиментарной химической нагрузки на население : инструкция по применению : утв. Гл. гос. санитар. врачом Респ. Беларусь 15.12.2011, № 018-1211 / разраб.: Е. В. Федоренко, В. Г. Цыганков, Т. Г. Холупко. – Минск, 2011. – 14 с.

5. Уровни содержания нитратов, нитритов, нитрозаминов и полиароматических углеводородов в отдельных видах пищевой продукции : база данных : утв. Науч.-инж. респ. унитар. предприятием «Инт прикл. прогр. систем» 05.11.2019 г., № 1761919955 / Е. В. Федоренко [и др.]. – Минск, 2019.

6. Изучение фактического питания на основе метода частоты потребления пищевых продуктов : инструкция по применению : утв. Гл. гос. санитар. врачом Респ. Беларусь 15.12.2011, № 017-1211 / разраб.: Е. В. Федоренко [и др.]. – Минск, 2011. – 21 с.

7. Principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals [Electronic resource] / World Health Organization. – 1999. – Mode of access: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc210.htm>. – Date of access: 25.05.2024.

Assessing the health risks associated with the dietary intake of selected polybrominated compounds

Fedorenko E. V.

Republican Unitary Enterprise «Scientific Practical Centre of Hygiene, Minsk, Republic of Belarus

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are persistent organic pollutants. They are widely used as flame retardants in the manufacture of various products commodities. These lipophilic, bioaccumulative compounds affect the endocrine, reproductive and nervous systems. The PBDE congeners BDE-47, BDE-99 and BDE-209 are the most important for dietary intake. The main source of these chemicals is fish products. National hygiene regulations limit the presence of these compounds in fish above the analytical method limit of quantification. Studies show a high likelihood of food contamination with PBDEs. The predicted dietary exposure to BDE-47, BDE-99 and BDE-209 was estimated using national food consumption data for adults. The assessment of the health risk associated with the expected dietary intake of the priority PBDEs shows the lowest dietary exposure levels for BDE-99 (0.1 to 1.6 ng/kg bw per day) and the highest — for PBDE-209 (1.1 to 9.7 ng/kg bw per day). The health risk levels based on margin of exposure can be considered acceptable.

Keywords: polybrominated diphenyl ethers, food, predicted dietary exposure, health risks, margin of exposure.

Поступила 05.06.2024



ФАРМАЦИЯ

PHARMACY



УДК 546.26-17-046.64: 542.943-092.78

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ ВОДОРАСТВОРIMЫХ ФОРМ ФУЛЛЕРНОВ

Ермоленко Е. М., Ринейская О. Н., Улосевич Д. С.

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

Реферат. Работа посвящена сравнительной оценке антиокислительной способности ряда водорастворимых фуллеренов — $C_{60}(OH)_{24}$, C_{60} -Декстрин и C_{60} -Поливинилпирролидон — по отношению к аскорбиновой кислоте. Установлено, что исследуемые нами формы фуллеренов обладают антиоксидантной активностью, которая определялась при помощи спектрофотометрического метода ингибиции автоокисления адреналина в щелочной среде. $C_{60}(OH)_{24}$ проявлял более высокую антиоксидантную активность по сравнению с C_{60} -Декстрин и C_{60} -Поливинилпирролидон, а также аскорбиновой кислотой.

Ключевые слова: фуллерен, автоокисление адреналина в щелочной среде, аскорбиновая кислота, спектрофотометрия.

Введение. Фуллерены, открытые в 1985 году, представляют собой уникальный класс углеродных соединений, вызывающих значительный интерес в различных научных областях. Эти полые углеродные структуры могут принимать форму закрытых каркасов, известных как «бакиболы», или цилиндрических нанотрубок. Первый фуллерен, $60C$, был открыт Гарольдом В. Крото, Ричардом Е. Смолли и Робертом Ф. Кёрлом и назван бакминстерфуллереном, или бакиболом, из-за сходства с геодезическими куполами архитектора Р. Бакминстера Фуллера. Наиболее распространенной формойnanoструктур с углеродным каркасом, которые считаются трехмерными аналогами бензола и представляют собой аллотроп углерода, является бакминстерфуллерен с 60 атомами углерода (C_{60}), сложенным в сферическую структуру. Молекулы имеют вид усеченного икосаэдра, содержащего 12 пятиугольников и 20 шестиугольников, в которых каждый атом углерода, находясь в sp^2 -гибридизации, образует связь с тремя другими соседними атомами. Фуллерены обладают способностью отдавать и принимать электроны и легко присоединяют атомы водорода и галогенов, что дает возможность получения разнообразных производных с уникальными свойствами [1]. К специфическим параметрам фуллеренов можно также отнести мощную электронно-акцепторную активность, высокую поляризуемость молекулы, наличие большого числа эквивалентных

реакционных центров и гидрофобность, которая имеет отношение к способности фуллеренов проникать через биологические мембранны. Также было установлено, что сорбционная способность производных C_{60} намного превосходит активированный уголь [2]. Фуллерены обладают широким потенциалом в отношении медицинского применения. Уникальная углеродная структура и возможность модификации делают их привлекательными для исследований в области медицинской химии. Фуллерены обладают особыми фото-, электрохимическими и физическими свойствами, которые могут быть использованы в различных областях медицины. Большой интерес представляют водорастворимые формы модифицированных фуллеренов. Водорастворимые фуллерены могут быть получены путем введения (присоединения) различных гидрофильных групп и фрагментов карбоновых или аминокислот, что повышает их способность растворяться в воде. Большая площадь поверхности водорастворимых форм фуллеренов позволяет присоединить к сфероидной молекуле различные гидрофильные адденты, создавать поливалентные структуры, что представляет интерес для синтеза новых биопрепаратов и лекарственных средств [3]. Можно получить растворимые формы производных фуллеренов, вводя полярные заместители в молекулу, однако любой заместитель в фуллереновом ядре приводит к значительным изменениям в строении молекулы. Введение в него всего лишь одного

заместителя модифицирует свойства сразу двух атомов углерода: их гибридизация меняется из sp^2 -гибридного состояния в sp^3 . При этом исчезает равнозначность атомов углерода. Более того, введение нескольких заместителей приводит к образованию региоизомеров [4]. Также было показано, что присоединение к фуллеренам различных химических групп сопровождается разрывом их двойных связей, понижением электронно-акцепторных и антиоксидантных свойств фуллеренового каркаса в отношении перекисного окисления липидов [5]. Модифицированные формы фуллеренов исследуются также в качестве радикальных ловушек, антиоксидантов и носителей для доставки генов и лекарств. Фуллерены обладают высокой степенью стабильности и низкой токсичностью для организма человека. В них можно инкапсулировать различные молекулы с лечебным назначением (антибиотики, гормоны, витамины, а также металлы), а снаружи к углеродному каркасу легко присоединить органические молекулы. Все эти уникальные транспортные свойства позволяют использовать фуллерены для противоопухолевого лечения [6]. В последнее время исследования сосредоточены на разработке производных фуллеренов для применения в различных областях биологии и медицины, включая профилактику и лечение различных заболеваний. Ряд исследований фуллеренов указывает на тот факт, что водорастворимые фуллерены проявляют антиоксидантную активность, – способность нейтрализовать в организме свободные радикалы, которые образуются в процессе заболевания. Фуллерены подавляют окислительный стресс, вызванный перекисью водорода, и оказывают цитопротекторное действие на клетки [7]. Это позволяет фуллеренам оказывать положительное влияние на различные патологические состояния, связанные с окислительным стрессом, такие как нейродегенеративные расстройства, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания. Кроме того, фуллерены могут найти применение в косметологии для защиты кожи от воздействия свободных радикалов и замедления процессов старения. Хотя в водных растворах производные фуллеренов показывают АОА, их свойства и поведение *in vivo* в этом отношении дискуссионно. Зависимость антиоксидантного действия производных фуллеренов от их химической структуры до сих пор остается неясной. Считается, что производные с более высокой степенью функционализации обладают меньшей АОА из-за нарушения π -системы. Однако это обобщение не всегда верно: например, трисаддукты малоновой кислоты обладают более высокой АОА,

чем бисаддукты, содержащие цепи этиленгликоля. Известно также, что производные фуллеренов способны агрегировать в зависимости от их химической структуры, тем самым снижая их концентрацию и доступность, а также взаимодействовать с ферментами и другими биологическими молекулами в зависимости от структуры и заряда соединения.

Цель работы – исследование антиокислительной активности ряда растворимых фуллеренов: $C_{60}(OH)_{24}$, C_{60} -Декстрин, C_{60} -Поливинилпирролидон – в сравнении с аскорбиновой кислотой (стандарт).

Материалы и методы. Оценка антиокислительной активности проводилась при помощи спектрофотометрии, основанной на ингибировании автоокисления адреналина в щелочной среде при длинах волн 347 нм, 480 нм. Определялась скорость реакции окисления по изменению оптической плотности (ОП) накапливающегося промежуточного продукта автоокисления адреналина – аденохрома – при длине волны 480 нм и конечного продукта автоокисления адреналина – адренолютина – при длине волны 347 нм. АОА определяли по формуле $AOA = (D_{\lambda(\text{контроль})} - D_{\lambda(\text{опыт})}) / D_{\lambda(\text{контроль})} \times 100\%$. При проведении измерений были использованы следующие материалы: раствор эpineфрина гидратата, содержащий в 1 мл 1,82 мг вещества; 0,2 М бикарбонатного буферного раствора ($pH 10,68$); растворы фуллеренов $C_{60}(OH)_{24}$, C_{60} -Декстрин, C_{60} -Поливинилпирролидон в концентрации 1 мкМ (рисунок 1), полученные в НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ; 5%-ный раствор аскорбиновой кислоты. Измерения проводились с использованием спектрофотометра PV 1251C Solar.

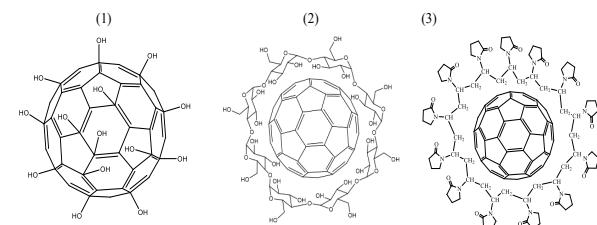


Рисунок 1 – Формулы водорастворимых фуллеренов
1 – $C_{60}(OH)_{24}$, 2 – C_{60} -Декстрин,
3 – C_{60} -Поливинилпирролидон

Результаты и их обсуждение. Хиноидное окисление адреналина в щелочной среде протекает по радикальному механизму через

одноэлектронное восстановление кислорода (рисунок 2) с образованием адреналин-семихинона (2) и адреналин-хинона (3) и последующей циклизацией через нуклеофильное присоединение атома азота к ароматическому кольцу, сопровождающееся восстановлением о-хиноидной группы [8]. Далее лейкоадреохром (4) подвергается дальнейшему окислению с образованием адренохром-семихинона (5) и адренохрома (6), которые могут быть изомеризованы до адренолютина (7, 8).

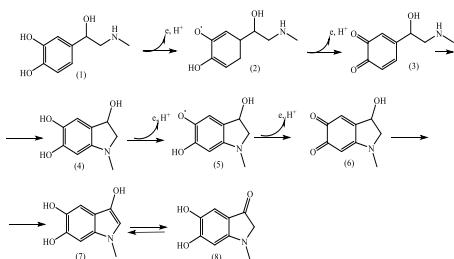


Рисунок 2 – Схема автоокисления адреналина
1 – адреналин, 2 – адреналин-семихинон, 3 – адреналинхинон, 4 – лейкоадреохром, 5 – адренохромсемихинон, 6 – адренохром, 7 – адренолютин (енольная форма), 8 – адренолютин (кетонная форма)

Об антиоксидантной активности судили по способности растворов фуллеренов и аскорбиновой кислоты ингибировать представленный выше процесс автоокисления адреналина, который проходит под действием образующихся активных форм кислорода. Данные исследования скорости образования промежуточного продукта – адренохрома – при самопроизвольном окислении адреналина без действия ингибиторов процесса при длине волны 480 нм указывают на то, что максимум (увеличение ОП на 22,6 %) развивается ко 2-й минуте; далее наблюдается плавное снижение в течение 10 минут уровня адренохрома, связанное, по-видимому, с дальнейшим превращением его в адренолютин (рисунок 3).

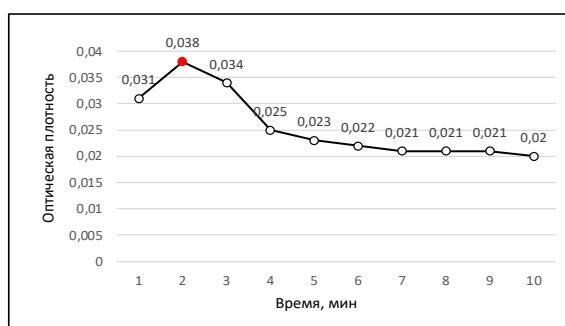


Рисунок 3 – Динамика изменения уровня адренохрома при автоокислении адреналина без ингибиторов (длина волны 480 нм)

Рисунок 4 демонстрирует изменение уровня адренохрома при окислении адреналина в присутствии гидроксилированного фуллерена. На протяжении периода наблюдения уровень адренохрома постепенно увеличивается и к 10й минуте составляет 111 % от начального.

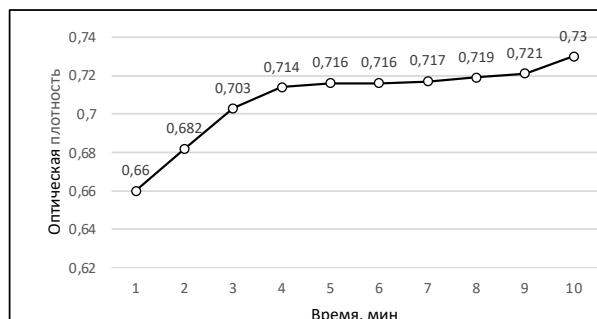


Рисунок 4 – Динамика изменения уровня адренохрома при автоокислении адреналина в присутствии $C_60(OH)_{24}$ (длина волны 480 нм)

Процесс автоокисления адреналина замедляется и при добавлении в реакционную среду фуллерена, стабилизированного декстрином (рисунок 5).

Уровень адренохрома достигает максимального значения к 3-й минуте (составляет 116 %) и затем плавно снижается.

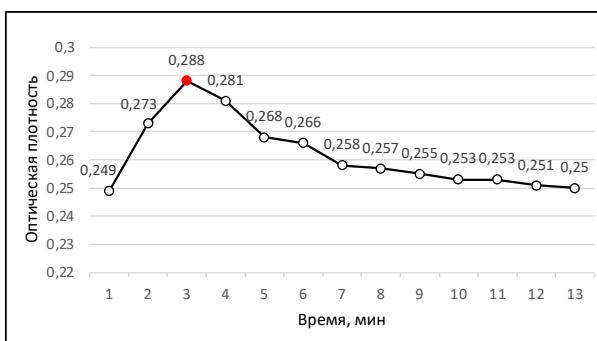


Рисунок 5 – Динамика изменения уровня адренохрома при автоокислении адреналина в присутствии C_60 -Декстрин (длина волны 480 нм)

Присутствие в реакционной среде C_60 -Поливинилпирролидона приводит к резкому увеличению уровня адренохрома в течение 2 минут на 27,5 % (рисунок 6).

При этом динамика процесса отражает дальнейший медленный рост уровня

промежуточного продукта окисления адреналина на протяжении 5 минут (составляет 182 % от начального).

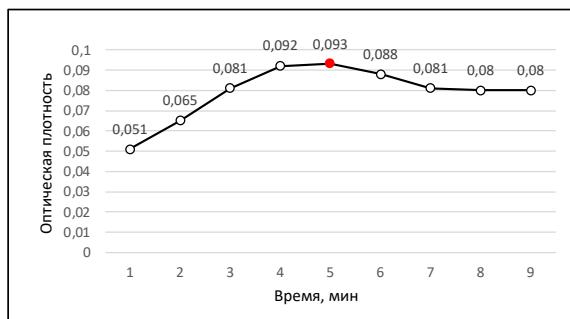


Рисунок 6 – Динамика изменения уровня адренохрома при автоокислении адреналина в присутствии C₆₀-Поливинилпирролидон (длина волны 480 нм)

В настоящем исследовании аскорбиновая кислота использовалась в качестве стандарта при оценке антиокислительной активности фуллеренов как потенциальных антиоксидантов. На рисунке 7 представлена динамика изменения уровня адренохрома при использовании аскорбиновой кислоты. Результаты исследования указывают на то, что аскорбиновая кислота тормозит процесс окисления в течение 3 минут, после чего обнаруживается увеличение уровня адренохрома на 25 %. Затем на протяжении следующих 3 минут изменений не наблюдалось, а к 8-й минуте, а также к 10-й — снова обнаруживался рост ОП.

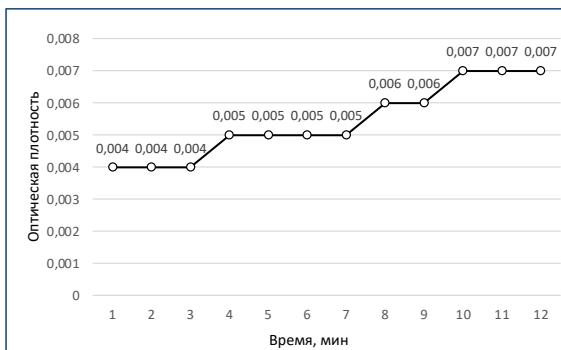


Рисунок 7 – Динамика изменения уровня адренохрома при автоокислении адреналина в присутствии аскорбиновой кислоты (длина волны 480 нм)

По результатам исследования уровня адренохрома как промежуточного продукта автоокисления адреналина следует отметить наличие антиоксидантных свойств у фуллеренов C₆₀(OH)₂₄ и C₆₀-Декстрин. Лимитирующей стадией процесса автоокисления адреналина является

одноэлектронное восстановление кислорода анионными формами фенольных гидроксильов адреналина. Появление максимума поглощения на длине волны 347 нм при автоокислении адреналина связано с образованием адренолютина. Нами была также изучена ингибирующая активность фуллеренов по уровню конечного продукта автоокисления адреналина — адренолютина. Оценка проводилась в течение 5 минут. Полученные результаты указывают на резкое нарастание — в 13,9 раз — раствора адреналина, измеренное при длине волны 347 нм, когда в отсутствие ингибиторов происходит его самопроизвольное окисление (таблица 1). Все исследованные вещества — C₆₀(OH)₂₄, C₆₀-Декстрин, C₆₀-Поливинилпирролидон и аскорбиновая кислота — оказывали ингибирующее действие на процесс автоокисления адреналина по уровню накопления адренолютина.

Таблица 1 – Результаты определения уровня конечного продукта автоокисления адреналина (адренолютина) при длине волны 347 нм

№	Вещество	ОП, 1 мин	ОП, 5 мин	Нараст ОП, %
1	C ₆₀ (OH) ₂₄	1,85	2,373	128
2	C ₆₀ -Декстрин	0,795	1,411	177
3	C ₆₀ -Поливинил пирролидон	0,346	0,92	266
4	Аскорбиновая к-та	0,178	0,447	251
5	Холостая проба	0,024	0,334	1392

При этом наименее выраженным был антиоксидантный эффект фуллерена C₆₀-Поливинилпирролидон, что, возможно, связано с экранированием фрагментами пирролидона и, следовательно, уменьшением доступности фуллерено-вого каркаса для супероксидных радикалов. Гидроксилированный фуллерен показал наиболее выраженные антиоксидантные свойства, так как в присутствии C₆₀(OH)₂₄ в течение периода наблюдения было обнаружено увеличение уровня адренолютина только на 28 %, что в 11 раз меньше, чем в холостой пробе (в отсутствие ингибиторов). Полученные данные позволили рассчитать АОА исследованных веществ: АОА_{C60(OH)24} = 77 %, АОА_{C60Декстрин} = 56,7 %, АОА_{аскорбиновая кислота} = 40 %. C₆₀-Поливинилпирролидон также обладает антиоксидантной активностью, но более низкой, равной 37,5 %.

Заключение. При исследовании уровней промежуточного и конечного продуктов автоокисления адреналина было установлено, что все изученные водорастворимые фуллерены — $C_{60}(OH)_{24}$, C_{60} -Декстрин, C_{60} -Поливинилпирролидон — обладают хорошей АOA (величина АOA более 10 % свидетельствует о наличии АOA). При этом $C_{60}(OH)_{24}$ проявляет более высокую АOA по сравнению с C_{60} -Декстрин и C_{60} -Поливинилпирролидон, а также аскорбиновой кислотой. Это может быть следствием способности супероксидных радикалов, образующихся при автоокислении адреналина, хорошо адсорбироваться и

концентрироваться в слое гидратной оболочки фуллерена, где высока вероятность взаимной рекомбинации свободных радикалов с последующим образованием нейтральных молекул. Исследование антиокислительных свойств фуллеренов является перспективным направлением нанобиологии и медицины, так как имеет потенциал в отношении разработки инновационных терапевтических и косметических средств.

Дальнейшее изучение механизмов действия фуллеренов и проведение клинических испытаний необходимы для реализации их терапевтического потенциала.

Список цитированных источников

1. Walton, D. R. M. Fullerenes / D. R. M. Walton, H. W. Kroto // Encyclopaedia Britannica. – 2024.
2. Перспективы применения фуллеренов в медицине / О. Н. Кукалия [и др.] // Трансляционная медицина. – 2023. – Т. 10, № 6.
3. Скворцов, Е. Г. Биологические эффектыnanoструктур углерода / Е. Г. Скворцов, Р. В. Романов, О. В. Стурлиц // Вестник Санкт-Петербургского Университета. – 2009. – № 1. – С. 114–120.
4. Water-Soluble Fullerene Monoderivatives for Biomedical Applications. / R. Biswas [et al.] // ChemMedChem. – 2023. – Vol. 18. – P. 20.
5. Антиоксидантная активность высокогидроксилированного фуллерена 60С и его взаимодействия с аналогом α-токоферола. Биология и медицина свободных радикалов. / Я. Гребовски [и др.] // Free Radic Biol Med. – 2020. – Vol. 160. – P. 734–744.
6. Wang, I. C. C_{60} and Water-Soluble Derivatives as Antioxidants Against Radical-Initiated Lipid Peroxidation / I. C. Wang, L. A. Tai, D. D. Lee // J. Med. Chem. – 1999. – Vol. 42. – P. 4614–4620.
7. Rania, B. Medicinal applications of fullerenes / B. Rania // Nanomedicine. – 2007. – Vol. 2(4). – P. 639–649.
8. Kinetics and Mechanism of Epinephrine Autoxidation in the Presence of Plant Superoxide Inhibitors: A New Look at the Methodology of Using a Model System in Biological and Chemical Research / V. Volkov [et al.] // Antioxidants. – 2023. – N 12. – P. 1530.

Study of antioxidant properties of water-soluble forms of fullerenes

Ermolenko E. M., Ryneiskaya O. N., Ulosevich D. S.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

A comparative assessment of the antioxidant capacity of a number of water-soluble fullerenes — $C_{60}(OH)_{24}$, C_{60} -Dextrin and C_{60} -Polyvinylpyrrolidone - in relation to ascorbic acid was carried out. It was established that the forms of fullerenes we studied have antioxidant activity, which was determined using the spectrophotometric method of inhibiting the autoxidation of adrenaline in an alkaline medium at pH 10.68. $C_{60}(OH)_{24}$ exhibited higher antioxidant activity compared to C_{60} -Dextrin and C_{60} -Polyvinylpyrrolidone, as well as ascorbic acid.

Keywords: fullerene, adrenaline autoxidation in an alkaline medium, ascorbic acid, spectrophotometry.

Поступила 05.06.2024

УДК 615.011.4

АНТИАГРЕГАНТЫ НА ОСНОВЕ ФТОРФЕНИЛЗАМЕЩЕННЫХ 2-ИЗОКСАЗОЛИН-5-КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Ковганко Н. Н., Пархач М. Е., Борисевич С. Н., Глинник С. В., Принькова Т. Ю.

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

Реферат. Изучена антиагрегантная активность синтезированных фторфенилзамещенных 2-изоксазолин-5-карбоновых кислот и их производных. Все соединения проявили способность к подавлению агрегационной способности тромбоцитов. Увеличение концентрации активного вещества с 5 до 10 мкмоль/л привело к возрастанию ингибирующей силы эффекторов. Метиловые эфиры в сравнении с производными со свободной карбоксильной группой проявили более сильную способность к подавлению перехода тромбоцитарных рецепторов GPⅡa/Ⅲb в активное состояние, в котором они способны связываться с фибриногеном и, соответственно, в дальнейшем подвергаться агрегации.

Ключевые слова: антиагреганты, гетероцикл, 2-изоксазолин, тромбоциты.

Введение. Тромбоциты играют важную роль в предотвращении кровопотери в ответ на травму, но они также ответственны за образование патогенных тромбов, вызывающих острые проявления сосудистых атеротромботических заболеваний, таких как острые коронарные синдромы, нестабильная стенокардия, инфаркт миокарда, ишемическая атака и симптоматическое заболевание периферических артерий [1]. Активация тромбоцитов имеет решающее значение для гемостаза и развития патологического тромбоза и может быть опосредована несколькими путями (агонисты: арахидоновая кислота, аденоzinификаф (АДФ), фактор активации тромбоцитов, тромбин, тромбоксан А2, коллаген и др.) [2].

В последние годы было показано, что тромбоциты участвуют не только в артериальном тромботическом процессе, но и играют активную роль в воспалительном процессе (растворимый лиганд CD40 (sCD40L), RANTES и растворимый Р-селектин (sP-селектин)) атерогенеза в начале и в прогрессировании заболевания [3]. Более того, после разрыва атероматозной бляшки происходит адгезия тромбоцитов к стенке сосуда, высвобождается содержимое гранул тромбоцитов с последующей их агрегацией и образованием тромбов [4]. Эта активация представляет собой динамический процесс, который может привести к периодическому или постоянному затруднению кровотока, что

вызывает ишемическое повреждение тканей и дисфункцию органов [5].

Ацетилсалциловая кислота была препаратом выбора для длительного лечения гиперактивности тромбоцитов, особенно для снижения риска серьезных ишемических событий при некоторых сердечно-сосудистых заболеваниях, включая инсульт, инфаркт миокарда, нестабильную стенокардию, и после операции аортокоронарного шунтирования. Однако использование данного лекарственного средства ограничено формированием устойчивости и рядом побочных эффектов, таких как желудочное кровотечение. Клопидогрел и тиклопидин также имеют значительные ограничения по механизму действия и эффективности. Таким образом, поиск более мощных и безопасных «неаспириновых» ингибиторов агрегации тромбоцитов является актуальной и практически значимой задачей. Многие соединения, полученные из природных источников различного происхождения, ранее были выделены, охарактеризованы и оценены как антиагреганты, например фенольные соединения, выделенные из формозских болотных растений, оксигенированные ксантоны, выделенные из зверобоя геминифлорума, дитерпены, выделенные из морских бурых водорослей, и алкалоиды разнообразного химического строения, проявляющие мощную антиагрегантную активность. Также были предприняты попытки синтезировать антиагреганты с высокой активностью, например замещенные

аналоги пиперазина, 1,4-дигидропиридины, связанные с 1,2-бензизотиазол-3-онами. Было установлено, что эти соединения в опыте *in vivo* на мышах ингибируют агрегацию тромбоцитов, индуцированную коллагеном в обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП), и, как следствие, защищают животных от экспериментального тромбоза. Ряд пирроло[3,2-с]пиридинов, изостеров антитромботического препарата тиклопидина, был синтезирован и оценен *in vitro* на способность ингибировать агрегацию ОТП человека, индуцированную АДФ. Ранее было описана антитромботическая активность соединений, содержащих изоксазольный фрагмент [6]. Антиагрегантная активность меченого производного изоксазола обусловлена антагонистическим механизмом гликопротеина IIb/IIIa. Производные изоксазола проявили высокую антиагрегантную активность в опытах *in vivo* на собаках. Соединения с изоксазольным фрагментом были синтезированы с использованием реакции Бейлиса–Хиллмана, оценена их антитромботическая активность *in vitro* и установлен механизм действия. Также описана антитромботическая эффективность изоксазолинов и изоксазолов как ингибиторов фактора Xa, который катализирует выработку тромбина из протромбина и находится на стыке внутреннего и внешнего путей каскада свертывания крови. Эти и другие данные продемонстрировали эффективность изоксазольного кольца в антиагрегантной активности.

Цель работы – изучить способность синтезированных фторфенилзамещенных 2-изоксазолин-5-карбоновых кислот и их производных ингибировать АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов.

Материалы и методы. ИК-спектры записаны в растворах на приборе Specord 75 IR. УФ-спектры растворов получены на приборе Specord M40. Спектры ЯМР растворов записаны на ЯМР-спектрометре Bruker Avance 400 (400 МГц). Химические сдвиги приведены в шкале δ , внутренний стандарт тетраметилсилан, растворитель CDCl_3 . Контроль за ходом реакций и индивидуальностью полученных соединений осуществлялся методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254.

Целевые соединения 1-6 получены по следующему методу: оксим (10 ммоль) в дихлорметане (20 мл) при 0 °C по каплям добавляли к смеси акриловой кислоты (или метилакрилата) (10 ммоль), 1,5 мл триэтиламина (11 ммоль) и 5%-ного водного раствора

гипохлорита натрия (20 мл). После перемешивания в течение 60 минут в ледяной воде смесь экстрагировали дихлорметаном (3–15 мл) и отделяли водный слой. Органические экстракты объединили, высушили над сульфатом натрия и растворитель отогнали при пониженном давлении. Полученное твердое вещество перекристаллизовывали из пропан-2-ола.

1. 3-(2-Фторфенил)-2-изоксазолин карбоновая кислота. Выход 83 %. $T_{\text{пл.}}$ 181–183 °C. ИК-спектр (KBr, cm^{-1}): 3100, 3093 ($\text{C}-\text{H}_{\text{аром.}}$), 1807, 1260 (COO), 1649 (C=N), 1600, 1508 ($\text{C}=\text{C}_{\text{аром.}}$). УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 277. ^1H NMR: δ 2,96 (2H, dd, $J=15,5$, 7,4 Hz), 5,31 (1H, dd, $J=7,9$, 6,8 Hz), 7,14–7,35 (2H, 7,20 (ddd, $J=8,3$, 1,1, 0,5 Hz), 7,28 (ddd, $J=7,9$, 7,3, 1,1 Hz)), 7,43–7,59 (2H, 7,49 (ddd, $J=7,9$, 1,5, 0,5 Hz), 7,52 (ddd, $J=8,3$, 7,3, 1,5 Hz)). ^{13}C NMR: δ 41,8 (1C, s), 81,2 (1C, s), 115,5 (1C, s), 126,7 (1C, s), 128,4 (1C, s), 129,3 (1C, s), 131,3 (1C, s), 155,5 (1C, s), 159,7 (1C, s), 175,2 (1C, s).

2. 3-(3-Фторфенил)-2-изоксазолин карбоновая кислота. Выход 85 %. $T_{\text{пл.}}$ 191–193 °C. ИК-спектр (KBr, cm^{-1}): 3095, 3085 ($\text{C}-\text{H}_{\text{аром.}}$), 1805, 1265 (COO), 1651 (C=N), 1605, 1510 ($\text{C}=\text{C}_{\text{аром.}}$). УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 275. ^1H NMR: δ 2,79 = 3,04 (2H, 2,87 (dd, $J=15,5$, 6,8 Hz), 2,96 (dd, $J=15,5$, 7,9 Hz)), 5,26 (1H, dd, $J=7,9$, 6,8 Hz), 7,04 = 7,27 (2H, 7,10 (ddd, $J=8,1$, 1,4, 1,2 Hz), 7,22 (ddd, $J=1,7$, 1,4, 0,5 Hz)), 7,45 (1H, ddd, $J=8,1$, 7,7, 0,5 Hz), 7,65 (1H, ddd, $J=7,7$, 1,7, 1,2 Hz). ^{13}C NMR: δ 41,8 (1C, s), 81,2 (1C, s), 115,0 = 115,1 (2C, 115,0 (s), 115,1 (s)), 127,3 (1C, s), 130,2 (1C, s), 132,1 (1C, s), 155,7 (1C, s), 161,2 (1C, s), 175,2 (1C, s).

3. 3-(4-Фторфенил)-2-изоксазолин карбоновая кислота. Выход 82 %. $T_{\text{пл.}}$ 217–219 °C. ИК-спектр (KBr, cm^{-1}): 3105, 3085 ($\text{C}-\text{H}_{\text{аром.}}$), 1800, 1255 (COO), 1645 (C=N), 1605, 1515 ($\text{C}=\text{C}_{\text{аром.}}$). УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 272. ^1H NMR: δ 2,94 (2H, dd, $J=15,5$, 7,4 Hz), 5,30 (1H, dd, $J=7,9$, 6,8 Hz), 7,04 (2H, ddd, $J=8,7$, 1,0, 0,6 Hz), 7,93 (2H, ddd, $J=8,7$, 1,6, 0,6 Hz). ^{13}C NMR: δ 41,8 (1C, s), 81,2 (1C, s), 115,4 (2C, s), 125,3 (1C, s), 128,6 (2C, s), 155,7 (1C, s), 162,5 (1C, s), 175,2 (1C, s).

4. Метиловый эфир 3-(2-фторфенил)-2-изоксазолинкарбоновой кислоты. Выход 87 %. $T_{\text{пл.}}$ 158–160 °C. ИК спектр (KBr, cm^{-1}): 3110, 3090 ($\text{C}-\text{H}_{\text{аром.}}$), 1798, 1271 (COO), 1653 (C=N), 1603, 1504 ($\text{C}=\text{C}_{\text{аром.}}$). УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 275. ^1H NMR: δ 2,97 (2H, dd, $J=15,5$, 7,4 Hz), 3,75 (3H, s), 5,29 (1H, dd, $J=7,9$, 6,8 Hz), 7,14–7,35 (2H, 7,20 (ddd, $J=8,3$, 1,1, 0,5 Hz), 7,28 (ddd, $J=7,9$, 7,3, 1,1 Hz)), 7,52 (1H, ddd, $J=8,3$, 7,3, 1,5 Hz), 7,72 (1H, ddd, $J=7,9$, 1,5, 0,5 Hz). ^{13}C NMR: δ 41,8 (1C, s), 52,2 (1C, s), 77,8 (1C, s), 115,5 (1C, s), 126,7 (1C,

s), 128,4 (1C, s), 129,3 (1C, s), 131,3 (1C, s), 155,5 (1C, s), 159,7 (1C, s), 170,2 (1C, s).

5. Метиловый эфир 3-(3-фторфенил)-2-изоксазолинкарбоновой кислоты. Выход 86 %. $T_{\text{пл.}}$ 165–167 °C. ИК-спектр (KBr, см⁻¹): 3107, 3096 (C—H_{аром.}), 1802, 1263 (COO), 1653 (C=N), 1607, 1509 (C=C_{аром.}). УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 273. ¹H NMR: δ 2,92 (2H, dd, J=15,5, 7,4 Hz), 3,75 (3H, s), 5,28 (1H, dd, J=7,9, 6,8 Hz), 7,04–7,27 (2H, 7,10 (ddd, J=8,1, 1,4, 1,2 Hz), 7,22 (ddd, J=1,7, 1,4, 0,5 Hz)), 7,45 (1H, ddd, J=8,1, 7,7, 0,5 Hz), 7,64 (1H, ddd, J=7,7, 1,7, 1,2 Hz). ¹³C NMR: δ 41,8 (1C, s), 52,2 (1C, s), 77,8 (1C, s), 115,0–115,1 (2C, 115,0 (s), 115,1 (s)), 127,3 (1C, s), 130,2 (1C, s), 132,1 (1C, s), 155,7 (1C, s), 161,2 (1C, s), 170,2 (1C, s).

6. Метиловый эфир 3-(4-фторфенил)-2-изоксазолинкарбоновой кислоты. Выход 84 %. $T_{\text{пл.}}$ 171–173 °C. ИК-спектр (KBr, см⁻¹): 3101, 3092 (C—H_{аром.}), 1806, 1263 (COO), 1651 (C=N), 1603, 1507 (C=C_{аром.}). УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 271. ¹H NMR: δ 2,94 (2H, dd, J=15,5, 7,4 Hz), 3,75 (3H, s), 5,27 (1H, dd, J=7,9, 6,8 Hz), 7,04 (2H, ddd, J=8,7, 1,0, 0,6 Hz), 7,93 (2H, ddd, J=8,7, 1,6, 0,6 Hz). ¹³C NMR: δ 41,8 (1C, s), 52,2 (1C, s), 77,8 (1C, s), 115,4 (2C, s), 125,3 (1C, s), 128,6 (2C, s), 155,7 (1C, s), 162,5 (1C, s), 170,2 (1C, s).

Исследование способности ингибировать агрегацию тромбоцитов осуществляли методом проточной цитометрии [7]. Для этого в 100 мкл плазмы, обогащенной тромбоцитами, вносили раствор АДФ (конечная концентрация 12 мкмоль/л) и соответствующее синтезированное вещество в 10 мкл ДМСО (конечная концентрация 5 и 10 мкмоль/л соответственно). В качестве образца для сравнения использовали плазму, в которую вносили 10 мкл ДМСО без эффектора. Активация тромбоцитов добавлением АДФ приводит к изменению конформации мембранных рецепторов GPIIa/IIIb, ответственных за дальнейшую агрегацию. Образцы ОТП с внесенными эффекторами выдерживали 15 минут при комнатной температуре, потом добавляли раствор меченых антител (CD 41a-FITC и CD61-PE). Дальнейший анализ поверхностных маркеров тромбоцитов GPIIa (CD41a) и GPIIIb (CD61) проводили с помощью проточного цитофлюориметра Perlong FC2060 (Perlong Medical Equipment, КНР). В качестве образца для контроля способности тромбоцитов к агрегации использовался метиловый эфир (+)-(S)-альфа-(o-хлорфенил)-6,7-дигидротиено[3.2-

с]пиридин-5(4Н)-уксусной кислоты (клопидогрел), используемый в настоящее время как антиагрегант (конечная концентрация 5 и 10 мкмоль/л соответственно).

Результаты и их обсуждение. Все изученные соединения проявили способность к подавлению агрегационной способности тромбоцитов (таблица 1). Увеличение концентрации вещества с 5 до 10 мкмоль/л привело к возрастанию ингибирующей силы эффекторов.

Таблица 1 – Ингибирование агрегационной способности тромбоцитов

Эффектор	Ингибирование агрегации в зависимости от концентрации вещества, %	
	5 мкмоль/л	10 мкмоль/л
1	25	31
2	27	33
3	21	29
4	37	43
5	39	46
6	31	38
Клопидогрел	67	77

Следует отметить, что метиловые эфиры в сравнении с веществами со свободной карбоксильной группой проявили более сильную способность к подавлению перехода тромбоцитарных рецепторов GPIIa/IIIb в активное состояние, в котором они далее способны связываться с фибриногеном и, соответственно, подвергаться агрегации. Сравнение с используемым в настоящее время антиагрегантом клопидогрелем указывает на необходимость дальнейшего поиска новых соединений, что может выразиться в модификации ароматического заместителя в структуре новых веществ.

Заключение. Установлено, что 3-арил-2-изоксазолин-5-карбоновые кислоты и их метиловые эфиры, содержащие один атом фтора в арильном фрагменте, проявляют способность к подавлению активации тромбоцитарных рецепторов GPIIa/IIIb.

Это открывает перспективы использования изученных соединений в качестве синтетических фрагментов при дизайне структуры и синтезе новых антиагрегантов.

**Список цитированных источников**

1. Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis / L. Jennings [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2009. – Vol. 102, N 3. – P. 248–257.
2. Platelet thrombin receptor antagonism and athethothrombosis / D. Angiolillo [et al.] // Eur. Heart J. – 2010. – Vol. 31, N 5. – P. 17–28.
3. Role of platelets as mediators that link inflammation and thrombosis in atherosclerosis / Q. E. Fuentes [et al.] // Platelets. – 2012. – Vol. 6, N 7. – P. 1–8.
4. Increased soluble and platelet-associated CD40 ligand in essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis / J. F. Viallard [et al.] // Blood. – 2002. – Vol. 99, N 5. – P. 2612–2614.
5. Mechanisms initiating platelet thrombus formation / Z. M. Ruggeri [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 1997. – Vol. 78, N 9. – P. 611–616.
6. Synthesis and antiplatelet effects of an isoxazole series of glycoprotein IIb/IIIa antagonist / C. B. Xue [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 1998. – Vol. 15, N 12. – P. 3499–3504.
7. Measurement of platelet aggregation, independently of patient platelet count: a flow-cytometric approach / P. J. Vinholt [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2017. – Vol. 15, N 6. – P. 1191–1202.

Antiaggregants based on fluorophenyl substituted 2-isoxazoline-5-carboxylic acids and their derivatives

Kauhanka M. M., Parkhach M. E., Borisevich S. N., Glinnik S. V., Prinkova T. Yu.
Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The antiplatelet activity of synthesized fluorophenyl-substituted 2-isoxazoline-5-carboxylic acids and their derivatives has been studied. All compounds have demonstrated the ability to suppress platelet aggregation. Increasing the concentration of the active substance from 5 to 10 $\mu\text{mol/l}$ increases the inhibitory strength of the effectors. Methyl esters compared to carboxylic acids demonstrated the stronger ability to suppress the transition of platelet receptors GPIIa/IIIb to an active state, in which they are then able to bind to fibrinogen and, accordingly, further undergo aggregation.

Keywords: antiplatelet agent, 2-isoxazoline, heterocycle, platelet.

Поступила 05.06.2024

УДК: 615.015.1:599.323.4

ВЛИЯНИЕ ДИПЕПТИДОВ PRO-GLY, PRO-LEU НА ДИНАМИКУ ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ И ЛОКОМОТОРНОЙ АКТИВНОСТИ В УСЛОВИЯХ ГРУППОВОЙ АКТОМЕТРИИ И МОДИФИКАЦИЯ ИХ ЭФФЕКТОВ ДИЗОЦИЛПИНОМ

Кравченко Е. В.¹, Ольгомец Л. М.¹, Саванец О. Н.¹, Бизунок Н. А.², Дубовик Б. В.²

¹ Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларусь», г. Минск, Республика Беларусь

² Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Изучено влияние дипептидов Pro-Gly, Pro-Leu на динамику ориентировочно-исследовательской (вертикальной; ВДА) и локомоторной (горизонтальной; ТДА) двигательной активности субмиссивных мышей ICR в условиях групповой актометрии, проведена оценка модификации их эффектов дизоцилпином (МК-801, неконкурентный антагонист N-метил-D-аспартатных рецепторов). Дипептид Pro-Leu (но не Pro-Gly) способствовал облегчению процесса габитуации ГДА в условиях групповой актометрии в первом (но не повторном) сеансе измерения локомоторной активности.

Существенного влияния на уровень тревожности (УТ) субмиссивных мышей ICR, оцениваемый по ВДА в первые 5 мин регистрации, у тестируемых дипептидов не выявлено.

Ключевые слова: Pro-Gly, Pro-Leu, дизоцилпин, мыши, актометрия.

Введение. Выявление связи когнитивной дисфункции и различных психических расстройств, в том числе тревожных, относится к числу приоритетных проблем в современной психиатрии и нейробиологии [1].

Различные тревожные состояния сопровождаются нарушениями мnestических и когнитивных функций (КФ) [2]. Когнитивные нарушения при тревожных расстройствах (ТР) делятся на три основные группы: 1) нарушения внимания и исполнительных функций; 2) расстройства памяти; 3) когнитивный и метакогнитивный дефицит и уязвимости [1]. Известно, что лекарственные средства (ЛС), эффективные при ТР, не оказывают значимого воздействия на когнитивный дефицит или даже усиливают его. Наиболее выраженным негативным влиянием на КФ обладают ЛС группыベンзодиазепинов, особенно — лоразепам и оксазепам, а также миансерин и оланzapин [1]. Актуальным является поиск новых эффективных соединений, улучшающих КФ и способствующих нормализации поведения в условиях стресса.

Окситоцин (ОТ) — Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂ — нейропептид, оказывающий регуляторное влияние на важнейшие

биологические функции мозга, включая процессы социального распознавания и социального взаимодействия [3, 4]. Модуляция окситоцином КФ, осуществляется посредством влияния на рабочую память и исполнительные функции [4].

По данным литературы, ОТ уменьшал УТ [5]. В экспериментах *in vitro* установлено снижение активности рецепторов глутамата N-метил-D-аспартатного (NMDA) типа под действием ОТ (S. Caruso [et al.], 1993). По ранее опубликованным нами данным, дипептиды Pro-Gly и Pro-Leu, структурно родственные фрагменту ОТ (Pro-Leu-Gly-NH₂), облегчали КФ в тесте габитуации и снижали УТ [6].

Учитывая интеграцию эмоциональности и когнитивных процессов, влияние дипептидов на КФ и УТ может быть взаимосвязанным.

Для выяснения возможных нейротрансмиттерных механизмов фармакологического действия целесообразно было проведение поведенческих экспериментов по оценке возможного взаимодействия дипептидов Pro-Gly, Pro-Leu с МК-801 (дизоцилпин, неконкурентный селективный антагонист N-метил-D-аспартатных (NMDA) рецепторов) в отношении КФ и УТ лабораторных грызунов.

Одной из форм неассоциативного обучения является габитуация (*habituation* – привыкание) [7]: многократное систематическое предъявление одного и того же стимула вызывает постепенное ослабевание реакции, которая со временем может исчезнуть совсем, то есть происходит привыкание к раздражителю. С целью оценки механизмов модуляции КФ дипептидами вводили Pro-Gly, Pro-Leu без дизоцилпина и совместно с указанным соединением, сопоставляя способность мышей к габитуации на фоне введения исследуемых образцов.

Известно, что NMDA-рецепторы вовлечены в регуляцию КФ и эмоциональной реактивности. Нарушения функционирования NMDA-рецепторов влечет за собой статистически достоверный когнитивный дефицит, сопровождающий такие заболевания, как шизофрения, депрессия, ишемические нарушения, хронические нейродегенеративные болезни. Примером повреждающего влияния дизоцилпина (0,01 и 0,1 мг/кг, внутрибрюшинно) на процессы памяти в эксперименте является дефицит КФ у мышей в teste object recognition. С учетом вышеизложенного, можно было бы ожидать нарушения процесса габитуации на фоне введения дизоцилпина. Вместе с тем, поскольку стресс резко нарушает КФ, в том числе неассоциативное обучение, повреждающий эффект дизоцилпина может компенсироваться его анксиолитическим влиянием. В связи с этим для всестороннего анализа влияния тестируемых образцов на различные виды поведенческой активности параллельно с габитуацией определяли УТ с использованием данных актометрии в одних и тех же сеансах.

Сведения об уровне ГДА и ВДА в первые 5 мин нахождения в незнакомой обстановке (наиболее «опасный» период) позволяет дать предварительную оценку влияния соединений на УТ. Исследовательская активность существенно тормозится тревожностью, поэтому регистрация подвижности животных представляет собой непрямой метод оценки УТ. Использование нами экспериментальных камер с большими размерами боксов без привычных элементов (подстилка, поилка, кормушка) является стрессогенным фактором, агравирующим эмоциональную реакцию на «новизну» у субмиссивных мышей ICR. В этих условиях возникает конфликт между стремлением исследовать незнакомую территорию и мотивацией избежать потенциальной опасности. Анксиолитики оказывают отчетливый противотревожный эффект у грызунов с пассивным типом реакции, выражаящийся в активации поведения в условиях стресса.

Вертикальные стойки рассматриваются в контексте оценки риска окружающей обстановки. Выявлена инвертированная U-образная зависимость между числом вертикальных стоек и интенсивностью потенциальной опасности: при высоком уровне потенциальной угрозы число вертикализаций снижено (и может быть повышенено путем применения анксиолитиков), тогда как при промежуточном уровне возможной опасности число вертикальных стоек возрастало и снижалось анксиолитиками; при низком уровне опасности в «открытом поле» анксиолитики снижали число вертикальных стоек (D. C. Blanchard, R. J. Blanchard, R. J. Rodgers, 1983). Анксиолитики повышали число вертикальных стоек в первые несколько минут тестирования, когда тревожность была наиболее высокой («стресс новизны»), а впоследствии, когда уровень тревожности становился умеренным, снижали указанный показатель (R. J. Rodgers, J. K. Shepherd, 1993).

Известно, что блокада NMDA-рецепторов способствует снижению нейрональной активности, оказывая влияние на высвобождение ГАМК иmonoаминов, которые, в свою очередь, вовлечены в регуляцию УТ. Дизоцилпин характеризовался анксиолитическим действием в экспериментах на крысах и мышах, индуцировал локомоторную гиперактивность в дозе 0,1 мг/кг (в/б), но не 0,01 мг/кг (в/б) и препятствовал анксиогенному влиянию длительного введения токсина ди-2-этилгексилфталата.

Цель работы – данного исследования явилось изучение влияния дипептидов Pro-Gly, Pro-Leu на габитуацию и УТ, определяемые по динамике ориентированно-исследовательской и локомоторной активности субмиссивных мышей ICR в условиях групповой актометрии, и оценка модификации их эффектов дизоцилпином.

Задачи: 1) изучить влияние дипептидов Pro-Leu и Pro-Gly на процессы внутри- и межсессионной габитуации (по данным динамики двигательной активности) и на УТ (оцениваемый по подвижности в первые 5 мин актометрии); 2) исследовать фармакологическую активность дизоцилпина в отношении неассоциативного обучения; 3) дать оценку поведенческим эффектам дипептидов при совместном введении с дизоцилпином.

Материалы и методы. В эксперименты включали 350 аутбредных мышей-самцов ICR, не относящихся к числу доминантов. Формировали 35 экспериментальных групп, число животных в каждой группе составляло 10 особей. В их числе: контроль-1 (К-1), интактный – 12 групп;

контроль-2 (К-2; «инъекционный» стресс: введение растворителя, здесь и ниже – дистиллированная вода (ДВ), в/б + введение растворителя, в/б) – 4 группы; основные группы 1–5: Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/б) + растворитель – 4 группы; Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/б) + дизоцилпин (0,05 мг/кг, в/б) – 4 группы; Pro-Leu (0,5 мг/кг, в/б) + растворитель – 3 группы; Pro-Leu (0,5 мг/кг, в/б) + дизоцилпин (0,05 мг/кг, в/б) – 4 группы; дизоцилпин (0,05 мг/кг, в/б) + растворитель – 4 группы. Исследуемые соединения вводили однократно в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела мыши. Pro-Gly вводили за 20–35 мин до высадки мышей в камеру актометра, а дизоцилпин – за 5–20 мин до начала опыта.

Горизонтальную (локомоторную) и вертикальную (исследовательско-ориентированную)

двигательную активность (ГДА и ВДА соответственно) измеряли дважды с интервалом 24 ч. Каждый сеанс продолжительностью 30 мин осуществляли с использованием многоканального актометра Activity Cages (Ugo Basile, Италия) в условиях размещения мышей группами по 10 грызунов в камерах размером 41 см × 44 × 32 см в условиях необогащенной среды. Сопоставляли подвижность в первые и последние 5 мин актометрии (внутрисессионная габитуация), а также в начальные 5 мин при первой и повторной высадках в боксы актометра (межсессионная габитуация).

Эксперименты проводили в условиях искусственного освещения в утренние и дневные часы (09:00–15:00 ч).

Схема исследования приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Формирование групп и схема проведения экспериментов

Группа / образец	Введение образцов (однократно, перед первой актометрией)	Сутки эксперимента/ процедура/число высадок	
		1	2
К-1 (интактный)	без введения	N=12; n=10	N=12; n=10
К-2 (растворитель)	ДВ+ДВ	N=4; n=10 (10+10+10+10)	N=4; n=10 (10+10+10+10)
Pro-Gly + растворитель	Pro-Gly (0,5 мг/кг) + ДВ	N=4; n=10 (10+10+10+10)	N=4; n=10 (10+10+10+10)
Pro-Gly + дизоцилпин	Pro-Gly (0,5 мг/кг) + дизоцилпин (0,05 мг/кг)	N=4; n=10 (10+10+10+10)	N=4; n=10 (10+10+10+10)
Дизоцилпин + растворитель	ДВ + дизоцилпин (0,05 мг/кг)	N=4; n=10 (10+10+10+10)	N=4; n=10 (10+10+10+10)
Pro-Leu + растворитель	Pro-Leu (0,5 мг/кг) + ДВ	N=3; n=10 (10+10+10)	N=3; n=10 (10+10+10)
Pro-Leu + дизоцилпин	Pro-Leu (0,5 мг/кг) + дизоцилпин (0,05 мг/кг)	N=4; n=10 (10+10+10+10)	N=4; n=10 (10+10+10+10)

Примечание. Растворитель (ДВ) и исследуемые соединения вводили в/б, однократно, перед первой актометрией; n — число животных; N — число высадок (например, N=4; n=10: оценено поведение 10+10+10+10 мышей).

Использовали субстанции дипептидов Pro-Leu (P1130-1G, серийный номер BCCB0437, purity ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, США), Pro-Gly (P0880-1G), серийный номер BCBV9787 и субстанцию дизоцилпин — MK-801 hydrogen maleate (M107-50MG), серийный номер 078K4606 производства Sigma-Aldrich, США.

Тестируемые соединения вводили животным основных групп 1–5 в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела; растворитель назначали

животным К-2 в том же объеме. Статистическую обработку цифровых показателей проводили с использованием программного обеспечения Biostat 4.03.

При определении уровня статистической значимости различий в вариационных рядах использовали критерий Краскела–Уоллиса для независимых выборок, Фридмана – для зависимых выборок, с последующей обработкой результатов методом апостериорных сравнений

по критериям Данна, Даннета и Ньюмена–Кейлса. Данные представляли в виде $X \pm S_x$.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования приведены в таблицах 2–4. При первой групповой высадке у особей интактного контроля (К-1) были отмечены хорошо выраженные процессы привыкания: в 5, 26–30-ю минуты наблюдения отмечено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение числа движений в горизонтальной плоскости по сравнению с первыми минутами актометрии (таблица 2).

В условиях слабого «инъекционного» стресса, вызванного процедурой в/б введения растворителя, у мышей из К-2 отмечены нарушения процесса угашения ИОР – статистически значимое снижение ГДА не было выявлено в 5-ю минуту наблюдения и проявлялось лишь на последних этапах регистрации (на 26–30-й минуте).

Статистически значимое внутрисессионное угашение ГДА в 30-ю минуту актометрии, более выраженное в сравнении с К-2, было отмечено в случае введения Pro-Leu. Отсутствие статистически достоверного снижения локомоции в последние минуты актометрии в сравнении с исходным уровнем на фоне дизоцилпина можно расценивать как нарушения процессов внутрисессионной габитуации при первой актометрии (таблица 2). Применение дизоцилпина совместно с Pro-Leu препятствовало развитию облегчающего эффекта дипептида: различия с исходным уровнем в 30-ю минуту наблюдения утрачивали статистическую достоверность.

Вместе с тем, назначение дизоцилпина совместно с Pro-Gly приводило к появлению статистически достоверной внутрисессионной габитуации, отсутствовавшей в случае применения указанного дипептида без блокатора NMDA-рецепторов (таблица 2). Полученные результаты являются убедительным подтверждением глутаматергических механизмов регуляции КФ у Pro-Leu и Pro-Gly.

В условиях повторной актометрии (без введения тестируемых образцов), как и ожидалось, статистически значимый эффект отмечался лишь в группе интактного контроля. При повторном помещении в те же самые экспериментальные условия статистически значимая внутрисессионная габитуация в группе К-1 началась раньше в сравнении с предшествующей высадкой (не в 5-ю, а в 4-ю минуту опыта), что указывало на хорошо выраженные мnestические процессы в первом сеансе актометрии.

«Инъекционный» стресс накануне первого тестирования препятствовал формированию следа памяти в группе К-2, что выразилось в отсутствии статистически значимой габитуации при повторном тестировании.

Как и предполагалось, в отсутствие введения образцов особям групп 1–5 поведение мышей основных групп существенно не отличалось от К-2. Эти данные показали, что: а) межгрупповые различия в первом сеансе актометрии были связаны именно с назначением тестируемых образцов; б) отмечалось отсутствие «отложенного» (позитивного либо негативного) эффекта дипептидов на поведение грызунов по истечении суток с момента введения.

Межсессионная габитуация ГДА и ВДА за первые минуты актометрии в целом не претерпела существенных изменений под влиянием дипептидов, дизоцилпина и их комбинации (таблица 4).

Данные, представленные в таблице 4, показали статистически значимое снижение ГДА в исходные 5 минут первого сеанса актометрии у стрессированных особей (К-2), а также у мышей, получавших дизоцилпин с растворителем, относительно интактного контроля.

Таким образом, «инъекционный» стресс вызвал снижение подвижности в К-2, а дизоцилпин в использованной нами дозе не обладал анксиолитическим эффектом, не препятствовал стресс-индуцированному снижению локомоции.

В случае введения дипептидов статистически значимые различия с интактным контролем отсутствовали: тестируемые соединения (предположительно, вследствие стресс-протекторного эффекта) способствовали более выраженной локомоции в «опасный» период ознакомления с боксом, и этот их эффект (в отличие от габитуации) не ослаблялся и не потенцировался дизоцилпином (таблица 4).

На фоне «инъекционного» стресса в группе К-2 в первом сеансе актометрии отмечалось более чем двукратное статистически значимое снижение уровня ВДА в сравнении с группой интактного контроля.

Аналогичное статистически достоверное уменьшение исследовательско-ориентированной реакции отмечалось и в остальных группах сравнения, что указывало на отсутствие существенного анксиолитического влияния образцов в отношении «оценки риска» субмиссивными мышами ICR в условиях групповой актометрии.

Таблица 2 – Влияние дипептидов Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/б) и Pro-Leu (0,5 мг/кг, в/б) на динамику локомоторной активности у мышей ICR в условиях групповой актометрии продолжительностью 30 мин, и модификация их эффектов дизодциллином (0,05 мг/кг, в/б) на этапе первого тестирования («обучения»)

Группа	ГДА, усл. ед. / Время					
	1-я минута	2-я минута	3-я минута	4-я минута	5-я минута	5 минут суммарно
1	2	3	4	5	6	7
K-1 (интактный, N=12; n=10)	390,6±19,6	322,7±13,0	315,3±9,7	285,0±15,5	275,4±20,2 ^{1,5}	1589,0±60,4
K-2 (P+P; N=4; n=10)	271,5±30,8	257,8±27,9	201,8±12,1	225,2±26,6	185,0±19,3	1141,0±103,1 ⁶
Pro-Gly + P (N=4; n=10)	230,0±42,0	192,8±27,9	248,5±39,6	216,3±37,2	220,0±35,5	1107,5±160,6
Pro-Gly + Δ (N=4; n=10)	345,8±22,3	318,2±45,9	291,3±32,0	281,3±36,1	223,8±44,6	1460,3±174,8
Δ + P (N=4; n=10)	297,8±33,1	227,2±11,8	235,5±19,3	245,5±11,4	204,8±22,0	1210,8±56,1 ⁶
Pro-Leu + P (N=3; n=10)	301,3±53,9	278,3±66,7	250,3±46,8	244,3±17,1	239,0±13,3	1313,3±171,4
Pro-Leu + Δ (N=4; n=10)	316,3±31,0	286,8±28,2	256,5±19,7	224,3±10,2	229,8±15,1	1313,5±34,0
	26-я минута	27-я минута	28-я минута	29-я минута	30-я минута	26–30-я минута суммарно
K-1 (интактный, N=12; n=10)	190,2±18,3 ¹⁻⁵	187,3±18,5 ¹⁻⁵	202,3±10,9 ¹⁻⁵	195,5±13,7 ¹⁻⁵	194,2±12,4 ¹⁻⁵	969,6±58,1
K-2 (P+P; N=4; n=10)	77,8±10,2 ⁵	96,3±28,6 ⁵	104,5±48,2 ⁵	103,0±40,4 ⁵	88,8±27,6 ⁵	470,3±150,2 ⁶
Pro-Gly + P (N=4; n=10)	134,5±29,0	143,8±13,8	121,0±18,0 ⁵	137,8±19,7	165,5±17,8	702,5±73,1
Pro-Gly + Δ (N=4; n=10)	168,3±33,1	158,0±48,8 ^{1,5}	154,3±38,8 ^{1,5}	162,5±27,1 ^{1,5}	128,0±33,0 ^{1,2,5}	771,0±170,7
Δ + P (N=4; n=10)	108,8±12,7 ⁵	93,8±19,9 ^{1,5}	108,3±40,6 ⁵	117,5±39,5	121,0±39,1	549,3±155,7
Pro-Leu + P (N=3; n=10)	95,0±6,1	67,3±13,6	100,3±17,7	50,3±16,8 ⁵	47,3±4,7 ⁵	360,3±33,2 ⁶
Pro-Leu + Δ (N=4; n=10)	163,5±19,6 ⁵	149,8±7,7 ^{1,5}	145,0±15,8 ^{1,5}	142,3±12,6 ^{1,5}	164,0±23,6	764,5±29,5

Примечание. ¹ — различия с уровнем в 1-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$, критерий Фридмана с апостериорным анализом по критерию Ньюмена–Кейлса, ² — то же, различия с уровнем во 2-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$; ³ — то же, различия с уровнем в 3-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$; ⁴ — то же, различия с уровнем в 4-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$; ⁵ — различия с уровнем в 1-ю минуту статистически значимы, $p < 0,05$, критерий Фридмана с апостериорным анализом по критерию Деннета; ⁶ — различия с уровнем в интактном контроле статистически значимы, $p < 0,05$, критерий Краскела–Уоллеса с апостериорным анализом по критерию Данна; Р — растворитель; Δ — дизодциллин.

Таблица 3 — Влияние дипептидов Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/б) и Pro-Leu (0,5 мг/кг, в/б) на динамику локомоторной активности у мышей ICR в условиях групповой актометрии продолжительностью 30 мин и модификация их эффектов дизодциллином (0,05 мг/кг, в/б) на этапе повторного тестирования («воспроизведение»)

Группа	ГДА, усл. ед. / Время						
	1-я минута	2-я минута	3-я минута	4-я минута	5-я минута	6	1-5-я минута суммарно
1	2	3	4	5	6	7	
K-1 (ингактный, N=12; n=10)	311,3±16,2	277,6±11,6	255,9±9,6	217,8±13,4, ⁵	214,1±16,1, ⁵	1276,7±45,9	
K-2 (P+P; N=4; n=10)	176,8±29,0	186,0±28,9	207,3±17,4	214,3±22,8	216,8±18,1	1001,0±53,3	
Pro-Gly + P (N=4; n=10)	208,5±24,7	183,5±27,0	188,2±13,9	195,0±7,7	165,5±19,1	940,8±66,9	
Pro-Gly + Д (N=4; n=10)	235,8±48,0	256,8±39,7	214,8±37,7	220,8±21,5	257,0±33,8	1185,0±167,2	
Д + P (N=4; n=10)	202,0±21,4	215,2±31,4	192,8±19,0	202,5±29,5	156,8±41,3	969,3±127,9	
Pro-Leu + P (N=3; n=10)	187,3±45,9	192,3±83,5	202,3±37,4	223,7±39,0	228,3±70,6	1034,0±252,1	
Pro-Leu + Д (N=4; n=10)	200,3±22,5	168,8±28,9	209,5±31,7	176,5±31,7	174,8±17,3	929,8±97,5 ⁶	
	26-я минута	27-я минута	28-я минута	29-я минута	30-я минута	26-30-я минута суммарно	
K-1 (ингактный, N=12; n=10)	168,2±10,4 ^{1-3,5}	159,8±13,8 ^{1-3,5}	174,6±13,0 ^{1-3,5}	175,2±14,5 ^{1-3,5}	178,7±13,6 ^{1-3,5}	856,3±45,9	
K-2 (P+P; N=4; n=10)	203,5±23,0	137,5±35,3	143,0±31,3	154,0±46,9	174,5±24,9	812,5±116,4	
Pro-Gly + P (N=4; n=10)	161,5±25,2	155,8±24,7	165,3±24,8	138,0±10,9	170,0±8,8	790,5±69,0	
Pro-Gly + Д (N=4; n=10)	118,0±28,4	137,8±19,8	140,0±16,1	118,8±7,5	108,5±20,0	623,0±71,9	
Д + P (N=4; n=10)	154,8±6,0	152,8±13,4	145,0±29,2	134,3±33,0	104,5±32,9	691,3±97,0	
Pro-Leu + P (N=3; n=10)	195,0±22,6	193,7±25,6	161,7±34,9	119,0±7,8	103,7±15,6	773,0±27,6	
Pro-Leu + Д (N=4; n=10)	142,5±25,3	164,8±23,7	187,2±23,4	166,5±18,2	143,8±19,7	804,8±81,9	

Примечание. ¹ — различия с уровнем в 1-ю минуту статистически значимы, p<0,05, критерий Фридмана с апостериорным анализом по критерию Ньюмена–Кейнса; ² то же; различия с уровнем во 2-ю минуту статистически значимы, p<0,05; ³ то же; различия с уровнем в 3-ю минуту статистически значимы, p<0,05; ⁴ то же; различия с уровнем в 4-ю минуту статистически значимы, p<0,05; ⁵ — различия с уровнем в 1-ю минуту статистически значимы, p<0,05, критерий Фридмана с апостериорным анализом по критерию Даннега; ⁶ — различия с уровнем в интактном контроле статистически значимы, p<0,05, критерий Краскела–Уолисса с апостериорным анализом по критерию Данна; Р — растворитель; Д — дизодциллин.

Таблица 4 – Влияние дипептидов Pro-Gly (0,5 мг/кг, в/б) и Pro-Leu (0,5 мг/кг, в/б) на динамику локомоторной и исследовательско-ориентированной активности у мышей ICR в условиях первой и повторной групповой актометрии и модификация их эффектов дизодиллином (0,05 мг/кг, в/б)

Группа / образец	ГДА, усл. ед.		ГДА	ВДА, усл. ед.	
	1-е сутки	2-е сутки		1-е сутки	2-е сутки
с 1-й по 5-ю минуту актометрии суммарно	с 1-й по 5-ю минуту актометрии суммарно	с 1-й по 5-ю минуту актометрии суммарно	во 2-е сутки (относитель-но 1-х суток), %	с 1-й по 5-ю минуту актометрии суммарно	с 1-й по 5-ю минуту актометрии суммарно
K-1 (интактный) к уровню K-2, %	1589,0±60,4 139,3	1276,7±45,9	80,3	574,8±36,3 211,3	371,1±22,7
K-2 (растворитель)	1141,0±103,1 ¹ 100,0	1001,0±53,3	87,7	272,0±53,1 ¹ 100,0	270,0±48,5
Pro-Gly + растворитель к уровню K-2, %	1107,5±160,6 97,1	940,8±66,9	84,9	253,8±65,5 ¹ 93,3	270,0±58,2
Pro-Gly + дизодиллин к уровню K-2, %	1460,3±174,8 128,0	1185,0±167,2	81,1	268,5±11,7 ¹ 98,7	311,5±24,1
Дизодиллин + растворитель к уровню K-2, %	1210,8±56,1 ¹ 106,4	969,3±127,9	80,1	273,0±36,8 ¹ 100,4	296,8±26,5
Pro-Leu + растворитель к уровню K-2, %	1313,3±171,4 115,1	1034,0±252,1	78,7	252,0±54,5 ¹ 92,6	234,0±61,3
Pro-Leu + дизодиллин к уровню K-2, %	1313,5±34,0 115,1	929,8±97,5 ¹	70,8	274,5±35,4 ¹ 100,9	289,3±71,2

Примечание. ¹ различия с уровнем в интактном контроле статистически значимы, p<0,05, критерий Краскела–Уолисса с апостериорным анализом по критерию Данна.

Как и следовало ожидать, высокий УТ по критерию ВДА в группе К-2, основных группах 1–5 сопровождался нарушениями КФ. Так, межсессионная габитуация ВДА была хорошо выражена в группе К-1 (ВДА за первые 5 мин регистрации при повторной актометрии составила 64,6 % от исходного уровня); в остальных группах сравнения указанные показатель не опускался ниже 92,9 % (таблица 4).

Известно, что в образовании β -поворота пептидной цепи участвуют остатки пролина; при этом создаются участки складчатых β -структур в белках, в которых сосредоточены активные центры (Назарова Г.А., 2008). К числу часто встречающихся пролинсодержащих дипептидных фрагментов принадлежит –Pro–Leu–, который является частью ОТ, меланотропинингибирующего фактора 1, урокортина, адренокортикотропного гормона, орексина А, α -, β -, γ -эндорфинов. Все вышеперечисленные пептиды обладают мнемотропным действием (Wagner U., Echterhoff G., 2018; Khan R. S. [et al.], 2010; Pan W., Kastin A. J., 2007; Scantlebury M.H. [et al.], 2017; Abounoori M. [et al.], 2021; Netto C. A., 2022). Тот факт, что мощный селективный антагонист рецепторов ОТ L-368,899 с $IC_{50}=8,9$ нМ (King Sh. K. M. V. [et al.], 2019) статистически значимо нарушил процессы долговременной памяти мышей, а Pro-Leu устранил комплексные длительно сохраняющиеся нарушения мнемотропных функций, спровоцированные L-368,899 (Кравченко Е. В. и соавторы, 2023), указывает на наличие у Pro-Leu окситоцинергических механизмов действия и позволяет рассматривать Pro-Leu в качестве дипептида — миметика ОТ. ОТ связывается с окситоциновым рецептором (ОР), который обладает уникальной способностью инициировать различные сигнальные пути, передавая сигнал от рецепторов к представителям многочисленного семейства G-белков. Представленные нами материалы посвящены изучению поведенческих эффектов пролинсодержащих дипептидов при совместном введении с дизоцилпином. Известно, что NMDA-рецепторы участвуют в стимуляции высвобождения ОТ *in vivo*; одномоментное применение агонистов глутаматных рецепторов AMPA (α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты) и агонистов глутаматных NMDA-рецепторов стимулировало повышение уровня ОТ в плазме крови, и это повышение впоследствии блокировалось введением антагонистов AMPA- либо NMDA-рецепторов (CNQX и 3-[2-карбоксиперазин-4-ил]пропил-1-фосфоновая кислота соответственно) (Leithead A. B. и другие, 2021). В экспериментах *in vivo* ОТ и агонист ОР

карбетоцин (в отличие от антагониста ОР L-368,899) устраняли негативное влияние дизоцилпина на зоосоциальное поведение. Нами получены результаты, сходные с цитированными выше. В первые сутки эксперимента при введении дизоцилпина было отмечено статистически значимое снижение ГДА относительно уровня интактного контроля, а на фоне введения дизоцилпина совместно с Pro-Leu указанные нарушения отсутствовали (таблица 4), следовательно, Pro-Leu (предполагаемый дипептид — миметик ОТ), как ОТ и агонист ОР карбетоцин (Zimmermann F. F. и другие 2016), противодействовал дезорганизации поведения, вызванной дизоцилпином. В свою очередь, дизоцилпин в первые сутки исследований препятствовал развитию облегчающего эффекта дипептида на габитуацию: на фоне Pro-Leu различия ГДА с уровнем соответствующего показателя в интактном контроле в 30-ю минуту наблюдения были статистически значимы, но при совместном применении дипептида с дизоцилпином снижение ГДА относительно интактного контроля утрачивало статистическую достоверность (таблица 2). Учитывая, что дизоцилпин применяется для моделирования психопатологии, связанной с аутизмом и шизофренией (Leithead A. B., 2021), полученные данные позволяют определить возможные «мишени» фармакологического действия Pro-Leu. Результаты наших исследований указывают на взаимодействие Pro-Gly с глутаматными NMDA-рецепторами на поведенческом уровне. Механизмы действия Pro-Gly, по-видимому, не дублируют таковые у Pro-Leu. По данным научной литературы, изучение первичных взаимодействий структурно родственного фармакологического вещества «ноопепт», который является производным Pro-Gly (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) более чем со 100 известными рецепторными образованиями, выполненное согласно протоколу компанией CEREP (Франция), не привело к ожидаемому выявлению первичных мишней (Вахитова Ю. В. и другие, 2016). Неизвестно, было ли изучено CEREP взаимодействие ноопепта с глициновыми рецепторами; соответствующие данные для Pro-Gly не выявлены нами в доступной научной медицинской литературе.

Заключение. Дипептид Pro-Leu (но не Pro-Gly) способствовал усилению габитуации ГДА в условиях групповой актометрии в первом (но не повторном) сеансе измерения локомоторной двигательной активности. Существенного влияния на уровень тревожности, оцениваемый по ВДА в первые 5 минут регистрации, у тестируемых дипептидов не выявлено.

Список цитированных источников

1. Особенности когнитивных процессов у больных с различной структурой тревожных расстройств / А.А. Чепелюк [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. – 2018. – № 3. – С. 4–9.
2. Отдаленные последствия длительного неконтролируемого употребления анксиолитических и снотворных препаратов в пожилом возрасте: когнитивные расстройства / Н. Н. Иванец [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2015. – Т. 115, № 12. – С. 50–64.
3. Effects of oxytocin on fear memory and neuroinflammation in a rodent model of posttraumatic stress disorder / S.-Ch. Wang [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – V. 19, N 12. – P. 3848–3863.
4. Ophir, A. G. Navigating monogamy: nonapeptide sensitivity in a memory neural circuit may shape social behavior and mating decisions / A. G. Ophir // Front. Neurosci. – 2017. – Vol. 11. – a397.
5. Local oxytocin tempers anxiety by activating GABA_A receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus / A. S. Smith [et al.] // Psychoneuroendocrinology. – 2016. – Vol. 63. – P. 50–58.
6. Кравченко, Е. В. Регуляция ультрадианных ритмов двигательной активности олигопептидами, структурно родственными окситоцину / Е. В. Кравченко, Н. А. Бизунок, Б. В. Дубовик // Доклады Национальной академии наук Беларусь. – 2021. – Т. 65, № 2. – С. 191–198.
7. McDiarmid, T. A. Habituation is more than learning to ignore: multiple mechanisms serve to facilitate shifts in behavioral strategy / T. A. McDiarmid, A. J. Yu, C. H. Rankin // BioEssays. – 2019. – Vol. 41, N 9. – e1900077.

The effect of Pro-Gly and Pro-Leu dipeptides on the dynamics of exploratory and locomotor activity in group actimetry, and modification of their effects with dizocilpine

Kravchenko E. V.¹, Savanets O. N.¹, Olgomets L. M.¹, Bizunok N. A.², Dubovik B. V.²

¹ Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk,
Republic of Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The effect of the dipeptides Pro-Gly, Pro-Leu on the dynamics of exploratory and locomotor activity of submissive ICR mice under group actimetry was studied, and the modification of their effects with dizocilpine was evaluated. The dipeptide Pro-Leu (but not Pro-Gly) facilitated the process of habituation of the locomotor activity in the conditions of group actimetry in the first (but not repeated) session of measuring.

The tested dipeptides did not have a significant effect on the anxiety level of submissive ICR mice, estimated by verticalizations in the first 5 minutes of registration.

Keywords: Pro-Gly, Pro-Leu, dizocilpine, mice, actimetry.

Поступила 05.06.2024



УДК: 61.615.03

ИССЛЕДОВАНИЕ IN SILICO ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ В КАЧЕСТВЕ БЛОКАТОРОВ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ

Краецкая О. Ф.

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

Реферат. В работе изучены *in silico* противовирусные средства (римантадин, осельтамивир и ацикловир) и их производные в качестве блокаторов натриевых каналов Nav1.7 и Nav1.8 – наиболее важных в развитии и поддержании состояний патологической боли. Исследование проводили в сравнении с аналогичным действием лидокаина на Nav1.7 и Nav1.8. Среди противовирусных средств лучшие показатели связывания (G_i) с Nav1.7 были получены для римантадина ($G_i = -5,19$ ккал/моль), а с Nav1.8 — для ацикловира ($G_i = -4,62$ ккал/моль). Энергия их связывания с Nav1.7 и Nav1.8 была сопоставима с аналогичными показателями для лидокаина. С целью получения более биологически доступных структур противовирусных средств все они были модифицированы разным количеством фенильных остатков. Это привело к снижению энергии связывания с рецепторами Nav1.7 и Nav1.8 для производных римантадина и ацикловира и, наоборот, улучшило показатели аффинности с Nav1.7 и Nav1.8 для производного осельтамивира.

Ключевые слова: болевые рецепторы, противовирусные средства, римантадин, ацикловир, осельтамивир, лидокаин, блокаторы натриевых каналов, молекулярный докинг.

Введение. Хроническая боль является серьезной нерешенной медицинской проблемой. Текущие исследования, касающиеся функции натриевых каналов при патологической боли, продвигаются вперед в надежде, что это позволит разработать блокаторы натриевых каналов как многообещающее средство для лечения хронической боли.

Ноцицепция – это физиологический процесс, включающий активацию нейронной сигнализации, которая необходима для восприятия боли. Хотя ноцицепция и важна для выживания, так как предупреждает о любых повреждающих или потенциально вредных стимулах, но патологическая боль таковой не является и может быть чрезвычайно изнуряющей, если сохраняется продолжительное время. Патологическая боль включает нейропатические состояния, вызванные повреждением нерва, и воспалительные состояния, вызванные повреждением тканей. Известно [1, 2], что натриевые каналы из семейства VGSC $\text{Na}_v1 - \text{Na}_v1.7$ и $\text{Na}_v1.8$ – экспрессируемые в поврежденных аксонах, ответственны за развитие аномального нейронального электрогенеза и вносят огромный вклад в патофизиологию невропатических и воспалительных болевых состояний.

Так, Nav1.7, в частности, важен при наследственных болевых синдромах человека с генетическими мутациями, изменяющими функциональные свойства каналов. Еще предстоит определить, является ли Nav1.7 столь же важным при нейропатической боли, поскольку исследования в этой области противоречивы [1]. Литература, посвященная роли Nav1.8 в патофизиологии нейропатической боли [1–4], дает более четкие данные, и считается, что этот канал может быть важен для развития аномального электрогенеза и гипервозбудимости в неповрежденных сенсибилизованных первичных аfferентах, соседних с поврежденными нейронами.

Кроме того, могут быть зависящие от времени изменения вклада Nav1.8 в патофизиологию нейропатической боли [1]. Дополнительные исследования в этой области должны помочь выяснить точные механизмы, с помощью которых эти каналы способствуют развитию хронических болевых состояний. Дальнейшие исследования в этой области также важны для разработки подтип-специфичных блокаторов натриевых каналов, что является многообещающей потенциальной терапевтической стратегией хронической патологической боли.

Современные анальгетики вызывают ряд побочных эффектов и не очень успешно облегчают боль. Достижения в понимании функции конкретных подтипов натриевых каналов в патофизиологии хронической нейропатической и воспалительной боли помогут удовлетворить потребность в более точном и эффективном лечении пациентов с хроническими болевыми состояниями. Из литературных данных также известно [5, 6], что многие противовирусные средства, такие как римантадин и его аналоги (например, Амантадин), проявляют достаточно широкий спектр анестезирующей активности, то есть могут быть рассмотрены в качестве потенциальных блокаторов натриевых каналов. В данной работе для исследования *in silico* были выбраны три противовирусных средства: римантадин, осельтамивир и ацикловир, которые принимают внутрь в виде таблеток или жидкости. Римантадин представляет собой противовирусный препарат для перорального применения, используемый для лечения, а в редких случаях для предотвращения инфекции, вызванной вирусом гриппа группы А. Противовирусный механизм действия заключается в антагонизме протонного канала M2 вируса гриппа А, который предотвращает выход из эндосом (то есть высвобождение вирусного генетического материала в цитоплазму хозяина).

Осельтамивир представляет собой противовирусный препарат, используемый для лечения и медицинской профилактики гриппа А и гриппа В.

Ацикловир является противовирусным препаратом. В основном он используется для лечения инфекций, вызванных вирусом простого герпеса, ветряной оспы и опоясывающего лишая. Другие области применения включают медицинскую профилактику цитомегаловирусных инфекций после трансплантации и тяжелых осложнений вирусной инфекции Эпштейна–Барр. Его можно принимать внутрь, наносить в виде крема или вводить инъекционно. В настоящее время распространенным анестетиком из группы аминов, блокатором натриевых каналов, в том числе Nav1.7 и Nav1.8, является лидокаин, поэтому полученные в ходе исследования результаты по противовирусным средствам предполагалось сравнивать с аналогичными результатами для лидокаина.

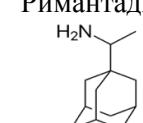
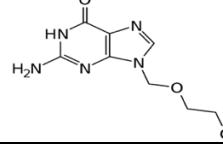
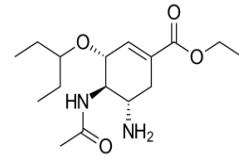
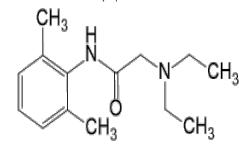
Цель работы – спрогнозировать с помощью программы молекулярного докинга наличие средства римантадина, осельтамивира и ацикловира и их производных к натриевым каналам Nav1.7 и Nav1.8 и сделать вывод о возможном

более глубоком изучении анестезирующих свойств этих лекарственных средств.

Материалы и методы. Структуры противовирусных средств и лидокаина созданы с помощью химической программы ChemDraw Pro 12,0. Структуры натриевых каналов Nav1.7, Nav1.8 выделены из банка данных о белках (PDB) [7]. Молекулярная стыковка лиганд–белок выполнена с помощью программы dockingserver.

Результаты и их обсуждение. В работе осуществлена молекулярная стыковка противовирусных препаратов (римантадина, осельтамивира, ацикловира) и лидокаина с натриевыми каналами Nav1.7, Nav1.8. Энергия связывания (G_i , ккал/моль), полученная в результате стыковки, представлена в таблице 1. Анализ полученных результатов (таблица 1) показал, что наибольшую аффинность как к Nav1.7, так и к Nav1.8, имеют два противовирусных средства — римантадин и ацикловир. Энергия связывания с Nav1.7 и Nav1.8, в их присутствии лежит в диапазоне от -4 до $-5,3$ ккал/моль и сопоставима с аналогичными показателями связывания с Nav1.7 и Nav1.8 для лидокаина ($-4,05$ и $-3,2$ ккал/моль соответственно).

Таблица 1 – Энергия связывания противовирусных препаратов и лидокаина с натриевыми каналами

Препарат	Энергия связывания, G_i , ккал/моль	
	Nav1.7	Nav1.8
Римантадин 	-5,19	-4,01
Ацикловир 	-4,3	-4,62
Осельтамивир 	-3,13	-2,89
Лидокаин 	-4,05	-3,2

Также для всех трех противовирусных средств и лидокаина были проанализированы особенности их взаимодействия с аминокислотными остатками натриевых каналов Nav1.7 и Nav1.8 в центре связывания лиганд-белок (таблица 2). Отмечено, что у римантадина, ацикловира и лидокаина основной вклад в энергию связывания лиганд-белок вносят гидрофильные взаимодействия, тогда как для осельтамивира количественный перевес сведен в сторону гидрофобных взаимодействий.

Таблица 2 – Схемы стыковок противовирусных препаратов и лидокаина с натриевыми каналами

Препаратор	Схема стыковки лиганд-рецептор	
	Nav1.7	Nav1.8
Римантадин		
Ацикловир		
Осельтамивир		
Лидокаин		

С целью получения более биологически доступных структур противовирусных средств все они были модифицированы разным количеством фенильных остатков. Это привело к снижению энергии связывания с рецепторами Nav1.7 и Nav1.8 для производных римантадина и ацикловира (G_i находилась в пределах от -2,7 до -3,9 ккал/моль, что несколько ниже аналогичных

значений для исходных противовирусных структур римантадина и ацикловира). Для производного осельтамивира введение в структуру гидрофобных фрагментов в виде фенильных остатков, наоборот, в некоторой степени улучшило показатели аффинности с Nav1.7 и Nav1.8 — с -4,05 до -4,84 ккал/моль с Nav1.7 и с -3,2 до -4,12 ккал/моль для Nav1.8 (таблица 3).

Таблица 3 – Энергия связывания производного осельтамивира с натриевыми каналами

Препарат	Энергия связывания, G_i , ккал/моль	
	Nav1.7	Nav1.8
Производное осельтамивира	-4,84	-4,12

Данный факт лишний раз подтверждает большой вклад гидрофобных взаимодействий осельтамивира и его производного с введенными фенильными группами в энергию связывания с натриевыми рецепторами. Схемы стыковок производного осельтамивира с натриевыми каналами приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Схемы стыковок производного осельтамивира с натриевыми каналами

Препарат	Схема стыковки лиганд-рецептор
Производное осельтамивира	C Nav1.7
	C Nav1.8

Заключение. С помощью молекулярного докинга спрогнозировано средство римантадина, осельтамивира и ацикловира к натриевым каналам Nav1.7 и Nav1.8. Данные результаты могут способствовать в перспективе более

глубокому изучению обезболивающих свойств у противовирусных средств, а также развитию новых методов лечения болевого синдрома при вирусных заболеваниях.

Список цитированных источников

1. Schaila, H. Nav1.7 and Nav1.8: Role in the pathophysiology of pain / H. Schaila // Mol Pain. – 2019. – Jan-Dec: 15:1744806919858001.
2. John, N Wood. Sodium channels / N. W. John // Brain Neurosci Adv. – 2018. – Nov:13:2:2398212818810684.
3. Pain behavior in SCN9A (Nav1.7) and SCN10A (Nav1.8) mutant rodent models / Y. Xue [et al.] // Neurosci Lett. – 2021. – May 14; 753:13584.
4. Sodium channels in normal and pathological pain / H. Dib. [et al.] // Anna Reverend Neurosci – 2010. – Vol. 33. – P. 325–347.
5. Intrathecal rimantadine induces motor, proprioceptive, and nociceptive blockades in rats / I. T. Jann [et al.] // Neurosci Lett. – 2016. – Apr. 8. – P. 94–98.
6. Rimantadine and 2-adamantanamine elicit local anesthesia to cutaneous nociceptive stimuli in a rat model / H. Ching [et al.] // Fundam Clin Pharmacol – 2014. – Apr. 28(2). – P. 199–204.
7. Protein Data Bank [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.rcsb.org/pdb/home/hom.do>. – Дата доступа: 15.08.2024.

In silico study of antiviral drugs and their derivatives as sodium channel blockers

Kraetskaya O. F.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Antiviral agents (remantadine, oseltamivir and acyclovir) and their derivatives as blockers of sodium channels Nav1.7 and Nav1.8 – the most important in the development and maintenance of pathological pain conditions - were studied in silico. The study was conducted in comparison with the similar effects of lidocaine on Nav1.7 and Nav1.8. Among antiviral agents, the best binding rates (G_i) with Nav1.7 were obtained for rimantadine ($G_i = -5.19$ kcal/mol), and with Nav1.8 – for acyclovir ($G_i = -4.62$ kcal/mol). The energy of their binding to Nav1.7 and Nav1.8 was comparable with similar indicators for lidocaine. In order to obtain more biologically accessible structures of antiviral agents, all of them were modified with different amounts of phenyl residues. This led to a decrease in binding energy to the Nav1.7 and Nav1.8 receptors for rimantadine and acyclovir derivatives and, conversely, improved affinity scores with Nav1.7 and Nav1.8 for the oseltamivir derivative.

Keywords: pain receptors, antiviral agents, rimantadine, acyclovir, oseltamivir, lidocaine, sodium channel blockers, molecular docking.

Поступила 05.06.2024



УДК 547.787:615.281.873

РАЗРАБОТКА СКРИПТА МНОЖЕСТВЕННОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА И ЕГО ВАЛИДАЦИЯ ПРИ СРАВНЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ IN SILICO ДЛЯ ГЛЮКОКИНАЗЫ

Лахвич Ф. Ф., Прокопеня Я. О.

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

Реферат. На основании анализа и сравнения принципов молекулярного докинга и алгоритма работы различных программ молекулярного моделирования был проведен скрипting утилиты на базе AutoDock Vina для виртуального скрининга аффинности лигандов к выбранной биологической мишени. Разработанный алгоритм для создания программы множественного молекулярного докинга демонстрирует высокую эффективность, точность при определении аффинности лигандов к протеинам-мишеням. Тестирование программы на различных наборах данных подтвердило ее способность к корректной обработке и анализу больших объемов данных. Сравнение результатов, полученных с помощью разработанной программы, с результатами, полученными с использованием других программ, в частности в исследовании *in silico* аффинности ряда лигандов к глюкокиназе, подтвердило высокую точность и производительность утилиты, а также соответствие результатов, полученных при работе на базе программного обеспечения AutoDock Vina и AutoDock 4.

Ключевые слова: AutoDock Vina, AutoDock 4, аффинность, глюкокиназа, скрипting утилиты для множественного докинга.

Введение. Методы моделирования *in silico* являются важным этапом в процессе поиска и разработки новых лекарственных средств (ЛС). Эти методы позволяют предварительно отбирать перспективные химические соединения для их последующего синтеза и исследования *in vitro* и/или *in vivo*, а также дальнейших доклинических исследований. Скрининг *in silico* на начальных этапах разработки ЛС предоставляет возможность проверять большие библиотеки лигандов на соответствие заданным критериям. Одним из ключевых методов скрининга является молекулярный докинг, который оценивает степень комплементарности лиганда и активного сайта связывания рецептора, обеспечивающего необходимый биологический эффект. Результаты докинга включают данные о количественной оценке средства лиганда к активному сайту связывания рецептора, величине энергии связывания, наборе аминокислотных остатков макромолекулы, участвующих во взаимодействии, и химической природе этих взаимодействий.

В последние десятилетия компьютерное моделирование стало неотъемлемой частью разработки новых ЛС. Методы моделирования

позволяют также изучать механизмы взаимодействия биологически активных низкомолекулярных веществ с протеинами и другими биологическими мишениями. Взаимодействие биологически активных низкомолекулярных лигандов с протеинами лежит в основе многих биохимических процессов, и понимание природы этих взаимодействий позволяет создавать более эффективные и специфичные ЛС. Методы прямого компьютерного моделирования, такие как молекулярный докинг и молекулярная динамика, предполагают прямое моделирование и анализ молекулярных структур, взаимодействий и динамики. Эти методы используют детализированные физические модели для предсказания поведения биологически активных веществ на молекулярном уровне.

Основополагающим принципом является применение физических и химических законов для моделирования молекулярных систем и их взаимодействий. Эти методы позволяют исследовать структуру молекул, их динамические движения и механизмы взаимодействия с биологическими мишениями, обеспечивая детальное понимание процессов на молекулярном уровне [1].

С другой стороны, непрямые методы, включая количественное соотношение структура-активность (SAR) и машинное обучение, используют статистические модели и модели машинного обучения для предсказания поведения лекарств на основе эмпирических данных. Эти методы, как правило, не требуют детальных физических моделей, а основываются на выявлении закономерностей и корреляций в больших массивах данных. Основной принцип заключается в анализе существующих данных о химических структурах и их биологической активности для построения моделей, позволяющих предсказать свойства и поведение новых соединений. Эти методы позволяют быстро и эффективно проводить скрининг больших библиотек соединений, тем самым ускоряя процесс открытия лекарств [1].

Цель работы – скрипты для множественного докинга в поиске веществ с высокой активностью к выбранной биологической мишени. В рамках исследования также была проведена валидация разработанного скрипта в эксперименте *in silico* при сравнении результатов взаимодействия экспериментальных активаторов глюкокиназы с аллостерическим центром фермента.

Материалы и методы. Информация о трехмерной структуре фермента глюкокиназа (код белка 4RCH) взята с сайта Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>, структурные формулы лигандов получены с сайта DrugBank (<https://go.drugbank.com>). Для подготовки лигандов и протеинов была использована программа визуализации AutoDock Tools. Для проведения докинга использовали AutoDock 4 и связку программ визуализации UCSF Chimera + AutoDock Vina. Для автоматизации процесса множественного докинга был написан скрипт на языке командной оболочки Windows (.bat файл). Этот скрипт использует функции и команды, предоставленные программным обеспечением AutoDock Vina. С помощью данного скрипта был выполнен скрининг взаимодействия молекул-лигандов с протеинами-мишениями. Разработанный скрипт позволил значительно сократить время и повысить эффективность процесса докинга. Для визуализации комплекса, полученного в AutoDock 4, использовали онлайн-сервер Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP), комплекс, полученный в связке AutoDock 4 и UCSF Chimera отображен в самой программе визуализации. Порядок выполнения исследования:

1. Подготовка протеина: использовали AutoDockTools, были убраны нестандартные структуры (другой лиганд, вода).

2. Подготовка лиганда:

- использовали AutoDockTools, функцию prepare ligand;
- использовали программу, написанную на основе OpenBabel.

3. Заполняли config нашего докинга.

4. Запускали программу множественного докинга лигандов.

Результаты и их обсуждение. Программы молекулярного докинга – важнейшие инструменты в вычислительном поиске ЛС, позволяющие исследователям предсказать топологию связывания малой молекулы с целевым протеином. В данном исследовании были известны пространственная структура лиганда и мишени. Поскольку скрипты утилиты для программированного скрининга аффинности лигандов к выбранным мишениям и валидизация полученных с его помощью результатов предусматривала использование различных платформ для симуляции, нами было проведено сравнение программных ресурсов, которые будут использоваться для моделирования [2, 3].

Известно, что выделяют как общедоступные (бесплатные), так и полностью коммерческие решения. К первым относятся AutoDock 4, AutoDock Vina, Dock. Ко второй группе относятся Schrödinger's Glide, MOE (Molecular Operating Environment), Gold (Genetic Optimization for Ligand Docking), Sybyl-X Surflex-Dock, LigandScout.

AutoDock 4 является популярным программным продуктом для проведения исследований *in silico*. Однако проведение докинга с AutoDock 4 требует больших временных затрат, что делает его неудобным в сравнении с его прямым конкурентом AutoDock Vina. В этом исследовании проведен скрипты для виртуального скрининга взаимодействия малых молекул с протеинами на основе AutoDock Vina. При этом для проверки универсальности разработанной утилиты проведена валидация результатов с использованием AutoDock 4.

Для проверки работоспособности предложенной модели был проведен анализ распространенных программ для докинга лигандов на стандартном наборе данных (рисунки 1, 2).

По результатам сравнения AutoDock 4 и AutoDock Vina можно выделить ряд преимуществ AutoDock Vina:

1. Быстрота проведения эксперимента, что делает программу предпочтительной для виртуального скрининга.
2. Точность симуляции: 78 % результатов докинга имели среднее квадратичное

отклонение меньше 2, в то время, когда у AutoDock 4 только 49 %.

В ходе сравнения также были отмечены удобство и простота использования AutoDock Vina [4, 5].

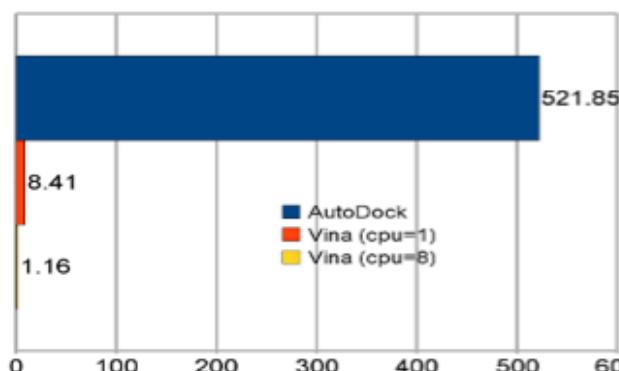


Рисунок 1 – Среднее время на пару рецептор-лиганд в тестовом наборе AutoDock относится к AutoDock 4, а Vina — к AutoDock Vina

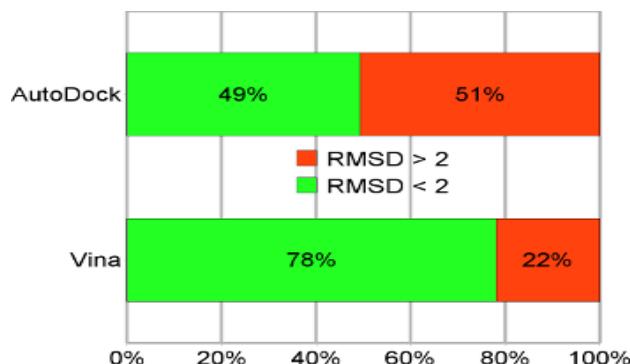


Рисунок 2 – Точность прогнозирования режима привязки на тестовом наборе AutoDock относится к AutoDock 4, а Vina – к AutoDock Vina

Для большинства комплексов пять программ предсказали вполне корректные суперпозиции лигандов в местах связывания. Однако более низкие значения RMSD для поз с наибольшим сродством были расположены следующим образом: Glide 6,6 ($0,99 \pm 0,13$) > AutoDock 3 ($0,90 \pm 0,08$) > AutoDock 4 ($0,84 \pm 0,08$) > DOCK 6,5 ($0,57 \pm 0,06$) > AutoDock Vina ($0,55 \pm 0,05$) [4]. Фактически, значения среднеквадратичного отклонения были довольно низкими (среднее RMSD $\leq 1,0 \text{ \AA}$) (рисунок 3). Самое низкое значение среднего RMSD было получено с использованием AutoDock Vina (0,55). Исследователи также отмечают высокую скорость работы AutoDock Vina – всего несколько секунд на расчет, тогда как другим программам требовалось около 5 минут на расчет. [6].

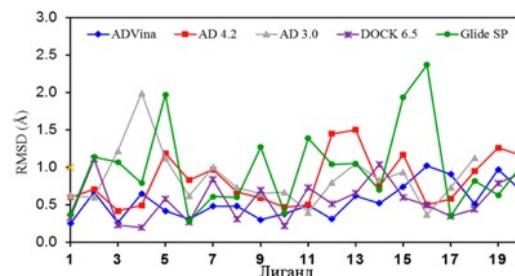


Рисунок 3 – Среднее квадратичное отклонение для самодокинга в программах

Несмотря на то, что многие исследователи проводят эксперимент *in silico* в AutoDock 4, мы провели скриптинг утилиты на базе программной оболочки AutoDock Vina. Это связано с тем, что AutoDock 4 не имеет функции «конфиг» файла, которая облегчает процесс докинга для исследователя. Поэтому перед нами стояла дополнительная задача провести валидацию результатов, полученных на базе AutoDock Vina, сравнивая их с результатами экспериментов на базе AutoDock 4 (рисунок 4). В качестве протеина-мишени была выбрана глукокиназа, лиганды – ряд веществ, изученных ранее в качестве потенциальных активаторов данного фермента [7]. Нами была разработана утилита для многочисленного молекулярного докинга (рисунок 4).

```

receptor=4RCHT.pdbqt -- подготовленный белок
center_x=30.45 -- центр решетки (Grid) для белка
center_y=1.33 -- центр решетки (Grid) для белка
center_z=69.00 -- центр решетки (Grid) для белка
size_x=55 -- размер решетки (Grid) для белка
size_y=70 -- размер решетки (Grid) для белка
size_z=52 -- размер решетки (Grid) для белка
num_modes=20 -- количество пробегов
exhaustiveness=8 -- исчерпаемость (подвижность атомов)
energy_range=3 -- макс. разница в энергии между наилучшим
и наихудшим режимом связывания
  
```

Рисунок 4 – Конфиг-файл для утилиты докинга

Ниже представлено сравнение результатов докинга с помощью разработанной утилиты для AutoDock Vina в связке с программой визуализации UCSF Chimera, а также AutoDock 4 (таблицы 1–3).

Таблица 1 – Результаты докинга AutoDock 4 [5]

№ опыта	Минимальная Е _{связь} , ккал/моль	Средняя Е _{связь} , ккал/моль
1	-9,41	-8,93
2	-9,41	-8,67
3	-9,28	-8,76
4	-9,26	-8,89

Таблица 2 – Результаты докинга разработки

№ опыта	Минимальная Е _{связь} , ккал/моль	Среднеквадратичное отклонение	
		нижняя граница	верхняя граница
1	-7,8	0,000	0,000
2	-7,3	33,583	36,556
3	-6,9	5,569	6,950
4	-6,7	35,890	40,319
5	-6,7	6,726	8,918
6	-6,6	5,560	7,069
7	-6,5	2,448	3,200
8	-6,5	4,381	7,934
9	-6,4	5,802	7,497
10	-6,2	37,189	40,046

Таблица 2 – Результат докинга Chimera+ AD Vina

№ опыта	Минимальная Е _{связь} , ккал/моль	Среднеквадратичное отклонение	
		нижняя граница	верхняя граница
1	-8,0	0,000	0,000
2	-8,0	6,620	11,221
3	-8,0	1,903	2,085
4	-7,6	2,242	2,713
5	-7,6	5,575	7,366
6	-7,4	6,548	11,456
7	-7,4	3,982	6,588
8	-7,3	29,541	36,789
9	-7,3	4,751	11,497
10	-7,3	4,923	10,932

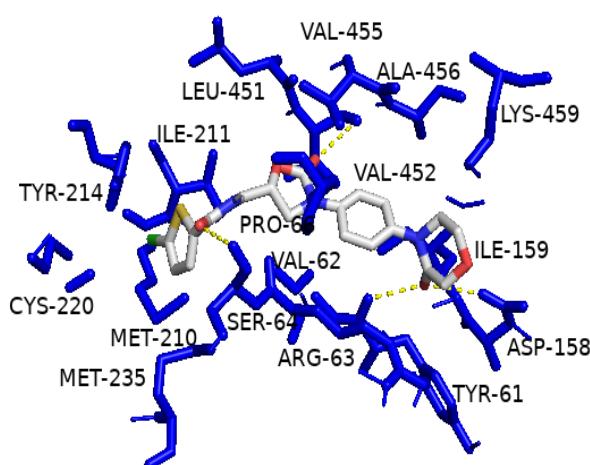


Рисунок 5 – Комплекс протеин-лиганд AutoDock 4 [7]

Для валидации полученных результатов было проведено сравнение топологии комплексов. Было установлено, что лиганда находились в одном кармане и имели сходную конформацию. При этом аминокислотное окружение тоже показало высокую степень совпадения [7].

Сравнение топологии связывания показало (рисунки 5, 6) сходную суперпозицию комплексов лиганд-протеин для экспериментов, проведенных с использованием различных программных ресурсов AutoDock 4 и AutoDockVina.

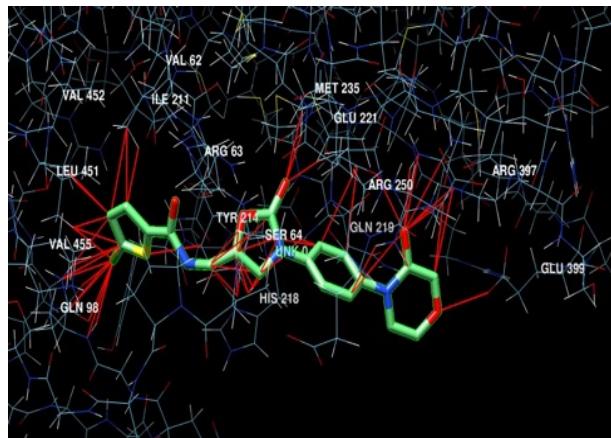


Рисунок 6 – Комплекс протеин-лиганд AutoDock Vina

Заключение. На основании анализа и сравнения принципов молекулярного докинга и алгоритма работы различных программ молекулярного моделирования был проведен скриптинг утилиты на базе AutoDock Vina для виртуального скрининга аффинности лигандов к выбранной биологической мишени.

Разработанный алгоритм для создания программы множественного молекулярного докинга демонстрирует высокую эффективность, точность при определении аффинности лигандов к протеинам-мишениям.

Тестирование программы на различных наборах данных подтвердило ее способность к корректной обработке и анализу больших объемов данных. Сравнение результатов, полученных с помощью разработанной программы, с результатами, полученными с использованием других программ, в частности в исследовании *in silico* аффинности ряда лигандов к глукокиназе, подтвердило высокую точность и производительность утилиты, а также соответствие результатов, полученных при работе на базе программного обеспечения AutoDock Vina и AutoDock 4.

Список цитированных источников

1. Methods for the Discovery and Identification of Small Molecules Targeting Oxidative Stress-Related Protein-Protein Interactions: An Update / X. Wu [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. – 2022. – Vol. 11(4). – P. 619.
2. Pagadala, N. S. Software for molecular docking: a review / N. S. Pagadala, K. Syed, J. Tuszynski // *Biophys Rev*. 2017. – Vol. 9(2). – P. 91–102.
3. High-Throughput Virtual Screening of Compounds with Electrophilic Fragments for New Potential Covalent Inhibitors of Bacterial Proteins / P. Yakovets [et al.] // *Proc.* – 2022. – Vol. 12(87).
4. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings / J. Eberhardt [et al.] // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2021. – Vol. 61(8). – P. 3891–3898.
5. Trott, O. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading / O. Trott, A. Olson // *Journal of computational chemistry*. – 2010. – Vol. 31(2). – P. 455–461.
6. Castro-Alvarez, A. The Performance of Several Docking Programs at Reproducing Protein-Macrolide-Like Crystal Structures / A. Castro-Alvarez, A. M. Costa, J. Vilarrasa // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22(1). – P. 136.
7. Лахвич, Ф. Ф. Исследование *in silico* аффинности Ривароксабана к глюкокиназе / Ф. Ф. Лахвич, О. Н. Ринейская // Медицинский журнал. – 2023. – № 2(84). – С. 62–66.

Scripting of a new docking tool for multiple ligands' screening and its validation *in silico* for glucokinase

Lakhvich T. T., Prakapienia Y. A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

When analyzing and comparing different molecular docking tools as well as the operating algorithm of various molecular modeling programs, AutoDock Vina based tool was proposed for virtual screening of the affinity of ligands for a selected biological targets. The developed method for creating a multiple molecular docking script is efficient and accurate in determining the affinity of ligands for protein targets. The utility software was tested on various databases and validated *in silico* for glucokinase. Comparing the results from utility software developed with the other programs ensures reliability with the high accuracy as well as the consistency of the results obtained when working on the AutoDock Vina and AutoDock 4 software; the data meeting the experimental standards and being compatible with the other programs for screening.

Keywords: AutoDock Vina, AutoDock 4, affinity, glucokinase, scripting utility software for multiple docking.

Поступила 05.06.2024

УДК 547.787:615.281.873

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТОПОЛОГИИ СВЯЗЫВАНИЯ РИВАРОКСАБАНА И КОМПЛЕКСА ИЗОНИКОТИНОИЛ-NADH С МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ NADH-ЗАВИСИМОЙ ЕНОИЛ-(ACP)- РЕДУКТАЗОЙ

Лахвич Ф. Ф., Ринейская О. Н.

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

Реферат. Целью исследования явился сравнительный анализ топологии связывания ривароксабана и изоникотиноил-NADH с микобактериальной NADH-зависимой еноил(ACP)-редуктазой. Результаты исследования подтверждают реализацию механизма антибактериального действия через ингибирование синтеза миколовых кислот на стадии элонгации жирных кислот пути FAS-II. Ривароксабан топологически «покрывает» пространство комплекса изоникотиноил-NADH в центре связывания; при этом энергия связывания составила $-9,25$ и $-10,29$ ккал/моль для нативной и мутантной форм протеина соответственно. Можно предположить, что ривароксабан является конкурентным ингибитором еноил-(ACP)-редуктазы, для которого аминокислотные замены, приводящие к повышению конформационной лабильности мутантного фермента, не играют значительной роли. Следовательно, данные мутантные замены не будут приводить к развитию резистентности к лекарственному средству.

Ключевые слова: NADH-зависимая еноил-(ACP)-редуктаза, молекулярный докинг, аффинность, ривароксабан, изоникотиноил-NADH.

Введение. По данным ВОЗ, в 2022 году заболели туберкулезом 10,6 миллиона человек, и 1,3 миллиона человек погибли от этого заболевания [1]. При этом ежегодно во всем мире лекарственно-устойчивым туберкулезом заболевают около полумиллиона человек.

Таким образом, туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью является серьезной проблемой здравоохранения. Исследования *in silico* с целью поиска потенциальных лекарственных средств, которые будут использоваться для лечения резистентных форм туберкулеза представляет собой актуальную и практически значимую проблему здравоохранения.

Поиск биологических мишней, специфичных для микобактериальной клетки, является одним из перспективных направлений создания новых противотуберкулезных лекарственных средств.

К таким биологическим мишням относятся ферменты синтаз жирных кислот (FAS), которые участвуют в биосинтезе компонентов клеточной стенки *Mycobacterium tuberculosis* и при этом отсутствуют в организме млекопитающих (рисунок 1).

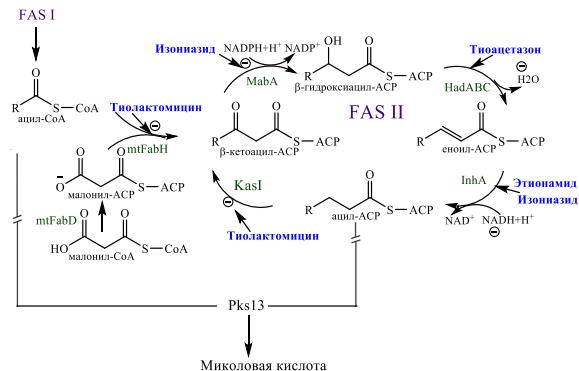


Рисунок 1 – Схема синтеза миколовых кислот
FAS I – синтаза жирных кислот I; FAS II –
синтаза жирных кислот II; ACP –
ацилпереносящий белок; mtFabH – β -
кетоацил-ACP-синтаза III *M. tuberculosis*;
mtFabD – малонил-CoA: ACP-трансфераза
M. tuberculosis; MabA – β -кетоацил-ACP-
редуктаза; HadABC – β -гидроксиацил-ACP-
дегидратаза; Pks13 – поликетидсинтаза I типа

В эксперименте *in vitro* ранее было показано, что ривароксабан тормозит развитие микобактерий [2]. Для установления его возможного

механизма действия методами компьютерного моделирования нами было выявлено, что ривароксабан обладает высокой аффинностью к ферментам, которые принимают участие в процессе формирования клеточной стенки микобактерий — KasI и mtFabH [3, 4]. Для расширения представлений о возможном участии ривароксабана в метаболизме миколовых кислот проведено исследование *in silico* с NADH-зависимой еноил-(ACP)-редуктазой (ACP — ацилпереносящий белок). Последняя является классической и изученной мишенью [5], которая предложена для объяснения терапевтического действия изониазида — противотуберкулезного лекарственного средства первой линии. Еноил-(ACP)-редуктаза (InhA) — это фермент системы синтазы жирных кислот типа II (FAS-II), которая участвует в биосинтезе миколовых кислот, основного компонента клеточных стенок микобактерий. Катализирует NADH-зависимое восстановление двойной связи 2-транс-еноил-[белка-ацил-переносчика], что составляет важный этап цикла элонгации жирных кислот путем FAS-II.

Цель работы — сравнительный анализ топологии связывания ривароксабана и изоникотиноил-NADH с микобактериальной NADH-зависимой еноил-(ACP)-редуктазой.

Материалы и методы. Информация о трехмерной структуре нативного (2PR2) и мутантного варианта по S94A (2NV6) фермента еноил-(ACP)-редуктазы получена с сайта Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>). Для молекулярного докинга *in silico* использовали ряд специализированных программ: программный пакет ChemOffice, AutoDock Tools 1.5.7, PyMOL, онлайн-серверы OpenBabel, Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (<https://plip-tool.biotecl.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) и Protein-Plus (<https://proteins.plus>).

AutoDock 4 использовали для подготовки лиганда к стыковке с рецептором, расчета сетки потенциалов и непосредственно лиганд-белковых взаимодействий. При стыковке с целью оптимизации процесса в Autodock применяли генетический алгоритм поиска глобального минимума Ламарка (LGA) с числом прогонов 100, размером популяции 300 для жесткого рецептора и гибкого лиганда. В качестве лигандов исследовали молекулы (S)-5-хлор-N-((2-оксо-3-(4-(3-оксоморфофено) фенил)оксазолидин-5-ил)метил)тиофен-2-карбоксамида (МНН — ривароксабан) и изоникотиноил-NADH, образующийся *in vivo* в результате взаимодействия гидразида изоникотиновой кислоты (МНН — изониазид) и кофермента никотинамидадениндинуклеотида окисленного.

Взаимодействие лиганда и белка оценивали при помощи характеристики, полученной в результате молекулярного докинга — энергии связывания ($E_{\text{связ.}}$). В настоящей работе энергией связывания считали наименьшее значение изменения свободной энергии Гиббса (ккал/моль) при переходе комплекса лиганд-протеин из несвязанного состояния в связанное. Программа OpenBabelGUI использовалась в качестве конвертера форматов, требуемых AutoDock 4, PyMOL, PLIP и Protein-Plus. Поиск и анализ центров связывания, изучение характера взаимодействий лиганда с рецептором производился при помощи программы PyMOL, онлайн-серверов PLIP и Protein-Plus.

Результаты и их обсуждение. Ривароксабан используется в качестве антикоагуланта, реализующего свой эффект через ингибицию фактора свертываемости крови Xa. Показано, что ривароксабан имеет высокую аффинность по отношению к β -кетоацилсинтазе I и β -кетоацилсинтазе III; в опытах *in vitro* раствор фармсубстанции данного лекарственного средства в диметилсульфоксиде ингибировал развитие клеток культуры *Micobacterium Terrae* [2].

Был проведен сравнительный анализ эффективности связывания ривароксабана и изоникотиноил-NADH с микобактериальной InhA *in silico*. Чтобы определить, является ли InhA мишенью ривароксабана, первоначально был проведен докинг нативного протеина (код 2PR2, дикий тип) и лиганда. Наименьшая энергия связывания составила $-9,25$ ккал/моль, что, с учетом размеров молекулы ривароксабана, является относительно высоким значением и, следовательно, может свидетельствовать об участии данного лиганда в процессе ингибирования роста микобактерий. Ранее было выдвинуто предположение о том, что резистентность микобактерий к изониазиду и этионамиду связана с точечными мутациями S94A и D148G за счет повышения конформационной подвижности протеина.

При этом снижается аффинность к ферменту фрагмента NADH в его комплексе с метаболитами лекарственных средств [6, 7]. В то же время микобактерии с мутантным протеином (S94A и D148G) сохраняют чувствительность к природному антибиотику пиридомицину (рисунок 2).

Авторы публикации считают, что это связано с тем, что в отличие от изониазида и этионамида, метаболиты которых образуют биологически активные комплексы с NADH, пиридомицин является конкурентным ингибитором InhA, непосредственно замещая кофермент в протеине.

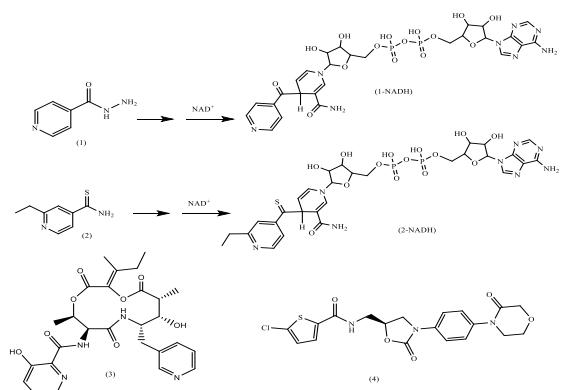


Рисунок 2 – Структурные формулы ингибиторов InhA
1 – изониазид; 2 – этионамид;
3 – пиридомицин; 4 – ривароксабан

С учетом топологии можно предположить аналогичный механизм для ингибирования фермента ривароксабаном. Был проведен эксперимент *in silico* по определению энергии связывания и суперпозиций ингибиторов InhA, изоникотиноил-NADH и ривароксабана в сайтах

связывания нативной и мутантной форм фермента. Наименьшая энергия связывания для ривароксабана с мутантной формой InhA составила $-10,29$ ккал/моль, что, с учетом размеров молекулы ривароксабана, является высоким значением. Следовательно, это может свидетельствовать о потенциальном участии данного лиганда в ингибировании роста резистентных штаммов микобактерий с мутантной формой энзима. Рисунок 3 демонстрирует положение обоих лигандов в пределах одного центра связывания нативной и мутантной формы протеина.

Результаты докинга свидетельствуют о совпадении центров связывания лигандов с активным центром фермента.

Молекула ривароксабана эффективно заполняет пространство, которое занимает изоникотиноильный фрагмент в его комплексе с NADH; при этом для мутантной формы (рисунок 3 справа) координаты оксазинового фрагмента практически полностью совпадают с координатами дигидропиридина.

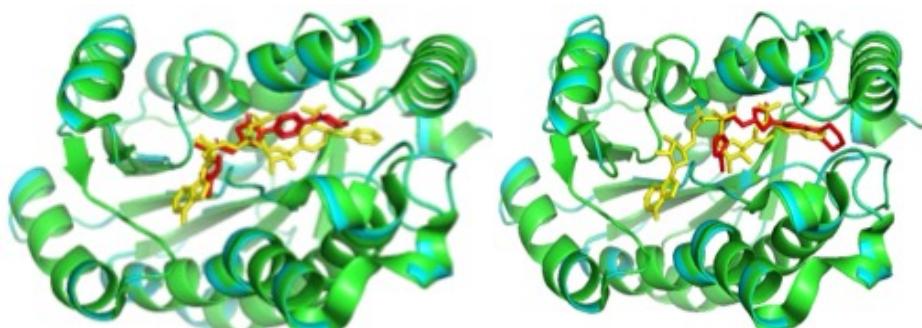


Рисунок 3 – Слева — совмещенные структуры ривароксабан-InhA (2PR2, дикий тип) и изоникотиноил-NADH-InhA (2PR2, дикий тип), справа — совмещенные структуры ривароксабан-InhA (2NV6) и изоникотиноил-NADH-InhA (2NV6). Красным цветом выделен ривароксабан, желтым — изоникотиноил-NADH (по данным PyMOL)

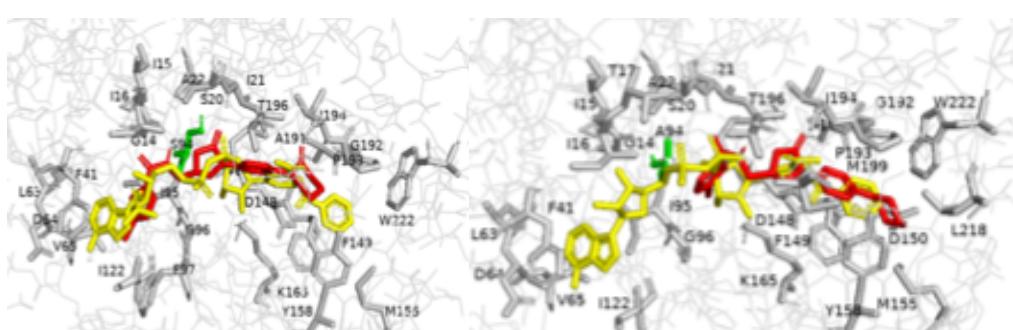


Рисунок 4 – Аминокислотное окружение (в пределах 4 Å, по данным PyMOL) ривароксабан и изоникотиноил-NADH: слева – в комплексе с InhA «дикого» типа (Id 2PR2), справа – в комплексе с мутантным вариантом InhA (Id 2NV6). Красным цветом выделен ривароксабан, желтым – изоникотиноил-NADH

Для уточнения механизма связывания ривароксабана с InhA был проведен сравнительный анализ аминокислотного окружения и типов взаимодействий с протеином всех изученных в данной работе лигандов (рисунок 4, таблица 1). Обращает на себя внимание то, что все исследованные комплексы стабилизированы за счет водородных связей с I21.

Для всех комплексов, кроме комплекса ривароксабана с мутантной формой протеина, характерны гидрофобные взаимодействия с I21 и G96. Интересно отметить, что взаимодействие с I194 и F149 характерно для всех комплексов,

кроме комплекса ривароксабана с нативной формой. Только комплекс изоникотиноил-NADH с мутантной формой белка имеет прочные водородные связи с G14 и S20. Можно предположить, что взаимодействие с данными аминокислотными остатками является одной из причин развития резистентности микобактерий с мутантными ферментами к изониазиду.

В этом контексте отсутствие данного взаимодействия у ривароксабана с мутантной формой протеина является предпосылкой для его потенциальной активности относительно резистентных форм микобактерий.

Таблица 1 – Показатели (по данным PLIP), характеризующие взаимодействия атомов ривароксабана и изоникотиноил-NADH (изониазид) с аминокислотами InhA «дикого» типа (Id 2PR2) и мутантного варианта InhA (Id 2NV6)

АА	Тип взаимодействия	Межатомное расстояние*, Å			
		InhA (Id 2PR2)		InhA (Id 2NV6)	
		Изониазид	Ривароксабан	Изониазид	Ривароксабан
G14	Водородная связь	–	–	1,95–2,74	–
I16	Гидрофобное	–	3,71	–	–
S20	Водородная связь	–	–	2,15–2,75	–
I 21	Гидрофобное Водородная связь	3,85 2,41–3,36	3,26 2,01–3,05	3,85 1,94–2,90	– 1,91–3,00
F41	π -стэкинг	3,84	–	4,18	–
I47	Гидрофобное	–	3,39	–	–
D64	Водородная связь	2,34–3,16	–	2,18–3,06	–
V65	Водородная связь	2,19–3,14	–	2,04–3,00	–
G95	Гидрофобное Водородная связь	–	3,28 –	– 2,61–3,27	– –
G96	Водородная связь	3,07–3,99	2,19–2,74	2,39–3,36	–
M147	Гидрофобное	–	–	–	3,20
F149	Гидрофобное π -стэкинг	3,31 –	– –	3,43 –	3,10 4,75
D150	Водородная связь	–	–	–	2,98–3,62
Y158	Гидрофобное	3,71	–	3,49	3,78
K165	Водородная связь	1,95–2,88	–	2,25–3,06	–
A191	Гидрофобное Водородная связь	3,95 –	– –	3,85 –	– 2,75–3,28
I194	Водородная связь	1,85–2,76	–	2,54–3,32	2,06–2,95
T196	Гидрофобное	–	3,48	–	–

Примечание: * Для водородной связи расстояние – атом-Н – атом-донор электронов.

Заключение. Результаты исследования подтверждают гипотезу о реализации механизма антибактериального действия ривароксабана через ингибирование синтеза миколовых кислот. С учетом проведенных ранее исследований можно предполагать возможность реализации ингибирования роста микобактериальных клеток на различных этапах биосинтеза жирных кислот с участием InhA. Ривароксабан, как и пиридомицин, топологически «покрывает» пространство

комплекса изоникотиноил-NADH в центре связывания. Поэтому можно предположить, что Ривароксабан тоже является конкурентным ингибитором InhA, для которого аминокислотные замены, приводящие к повышению конформационной лабильности мутантного фермента, не играют значительной роли.

Следовательно, данные мутантные замены не будут приводить к развитию резистентности к лекарственному средству.

Список цитированных источников

1. Global tuberculosis report 2023 [Electronic resource] / World Health Organization. – Mode of access: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Date access: 10.05.2024.
2. Исследование противотуберкулезной активности ривароксабана *in silico* и *in vitro* / Ф. Ф. Лахвич [и др.] // Докл. Национальной академии наук Беларусь. – 2023. – Т. 67, № 3. – С. 207–213.
3. Лахвіч, Т. Т. Афіннасць Рывараксабану *in silico* да β-кетацылы[ACP] сінтазы I: пошук новага фармакафора / Т. Т. Лахвіч, В. М. Рынейская // Веснік Національнай академії наук Беларусі. Серыя хімічныя науки. – 2023. – Т. 59, № 1. – С. 42–48.
4. Лахвич, Ф. Ф. Валидация модельных мишней группы ацилтрансфераз в поиске новых ингибиторов синтеза миколовых кислот / Ф. Ф. Лахвич, О. Н. Ринейская // Биохимические исследования в медицине : сб. материалов Международной научной конференции. – Минск : БГМУ, 2023. – С. 139–144.
5. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis* inhA resolves the target of isoniazid / C. Vilchère [et al.] // Nature Medicine. – 2006. – Vol. 12(9). – P. 1027–1029.
6. Towards a new tuberculosis drug: Pyridomycin — nature's isoniazid / C. Ruben [et al.] // EMBO Molecular Medicine. – 2012. – Vol. 4(10). – P. 1032–1042.
7. Pyridomycin bridges the NADH- and substrate-binding pockets of the enoyl reductase InhA / R. Hartkoorn [et al.] // Nat Chem Biol. – 2014. – Vol. 10. – P. 96–98.

Comparative analysis of the binding site topology of rivaroxaban and isonicotinoyl-NADH complexes with mycobacterial NADH-dependent enoyl (ACP) reductase

Lakhvich T. T., Ryneiskaya O. N.,
Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Comparative analysis of the binding topology for Rivaroxaban and Isonicotinoyl-NADH to mycobacterial NADH-dependent enoyl (ACP) reductase has been carried out. The results are consistent with the mechanism of antibacterial action through inhibition of mycolic acid synthesis at the fatty acid elongation stage of the FAS-II pathway. Rivaroxaban topologically fills the space of the isonicotinoyl-NADH complex at the binding site; the binding energy being -9.25 KJ/mol and -10.29 KJ/mol for the native and mutant forms of the protein, respectively. This confirms a hypothesis that Rivaroxaban may be a competitive inhibitor of enoyl (ACP) reductase. In such a case amino acid replacements leading to the increases of the conformational velocity of the mutant enzyme do not play a significant role. Therefore, the development of drug resistance may be avoided.

Keywords: binding topology for Rivaroxaban and NADH- dependent enoyl (ACP) reductase, molecular docking, affinity, Rivaroxaban, isonicotinoyl-NADH.

Поступила 05.06.2024



УДК 577.322.53

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО МЕТОДА КОНСТРУИРОВАНИЯ ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ НА ПРИМЕРЕ ИЗОФОРМЫ P00749-2 УРОКИНАЗЫ

Ринейская О. Н., Байроченко Д. С.

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

Реферат. Урокиназа существует в виде нескольких изоформ, но только для одной из них установлена кристаллографическая структура, информацию о которой можно получить в Protein Data Bank. Поэтому актуальным является моделирование пространственной структуры белков *in silico*, для которых пока не определена третичная структура при помощи физических методов исследования. В настоящей работе проведено сравнение качества 3D-моделей изоформы урокиназы P00749-2, полученных с использованием MODELLER, Phyre2, Robetta и SWISS-MODEL. Установлено, что использование сервиса SWISS-MODEL является наиболее оптимальным для прогнозирования третичной структуры изоформ урокиназы.

Ключевые слова: гомологичное моделирование, урокиназа, SWISS-MODEL, Robetta, Phyre2, MODELLER.

Введение. Все более важную роль в науке играют исследования *in silico*, представляющие собой изучение биологически важных процессов и структур с использованием специализированных программ. Применение методов *in silico* позволяет делать прогнозы и при этом экономить человеческие и денежные ресурсы при проведении начальных этапов научных исследований. Но, безусловно, выдвинутые гипотезы требуют валидации в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Последние четыре десятилетия внимание исследователей в области биологии и медицины сфокусировано на получении структур молекул методами рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии. Каждый год международные библиотеки и базы данных пополняются новыми кристаллографическими структурами. Так, только в 2023 году в базу данных Protein Data Bank (PDB) было добавлено 12 057 новых структур. Эти биологические молекулы могут быть потенциальными мишениями для разработки таргетной терапии заболеваний растений и животных или же ключом к пониманию фундаментальных процессов в биологии и медицине. Однако, несмотря на столь стремительное пополнение баз данных информацией о третичных структурах биомолекул, традиционных методов установления структур, очевидно, недостаточно для удовлетворения имеющегося спроса на эти данные у

научного сообщества. Развитие новых методов позволяет снабдить исследователей более полной информацией о структурах белков и их изомеров, столь необходимой для целостного понимания функционирования человеческого организма и дальнейшего проведения исследований. Из сказанного выше следует, что вопрос о количестве и качестве 3D-структур биомолекул стоит достаточно остро. Решением этой задачи явилась разработка ряда методов, позволяющих предсказывать третичную структуру белковых молекул *in silico*. Данные методы могут использоваться не только для предсказания пространственного строения отдельных белков, но и для конструирования их изоформ, что может быть полезно при разработке высокоаффинных ингибиторов белков-мишеней [1], а также в контексте комплексного изучения *in silico* эффективности действия потенциальных лекарственных средств.

Урокиназный активатор плазминогена (урокиназа) — это внеклеточная сериновая протеаза, состоящая из 411 аминокислотных остатков, кодируемая геном PLAU (находится в длинном плече 10-й хромосомы человека). Данный фермент участвует в фибринолизе посредством активации плазминогена, способен подвергать гидролизу некоторые компоненты внеклеточного матрикса. Он также активирует внеклеточные цинксодержащие эндопептидазы,

представителей семейства матриксных металло-протеиназ, ответственных за ремоделирование и деградацию внеклеточного матрикса, регуляцию пролиферации, миграции и дифференциации клеток, могут играть важную роль в ангиогенезе, регуляции апоптоза и восстановления тканей [2].

Экспрессия гена PLAU может быть индуцирована различными типами факторов роста, гормонами, цитокинами, а также морфологическими изменениями тканей. В опухолевых клетках экспрессия усиливается в несколько раз, что ведет к повышению активности урокиназы. Это вызывает усиление процессов разрушения внеклеточного матрикса и ведет к нарушению межклеточных адгезионных контактов, что, в свою очередь, может способствовать прогрессированию опухолей и метастазированию [3].

Урокиназа является потенциальной мишенью для противоопухолевой терапии. В настоящее время на разных этапах клинических испытаний находятся несколько лекарственных препаратов [4], которые способны ингибировать ферментативную активность урокиназы путем связывания с ее активным центром, таким образом значительно сдерживая метастазирование и дальнейшее прогрессирование опухолей.

Урокиназа существует в виде нескольких изоформ, но только для одной из них установлена кристаллографическая структура, информацию о которой можно получить в PDB [<https://www.rcsb.org>]. При разработке ингибиторов фермента *in silico* желательно проводить анализ эффективности действия предложенных лигандов в отношении всех изоформ. Решению подобной задачи служит предсказание пространственных структур изоферментов урокиназы, необходимых для последующего анализа эффективности связывания в области активного центра ингибиторов, например Нафамостата и ряда его производных.

Цель работы – сравнение качества третичных структур изоформы урокиназы P00749-2, полученных путем моделирования *in silico* с использованием ряда онлайн-сервисов и программ.

Материалы и методы. Поиск аминокислотных последовательностей изоформ урокиназы осуществлялся в ресурсе UniProt [<https://www.uniprot.org>], содержащем данные о последовательностях белков и аннотации к ним. Были найдены два варианта фермента, обозначенные как P00749-1 и P00749-2. Вариант P00749-1 имеет длину 431 аминокислотного остатка и массу около 48,5 кДа, является каноничным, для него ранее была предсказана *in silico* трехмерная структура, которую можно найти в

базе данных AlphaFold [<https://alphafold.ebi.ac.uk>]; пространственное строение его также установлено методами рентгеноструктурного анализа (PDB ID 7vm4). Вариант P00749-2 (изоформа 2) образуется в результате альтернативного сплайсинга, имеет длину 414 аминокислотных остатков и массу около 46,9 кДа. Именно изоформа 2 была выбрана для предсказания третичной структуры, так как информация о ее третичной структуре не представлена в PDB. Для построения пространственных моделей протеина использовался ряд специализированных программ. SWISS-MODEL [5] представляет собой онлайн-сервис, предназначенный для гомологичного моделирования белковых молекул. Построение моделей происходит в несколько этапов: определение структурных референсов, выравнивание интересующей последовательности и референсных последовательностей, построение модели и оценка ее качества. SWISS-MODEL обеспечивает интегрированную работу программного обеспечения и актуальных баз данных, содержащих последовательности и третичные структуры белков, что необходимо для корректной работы сервиса. Показатель GMQE (Global Model Quality Estimate — глобальная оценка качества модели) характеризует основные геометрические аспекты белковой структуры.

Robetta — сервер прогнозирования конфигураций белковых структур, в основе которого лежит программный пакет Rosetta для моделирования на макромолекулярном уровне. Основной функционал Robetta сводится к предсказанию трехмерной структуры белка на основе его аминокислотной последовательности. Предсказание структуры осуществляется методом гомологического моделирования или моделирования *ab initio* — в зависимости от выбранных опций. В данном случае построение образцов осуществляется с использованием протокола RoseTTAFold, представляющего собой нейронную сеть, которая одновременно оценивает паттерны белковых последовательностей, взаимодействие между аминокислотами и оценивает потенциальную 3D-структуру белка [6].

Phyre2 представляет собой комбинацию нескольких программных компонентов [7], которые обеспечивают гомологичное моделирование на основе одной или нескольких референсных последовательностей и при их отсутствии моделирование *ab initio*. Это позволяет воссоздать 3D-структуру с использованием полной аминокислотной последовательности, учитывая стереохимические взаимодействия между остатками моделируемого участка, включая длину связей,

торсионные углы, вандерваальсовы и электростатические взаимодействия. Сервис автоматически подбирает референсные структуры, обеспечивая максимальную достоверность, идентичность, охват интересующей последовательности и создает только одну модель.

MODELLER – программа для гомологичного и сравнительного моделирования трехмерной структуры белка с учетом пространственных ограничений [8]. Метод основан на выравнивании входной последовательности, подлежащей моделированию, и референсной аминокислотной последовательности («шаблонным белком», структура которого ранее была установлена). С целью повышения точности моделирования действуется алгоритм, позволяющий использовать несколько последовательностей в качестве референсных (multi-template homology modelling).

Первоначальная оценка качества трехмерных моделей урокиназы P00749-2, предложенных каждой из программ с целью выбора наиболее успешного варианта для последующего сравнительно анализа, производилась посредством предлагаемых каждой программой инструментов и параметров. Для выявления наиболее подходящего сервиса трехмерного моделирования протеина было отобрано по одной модели, полученной при помощи каждого из описанных сервисов. Для последующего сравнительного анализа качества 3D-структур использовались программы SAVES v6.0 и Инструмент Structure Assessment.

Сервис SAVES v6.0 при помощи алгоритма *ERRAT* позволяет анализировать белковые структуры на предмет наличия несвязанных остатков в пределах 3,5 Å между различными атомами, рассчитывая общий коэффициент качества (для высококачественной модели значение должно превышать 50). Программа *VERIFY3D* сопоставляет трехмерную структуру с аминокислотной последовательностью, проводя сравнение качества исследуемой молекулы с белковыми структурами с высоким разрешением из базы данных. *PROCHECK* обеспечивает анализ общей геометрии и оценку стереохимического качества прогнозируемой модели, строит карту Рамачандрана с разрешением 2,0 Å.

Инструмент Structure Assessment рассчитывает ряд показателей, позволяющих оценить качество подготовленной структуры. При расчете значения «Сβ» анализируются только попарные взаимодействия между позициями β-углеродных атомов аминокислот. Показатель «All Atom» учитывает потенциал взаимодействия между всеми атомами, при котором оцениваются попарные

взаимодействия между ними. «Solvation» показывает, насколько соответствует доступность аминокислотного остатка построенной модели растворителю, его ожидаемому значению. «Torsion» оценивает соответствие каждого трех последовательно расположенных аминокислот модели пространственным ограничениям, задаваемым двугранными углами ψ и ϕ . QMEAN и QMEAN-DisCo – это оценочные функции, которые позволяют получать как глобальные (для всей структуры), так и локальные (для каждого остатка) абсолютные оценки качества на основе одной модели. Основным отличием QMEANDisCo от QMEAN является возможность прогнозировать согласованность парных расстояний α-углеродных атомов на основе модели с пространственными ограничениями (DisCo – distance constraints), полученной из гомологичных структур. Все оценки объединяются с использованием нейронной сети. Перечисленные показатели формируются на основании сравнения анализируемой модели и экспериментально определенных структур аналогичного размера. Структуры, получившие значения близкие к нулю по каждому из вышеизложенных параметров, считаются нативными. Неудовлетворительными считаются значения, соответствующие диапазону от -4 и ниже. Сервис также позволяет построить карту Рамачандрана с разрешением 2,5 Å.

Результаты и их обсуждение. Моделирование изоформы 2 урокиназы при помощи SWISS-MODEL проводилось в автоматическом режиме. Из представленного отчета на основании значения параметра GMQE были отобраны 5 структур, характеристики которых представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристики выбранных референсных структур в SWISS-MODEL

№	Условное обозначение	GM QE	Идентичность последовательности, %	Метод
1	A0A2K5 ED89	0,84	89,08	AlphaFold v2
2	2vnt.3	0,61	99,64	X-ray 2,20Å
3	2vnt.2	0,59	99,63	X-ray 2,20Å
4	4nzq.1	0,58	28,35	X-ray 2,81Å
5	6a8g.2	0,50	69,92	X-ray 2,53Å

На основании этих референсных структур были построены модели изоформы 2 урокиназы (рисунок 1). Очевидным недостатком данного сервиса является тот факт, что построение 3D-структур зависит от идентичности последовательностей и длины, которой обладают выбранные ранее референсные структуры, в связи с чем возможна ситуация визуализации с использованием неполной последовательности белка, что и произошло в нашем случае.

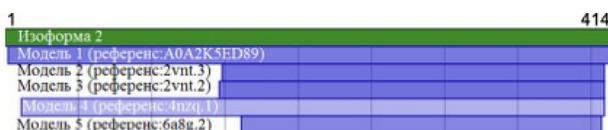


Рисунок 1 – Результаты гомологичного моделирования изоформы 2 урокиназы при помощи SWISS-MODEL. Номера 1–414 соответствуют аминокислотным остаткам

Таким образом, модель 1 покрывает аминокислотные остатки 3–414, являясь лидером среди полученных моделей по данному показателю. Значение GMQE распределяются по моделям 1–5 следующим образом: 0,84; 0,61; 0,59; 0,58; 0,50 соответственно. По сравнению с остальными вариантами модель 1 обладает наиболее высоким значением GMQE, что позволяет предполагать большую правдоподобность построенной модели по сравнению с остальными. В связи с этим именно модель 1 (изображена на рисунке 2) была отобрана для дальнейшего сравнительного анализа.

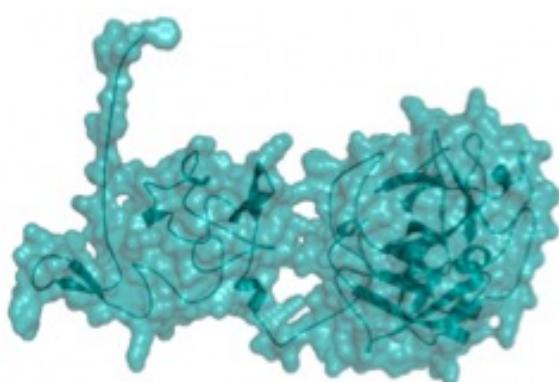


Рисунок 2 – Модель 1 изоформы 2 урокиназы, полученная с помощью SWISS-MODEL

Алгоритмами сервиса Robetta было предложено 5 потенциальных моделей. Сервер предоставляет данные о возможной погрешности (отклонении от координат данной аминокислоты по

сравнению с гомологичной последовательностью) в ангстремах для каждого остатка всех 5 моделей, на основании значения которой можно судить о качестве сконструированных структур (рисунок 3).

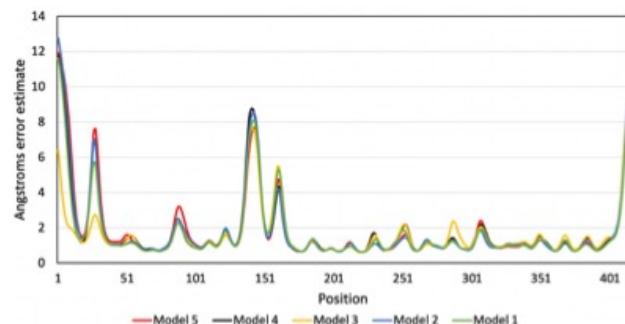


Рисунок 3 – Оценка погрешности (\AA) для каждого аминокислотного остатка (1–414) моделей изоформы 2 урокиназы

Из приведенных данных видно, что модель 3 имеет наименьшие показатели погрешности, что свидетельствует о более высокой точности построения модели. Среднее значение погрешности для нее (1,58 Å) можно считать приемлемым, в связи с чем именно данная модель была отобрана для последующего анализа. В программе Phyre2 нами использовался интенсивный режим (Intensive mode), поскольку он позволяет одновременно использовать несколько последовательностей (в данном случае 4 аминокислотные последовательности сравнения). Онлайн-сервис предоставил карту достоверности, описывающую качество различных участков сконструированной модели (рисунок 4): 17 аминокислотных остатков были смоделированы ab initio (обладают низкой степенью достоверности, на рисунке 4 обозначены синим); 96 % Остатков смоделированы с достоверностью более 90 %, значит, качество модели можно считать достаточным для принятия варианта для дальнейшего сравнения.



Рисунок 4 – Оценка качества участков сконструированной модели изоформы 2 урокиназы (Phyre 2). Смещение в красную область означает высокое качество, в синюю – низкое

Несмотря на то, что программа MODELER предоставляет алгоритмы выравнивания

последовательностей, для поиска потенциальных шаблонных белков была использована программа BLAST (алгоритм blastp), которая осуществляет поиск среди большего количества последовательностей (было установлено значение 5000), давая более точные результаты. Из предоставленного списка было отобрано 6 шаблонных последовательностей на основании следующих параметров: значение E (отражает вероятность случайного совпадения последовательностей при выравнивании, не обусловленного истинной биологической взаимосвязью между последовательностями, в том числе общим эволюционным происхождением) для всех структур равно 0, что говорит о высокой схожести последовательностей по отношению к изоформе 2; процент покрытия (для всех выбранных равен 97) и идентичности последовательностей (характеристика последовательностей представлена в таблице 2).

Таблица 2 – Характеристика референсных последовательностей, использованных для моделирования в программе MODELLER

№	Условное обозначение	Длина, аминокислот	Иден-тичность последовательности, %	Биологи-ческий вид
1	P00749.3	431	99,75	Homo sapiens
2	QRF29.1	431	97,52	Pongo abelii
3	P16227.1	433	92,61	Papio cynocephalus
4	Q8MHY7.1	433	83,70	Oryctolagus cuniculus
5	P04185.1	442	79,81	Sus scrofa
6	Q05589.1	433	75,50	Bos taurus

Таблица 3 – Количественные характеристики моделей изоформы 2 урокиназы, полученные при помощи различных сервисов (Structure Assessment)

Показатели	SWISS-MODEL	Robetta	Phyre2	MODELLER
Карта Рамачандрана, основной регион, %	95,85	92,96	89,32	87,38
Карта Рамачандрана, запрещенный регион, %	0,49	1,46	4,13	5,10
Карта Рамачандрана, другие регионы, %	3,66	5,58	6,55	7,52
QMEANDisCo	0,77	0,70	0,64	0,48
QMEAN	-0,02	-0,49	-4,94	-7,00

Было сконструировано 5 моделей. Для первичной оценки их качества использовался параметр DOPE — discrete optimized protein energy (дискретная оптимизированная энергия белка). DOPE — потенциал, зависящий от межатомного расстояния. Значения DOPE (округлены до целых) всей белковой молекулы предсказанных структур были следующими: -29323; -29440; -28987; -28585; -29077 для моделей 1–5 соответственно. Модель 2 была выбрана в связи с тем, что она имела лучший (наименьший) показатель DOPE. Значение DOPE для каждого аминокислотного остатка предпочтительной модели продемонстрировано на рисунке 5.

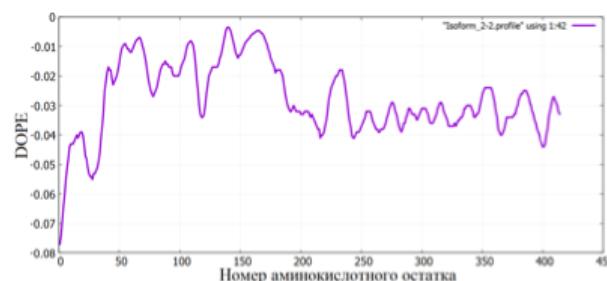


Рисунок 5 – Значение DOPE каждого аминокислотного остатка для модели 2 изоформы 2 урокиназы, полученной с помощью MODELLER

Для сравнительного анализа лучших моделей, предложенных каждым из 4 сервисов, был использован онлайн-сервис Structure Assessment.

При построении карты Рамачандрана лучшие результаты (наибольшее количество остатков в разрешенных регионах и наименьшее — в запрещенных) соответствовали модели, сконструированной в SWISS-MODEL. По значениям QMEANDisCo и QMEAN данная модель также занимает лидирующую позицию. Эта модель уступает лишь по показателям Cβ, Solvation, Torsion модели Robetta (таблица 3).

Окончание табл. 3

C β	0,69	-0,38	-2,94	-5,68
All Atom	-1,87	-2,73	-5,72	-6,89
Solvation	-1,31	-0,99	-3,83	-7,96
Torsion	0,33	-0,04	-3,37	-3,77

На данном этапе сравнения моделей на основании показателей Structure Assessment лучшей следует считать ту, которая получена с помощью SWISS-MODEL. Оценка локального качества, то есть ожидаемое сходство с «шаблонной» структурой (ось ординат) каждого аминокислотного остатка (ось абсцисс) данной модели представлена на рисунке 6. Принято считать, что остаткам, имеющим значение ниже 0,6, присущее низкое качество структуры. На рисунке 6 горизонтальной линией отмечено глобальное значение QMEANDisCo; отклонения для каждого остатка от данного значения в лучшую (обозначено синим цветом) или худшую (обозначено оранжевым цветом) сторону продемонстрированы вертикальными линиями.

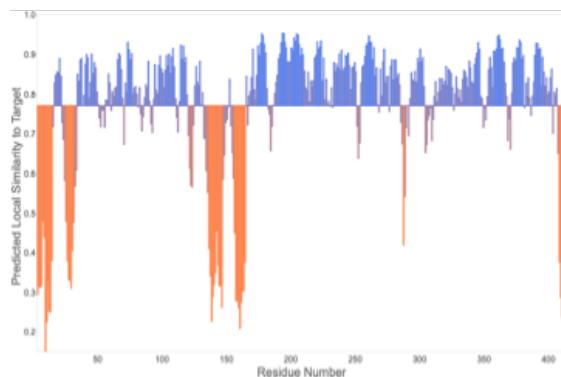


Рисунок 6 – Оценка локального качества аминокислотных остатков модели изоформы 2 урокиназы SWISS-MODEL

Оценка глобального качества SWISS-MODEL модели 3D-структуры изоформы 2 урокиназы была произведена при помощи Инструмента Structure Assessment (рисунок 7).

Совокупность точек — это экспериментальные структуры белка с оценкой QMEAN в пределах 1 стандартного отклонения от среднего значения (Z-балл меньше 1). К данной области относится и анализируемая модель (представлена в виде красного астериска), что говорит о высоком качестве ее структуры. С целью уточнения значений в картах Рамачандрана для каждой из четырех моделей был использован сервис SAVES v6.0. Результаты исследования представлены в таблице 4.

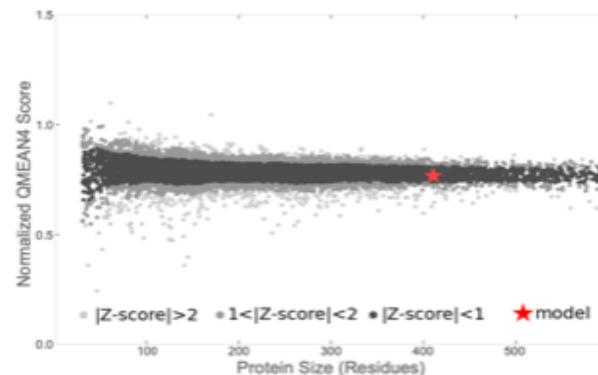


Рисунок 7 – Оценка глобального качества модели SWISS-MODEL изоформы 2 урокиназы

Таблица 4 – Количественные характеристики моделей изоформы 2 урокиназы, полученных при помощи различных сервисов (SAVES v6.0)

Показатели	SWISS-MODEL	Robetta	Phyre2	MODELLER
ERRAT	89,26	90,5	42,47	38,48
VERIFY3D, %	70,63	73,43	76,09	59,66
Карта Рамачандрана, основной регион, %	89,3	82,6	78,9	79,8
Карта Рамачандрана, разрешенный регион, %	10,5	15,2	16,6	16,6
Карта Рамачандрана, в целом разрешенный регион, %	0,3	1,7	2,8	2,2
Карта Рамачандрана, запрещенный регион, %	0,0	0,6	1,7	1,4

При этом лучшим значением по показателю наличия несвязанных остатков в пределах 3,5 Å между различными атомами (ERRAT) обладает модель Robetta; по значению VERIFY3D (на основании сравнения с белковой структурой с высоким разрешением) — образец Phyre 2. В то же время по вышеперечисленным показателям модель из SWISS-MODEL занимает только второе и третье места соответственно. Однако по

всем параметрам карты Рамачандрана образец из SWISS-MODEL обладает лучшими показателями. Более того, данная модель не имеет остатков, расположенных в запрещенном регионе карты, что является весомым показателем, говорящим в пользу высокой степени качества структуры. Карта Рамачандрана для модели SWISS-MODEL представлена на рисунке 8.

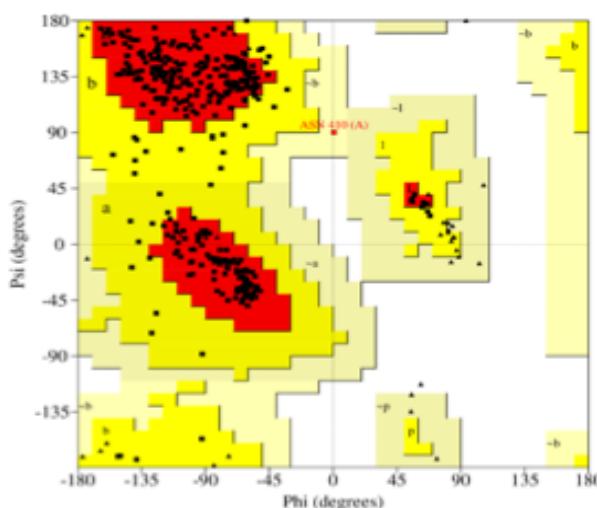


Рисунок 8 – Карта Рамачандрана для модели SWISS-MODEL изоформы 2 урокиназы

Заключение. Таким образом, был построен ряд трехмерных моделей изоформы 2 урокиназы с использованием четырех сервисов. Из результатов, предоставленных каждой программой, было отобрано по одной лучшей модели для сравнительного анализа. На основании 15 проанализированных характеристик, полученных с использованием Structure Assessment и SAVES v6.0,

наилучшими результатами обладает модель SWISS-MODEL, лидируя по 10 величинам и значительно опережая по показателям иные третичные структуры.

В результате проделанной работы для конструирования третичной структуры данной и иных изоформ урокиназы рекомендуется использование сервиса SWISS-MODEL.

Список цитированных источников

1. Modelling three-dimensional protein structures for applications in drug design / T. Schmidt [et al.] // Drug discovery today. – 2014. – Vol. 19, № 7. – P. 890–897.
2. Wang, X. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease / X. Wang, R. A. Khalil // Advances in pharmacology (San Diego, Calif.). – 2018. – Vol. 81. – P. 241–330.
3. Madunić, J. The Urokinase Plasminogen Activator System in Human Cancers: An Overview of Its Prognostic and Predictive Role / J. Madunić // Thromb Haemost. – 2018. – Vol. 118, № 12. – P. 2020–2036.
4. Therapeutic Strategies Targeting Urokinase and Its Receptor in Cancer / M. T. Masucci [et al.] // Cancers. – 2022. – Vol. 14, № 3. – P. 498.
5. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes / A. Waterhouse [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2018. – Vol. 46, № W1. – P. W296–W303.
6. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network / M. Baek [et al.] // Science. – 2021. – Vol. 373, № 6557. – P. 871–876.
7. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis / L. A. Kelley [et al.] // Nat Protoc. – 2015. – Vol. 10, № 6. – P. 845–858.
8. Webb, B. Protein Structure Modeling with MODELLER / B. Webb, A. Sali // Methods Mol Biol. – 2021. – Vol. 2199. – P. 239–255.

Selection of an optimal method for construction of the tertiary structure of proteins using the example of urokinase isoform P00749-2

Ryneiskaya O. N., Bairachenka D. S.
Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Urokinase exists in the form of several isoforms, but only one of them has a crystallographic structure, information about which can be obtained in the Protein data bank. Therefore, it is relevant to model the spatial structure of proteins in silico, for which the tertiary structure has not yet been determined using physical research methods. This work compares the quality of 3D models of urokinase isoform P00749-2, obtained using MODELLER, Phyre2, Robetta and SWISS-MODEL. It was revealed that the use of the SWISS-MODEL service is the most optimal for predicting the tertiary structure of urokinase isoforms.

Keywords: homologous modelling, urokinase, SWISS-MODEL, Robetta, Phyre2, MODELLER.

Поступила 05.06.2024

УДК 615.451.35:582.99.15:543.544:547.262

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭТАНОЛА В КОМБИНИРОВАННОМ СПРЕЕ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

¹Сушинская О. А., ²Феськова Е. В., ¹Голяк Н. С.

¹ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;

² Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. В статье представлены результаты разработки и валидации методики количественного определения этанола в комбинированном спрее, содержащем ибuproфен и жидкий экстракт полыни горькой, методом газожидкостной хроматографии. Оптимальные условия хроматографирования были подобраны для колонки DB-FFAP (60 м × 0,53 мм × 1,0 мкм) фирмы Agilent Technologies. Валидацию методики проводили в соответствии с фармакопейными требованиями и Руководством по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств Евразийского экономического союза. По результатам количественного определения среднее содержание этанола в комбинированном спрее 3 серий составило (49,9±0,1) %. Доказана специфичность и линейность методики. Предложенная методика является точной и прецизионной в пределах диапазона применения. Все исследуемые валидационные критерии соответствовали критериям приемлемости. Полученные результаты позволяют рассматривать предложенную методику для количественного определения этанола в комбинированном спрее наружного применения.

Ключевые слова: полынь горькая, жидкий экстракт, спрей, газовая хроматография, этанол, валидация.

Введение. В ходе фармацевтической разработки лекарственного препарата обязательным этапом является проведение его стандартизации. Для стандартизации жидких лекарственных форм

наружного применения основными показателями качества являются описание, идентификация, количественное определение действующих веществ, pH, относительная плотность, а также

определение содержания органических растворителей при их использовании, например этанола (класс токсичности 3).

В соответствии с фармакопейными требованиями для определения этанола в жидких лекарственных препаратах рекомендован метод дистилляции и газовой хроматографии.

Наиболее точным, быстрым и чувствительным методом является газовая хроматография [1, 2].

Цель работы – разработка и валидация методики количественного определения этанола в комбинированном спрее методом газовой хроматографии.

Работа выполнена в рамках задания 2.2.3 «Получить и стандартизировать экстракционные лекарственные формы с повышенным содержанием биологически активных веществ» подпрограммы 2.2 «Синтез и направленное модификация регуляторов биопроцессов (Биорегуляторы)» государственной программы научных

исследований 2 «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия» (№ ГР 20220401).

Материалы и методы. Объектом исследования являлся комбинированный спрей для наружного применения противоспалительного действия, содержащий ибупрофен и жидкий экстракт полыни горькой 1 : 1. В качестве растворителя для субстанции ибупрофена использован этанол 96 % (ОАО «Бобруйский завод биотехнологий», марка «Экстра М», ТУ BY 700068910.014-2005). Жидкий экстракт полыни горькой получен с использованием 70%-ного этанола в качестве экстрагента. В качестве вспомогательных веществ в состав спрея также входили макрогол 400, поливинилпиролидон и вода очищенная. Для проведения анализа использовали бутанол-1 (АО «Экос-1», РФ), метанол (Carlo Erba, Франция) и пропанол-1 (PanReac Applichem, Германия). Основные условия хроматографирования приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Условия проведения хроматографирования

Параметр	Значение
Хроматограф	«Agilent 7820 A» (Agilent Technologies, США)
Колонка	Капиллярная колонка DB-FFAP размером 60 м × 0,53 мм с толщиной неподвижной фазы 1,0 мкм (полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерефталевой кислотой)
Детектор	Пламенно-ионизационный
Газ-носитель и его скорость	Гелий для хроматографии; 4,1 мл/мин
Сброс	20 : 1
Температура испарителя/температура детектора/температура термостата колонки	180 °C / 230 °C/ начальная 60 °C (выдержка 1 минута), подъем температуры со скоростью 4 °C/мин до 105 °C (выдержка 2 минуты)
Объем вводимой пробы	0,4 мкл
Время хроматографирования	14,25 минут; порядок выхода компонентов: метанол, этанол, пропанол-1

Приготовление растворов.

Для приготовления раствора внутреннего стандарта (ВС) 1,0 мл пропанола-1 помещали в колбу на 100,0 мл и доводили до метки *водой Р*. Для приготовления испытуемого раствора объем аликвоты спрея рассчитывали исходя из того, что необходимо взять такой объем образца, в котором содержалось бы около 1,0 г этанола.

Для спрея объем аликвоты составил 2,2 мл. Аликвоту в 2,2 мл помещали в колбу на 50,0 мл и доводили до метки *водой Р*, затем к 1,0 мл полученного раствора прибавляли 1,0 мл раствора ВС и доводили *водой Р* до объема 25,0 мл.

Приготовление растворов сравнения представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Приготовление растворов сравнения а–f

Раствор сравнения	Приготовление
<i>a</i>	1,0 мл этанола доводили <i>водой Р</i> до объема 50,0 мл
<i>b</i>	1,0 мл метанола доводили <i>водой Р</i> до объема 100,0 мл и к 1,0 мл полученного раствора добавляли <i>воду Р</i> до объема 25,0 мл
<i>c</i>	Смешивали 1,0 мл раствора ВС и 1,0 мл раствора сравнения <i>a</i> , 2,0 мл раствора сравнения <i>b</i> и доводили <i>водой Р</i> до объема 25,0 мл
<i>d</i>	1,0 мл бутанола доводили <i>водой Р</i> до объема 50,0 мл
<i>e</i>	Смешивали 1,0 мл раствора ВС, 1,0 мл раствора сравнения <i>d</i> , 2,0 мл раствора сравнения <i>b</i> и доводили <i>водой Р</i> до объема 25,0 мл
<i>f</i>	Смешивали равные объемы растворов сравнения <i>c</i> и <i>e</i>

Пригодность хроматографической системы рассчитывали по раствору сравнения *c*.

Система считалась пригодной, если эффективность хроматографической колонки составляла не менее 10 000 теоретических тарелок (расчетная по пику этанола и пропанола-1), а разрешение между пиками метанола и этанола было не менее 4,5.

Содержание этанола (в процентах (об/об)) рассчитывали по формуле:

$$\frac{A_1 \times l_2 \times p}{A_2 \times l_1 \times V_1}$$

где: A_1 — площадь пика этанола испытуемого раствора; A_2 — площадь пика этанола для раствора сравнения *c*; l_1 — площадь пика ВС испытуемого раствора; l_2 — площадь пика ВС для раствора сравнения *c*; V_1 — объем испытуемого образца в испытуемом растворе, мл; p — содержание % (об/об) этанола в этаноле *P1*.

Валидационные испытания проводили в соответствии с требованиями Фармакопеи РБ и ЕАЭС, а также Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств ЕАЭС по основным валидационным критериям [3, 4]. Определение специфичности проводили путем хроматографирования испытуемого раствора, раствора плацебо (в котором этанол заменен на бутанол) и растворов сравнения *d*–*f*. Линейность подтверждалась на 5 уровнях концентраций этанола (от 70 до 130 % от теоретического содержания этанола).

Оценку правильности методики оценивали путем добавления к образцу спрея 96%-ного этанола в количестве 25, 50, и 75 % от исходного объема образца. Сходимость проверяли в 6 проявностях на одном образце спрея. Определение

внутрилабораторной воспроизводимости проводилось на 3 параллельных образцах спрея в 3 проявностях в разные дни. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета анализа данных Microsoft Excel 2016 и программного обеспечения Statistica 10.0 [5].

Результаты и их обсуждение. На рисунке 1 представлена хроматограмма разделения раствора сравнения *c*, полученная при использовании колонки DB-FFAP, при выбранных условиях хроматографирования.

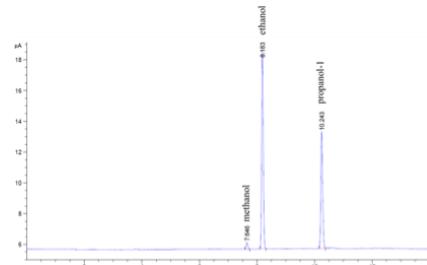


Рисунок 1 – Хроматограмма разделения раствора сравнения *c*, полученная при использовании колонки DB-FFAP (60 м × 0,53 мм × 1,0 мкм)

Результаты оценки специфичности методики представлены на рисунке 2. При сравнении полученных хроматограмм видно, что время удерживания пика этанола на хроматограмме испытуемого раствора соответствует времени удерживания пика этанола на хроматограмме раствора сравнения. На хроматограмме раствора плацебо пика этанола не обнаружено. Следовательно, аналитическая методика специфична и может быть использована для количественного определения этанола в комбинированном спрее. Результаты оценки линейности методики представлены на рисунке 3.

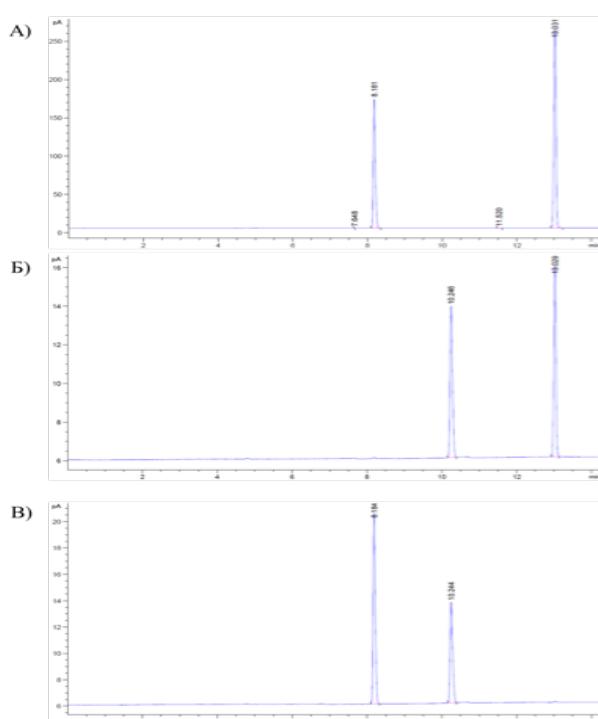


Рисунок 2 – Хроматограммы раствора сравнения (а), раствора

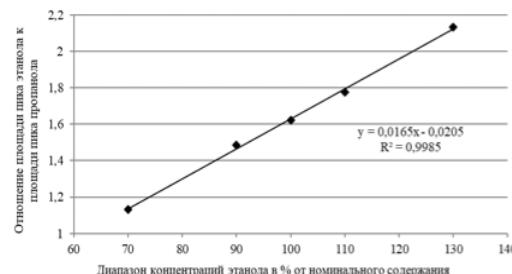


Рисунок 3 – График линейности аналитической методики определения этанола в комбинированном спрее

Значение коэффициента детерминации для отношения площади этанола к площади ВС составило 0,9985, значение коэффициента корреляции – 0,9992 соответственно.

Полученные данные удовлетворяют нормируемому критерию в 0,9950.

Диапазон применения методики количественного определения этанола в комбинированном спрее в области от 70 до 130 % удовлетворяет валидационным требованиям [3, 4].

Данные испытаний повторяемости методики представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты испытания повторяемости методики

№ испытания	1	2	3	4	5	6
Содержание % (об/об) этанола в спрее	49,4	49,5	49,5	49,3	49,3	49,3
Метрологические характеристики						
f	\bar{x}	S	S_r	S^2	P, %	t (P, f)
5	49,4	0,10	0,002	0,01	95	2,570
						Δx
						0,11
						$\epsilon, \%$
						0,22

Относительное стандартное отклонение (RSD) для 6 измерений составило 0,2 %, что составляет не более 2 % [3–5].

Результаты испытания промежуточной прецизионности методики представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты испытания промежуточной прецизионности методики

День 1 / Аналитик 1		День 2 / Аналитик 2	
1	49,0	1	48,1
2	48,8	2	48,1
3	48,8	3	48,2
4	48,6	4	48,2
5	48,5	5	48,1
6	48,5	6	48,0
7	49,3	7	49,6
8	49,4	8	49,7
9	49,3	9	49,7

Окончание табл. 4

Метрологические характеристики (день 1)								
f	\bar{x}	S	S_r	S^2	P, %	t (P, f)	Δx	$\epsilon, \%$
8	48,9	0,36	0,007	0,13	95	2,306	0,28	0,57
Метрологические характеристики (день 2)								
f	\bar{x}	S	S_r	S^2	P, %	t (P, f)	Δx	$\epsilon, \%$
8	48,6	0,78	0,016	0,61	95	2,306	0,60	1,23

Как видно из табличных значений, полученные данные относительного стандартного отклонения составили 0,7 и 1,6 % соответственно и не превышали 2 %.

Рассчитанное значение критерия Фишера составило 0,21 (при P=95 %), которое не

превышало фармакопейное критическое значение критерия Фишера ($F_k=3,44$ при P=95 %) [1, 3–5].

Результаты испытания правильности методики для испытуемого раствора представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты испытания правильности методики

Содержание этанола в спрее, % (об/об)	Добавление этанола, %	Ожидаемое содержание % (об/об) этанола	Полученное содержание % (об/об) этанола	Абсолютная ошибка, %	Открываемость методики, %			
49,4	+25 %							
	1	58,7	58,8	0,1	100,2			
	2	58,7	58,8	0,1	100,2			
	3	58,7	58,7	0,0	100,0			
	+50 %							
	1	64,9	65,4	0,5	100,8			
	2	64,9	65,3	0,4	100,6			
	3	64,9	65,3	0,4	100,6			
	+75 %							
	1	69,4	70,5	1,1	101,6			
	2	69,4	70,9	1,5	102,2			
	3	69,4	70,6	1,2	101,7			
Метрологические характеристики								
f	\bar{x}	S	S_r	S^2	P, %	t (P, f)	Δx	$\epsilon, \%$
8	100,9	0,77	0,008	0,60	95	2,306	0,59	0,58

В соответствии с критериями приемлемости открываемость методики должна находиться в пределах (100±3) %. По результатам оценки правильности методики открываемость составила от (100,0±0,8) %, что соответствует критерию [3–5].

По результатам оценки робастности методики изменение условий хроматографирования (скорости потока газа-носителя, начальной температуры термостата) в пределах ±10 % удовлетворяет критериям пригодности

хроматографической системы. RSD, рассчитанное для содержания этанола в комбинированном спрее, полученное в различных хроматографических условиях в пределах ±10 %, не превышает 2 % и составляет 0,75 %; RSD, рассчитанное для отношений площади пика этанола к площади пика пропанола-1, не превышает 1 %; разрешение между пиками метанола и этанола было более 4,5.

Результаты валидации методики количественного определения этанола в комбинированном спрее представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты валидации методики количественного определения этанола в комбинированном спрее

Параметр	Результат	Критерий приемлемости
Специфичность	Соответствует	На хроматограмме испытуемого раствора время удерживания пика этанола должно соответствовать времени удерживания пика этанола на хроматограмме раствора сравнения
Линейность	0,9992	$r \geq 0,9950$
Правильность	(100,9±0,8) %	Процент открываемости (100±3) %
Повторяемость	RSD≤0,2 %	Коэффициент вариации RSD≤2 %
Воспроизводимость	RSD ₁ ≤0,7 %, RSD ₂ ≤1,6 % $F_3=0,21$ ($F_K > F_3$)	Коэффициент вариации RSD≤2% ($F_K \geq F_3$)
Робастность	Соответствует	Число теоретических тарелок не менее 10 000. RSD? рассчитанное для отношений площади пика этанола к площади пика пропанола-1, не более 1 %. RSD среднего значения, рассчитанное для содержания этанола в спрее, не более 2 %. Разрешения между пиками метанола и этанола не менее 4,5

Результаты определения этанола в комбинированном спрее 3 серий по валидированной методике представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Определение этанола в 3 сериях комбинированного спрея

Серия	Содержание этанола в спрее, % (об/об)
1	49,9
2	49,9
3	49,8
Среднее ($x \pm SD$, %)	49,9±0,1

Заключение. Была предложена методика газохроматографического определения содержания этанола в комбинированном спрее, содержащем ибупрофен и жидкий экстракт полыни горькой, с использованием колонки кварцевой капиллярной колонки DB-FFAP размером 60 м ×

0,53 мм, толщиной неподвижной фазы 1,0 мкм. По результатам валидации аналитической методики подтверждена ее специфичность, линейность и робастность, коэффициент корреляции составил 0,9992. Определена правильность методики, открываемость составила (100,9±0,8) %. Доказана прецизионность методики, RSD для результатов количественного определения при оценке повторяемости составило 0,2 %, при оценке промежуточной прецизионности не превышало 2 %.

По результатам количественного определения среднее содержание этанола в комбинированном спрее составило (49,9±0,1) %. Таким образом, проведенные испытания доказали, что предложенная аналитическая методика для количественного определения этанола в комбинированном спрее является специфичной, прецизионной и достоверной и может быть предложена для включения в проект спецификации на разрабатываемый препарат.

Список цитированных источников

- Государственная фармакопея Республики Беларусь : в 2 т. : введ. в действие с 1 янв. 2013 г. приказом М-ва здравоохранения Респ. Беларусь от 25.04.2012 г. № 453. М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении; [под общ. ред. А. А. Шерякова]. – Молодечно: Победа, 2012. – Т. 1: Общие методы контроля качества лекарственных средств. – 1220 с.
- Фармакопея Евразийского экономического союза. – Москва : Евразийская эконом. комис. – 2020. – Т. 1, ч. 1. – 584 с.
- Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств [Электронный ресурс] : решение Коллегии Евразийской эконом. комис., 17 июля 2018 г. № 113. – Режим доступа: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01421237/clcd_20072018_113. – Дата доступа: 30.05.2024.

4. Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний : ТПК 432-2012 (02041). Введ. 01.03.2013. – Минск : Департамент фармацевт. пром-сти М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 2012. – 18 с.

5. Производство лекарственных средств. Применение статистических методов при валидации : ТКП 438-2012 (02041). Введ. 01.03.2013. – Минск : Департамент фармацевт. пром-сти М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 2012. – 32 с.

Quantitative determination of ethanol in a combined spray by gas chromatography

¹*Sushinskaya O. A.*, ²*Feskova E. V.*, ¹*Golyak N. S.*

¹*Educational Establishment “Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus;*

²*Educational Establishment “Belarusian State Technological University”, Minsk, Republic of Belarus*

The article presents the results of the development and validation of a method for the quantitative determination of ethanol in a combined spray containing ibuprofen and liquid extract of wormwood by gas-liquid chromatography. Optimal chromatography conditions were selected for the DB-FFAP column (60 m x 0.53 mm x 1.0 μ m) by Agilent Technologies. The validation of the methodology was carried out in accordance with the pharmacopoeia requirements and the Guidelines for the Validation of analytical Methods for testing Medicines of the Eurasian Economic Union. According to the results of quantitative determination, the average ethanol content in the combined spray of 3 series was $49,9 \pm 0,1\%$. The specificity and linearity of the technique are proved. The proposed technique is accurate and precise within the range of application. All the validation criteria studied met the eligibility criteria. The results obtained allow us to consider the proposed methodology for the quantitative determination of ethanol in a combined spray for external use.

Keywords: wormwood, liquid extract, spray, gas chromatography, ethanol, validation.

Поступила 05.06.2024



**ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ
НАУКА - МЕДИЦИНА**

**FUNDAMENTAL
SCIENCE - MEDICINE**

УДК 612.111+ 612.23

ДЕФОРМИРУЕМОСТЬ И ОКСИГЕНАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПО- И ГИПЕРОКСИИ

Акулич Н. В.^{1,2}, Зинчук В. В.²

¹Республиканский научно-практический центр спорта, г. Минск, Республика Беларусь;

²Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

Реферат. В статье проведен анализ деформируемости и оксигенации эритроцитов при гипоксии/реоксигенации. Деформируемость определяли с использованием проточной цитофлуориметрии, применяя пошаговое снижение давления потока обжимающей жидкости, что позволяло менять воздействие потока на эритроциты. Степень сферацитоза оценивали с использованием эозин-5 малеимида, уровень флуоресценции которого снижается при дефектах цитоскелета эритроцитов, связанных с белком полосы 3 мембран клеток. Спектрофотометрию и исследование оксигенации эритроцитов после сортировки проводили на планшетном спектрофлуориметре, укомплектованном модулем поддержания концентрации газов. Выявлена взаимосвязь между деформируемостью эритроцитов и их сродством к кислороду в условиях гипо- и гипероксии.

Ключевые слова: сферацитоз, эритроциты, гипоксия, гипероксия, проточная цитометрия.

Введение. Способность эритроцитов реагировать на изменение внутренней среды является важнейшим свойством красных кровяных телец. В свою очередь, на эту функцию способны оказывать влияние газотрансмиттеры, например, NO, а реакции гемоглобина с монооксидом азота будут различаться в зависимости от значений парциального напряжения кислорода.

Показано, что образование, депонирование и элиминация NO-производных гемоглобина будут определять кислородтранспортную функцию крови [1]. На уровне микроциркуляторного русла в поддержании гомеостазиса принимают участие и эндотелиальные клетки, которые, как и эритроциты содержат синтазу монооксида азота (eNOS3) и участвуют в выработке монооксида азота.

Ранее было установлено [2], что хранение крови сопровождается ростом внутриклеточного содержания монооксида азота в эритроцитах и изменением оптико-морфометрических параметров красных кровяных телец. На ранних этапах хранения эритроциты содержащие компоненты крови были представлены дискоцитами, на поздних этапах преобладали сферациты при возрастании микроцитов, накапливающих монооксид азота и имеющих сниженный уровень внутриклеточного гемоглобина. Поскольку в крови могут встречаться клетки с различной формой, то можно

предположить, что они имеют и различия в функции, в частности в их сродстве к кислороду.

Поскольку образование NO в эритроцитах зависит от напряжения сдвига, и NOS эритроцитов активируется при деформации эритроцита, вызванной сдвиговым напряжением, то исследование их сродства к кислороду в зависимости от деформируемости эритроцитов позволит уточнить функции красных кровяных телец в сосудах различного диаметра. Кроме того, известно, что сосудистое русло кровеносной системы различается парциальным напряжением кислорода [3].

Цель работы – определение взаимосвязи между деформируемостью эритроцитов и их сродством к кислороду в условиях гипо- и гипероксии.

Материалы и методы. Исследования проводились на базе учреждения здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория» в рамках подпрограммы 4.1 «Экспериментальная медицина» государственной программы научных исследований 4 «Трансляционная медицина».

Каждая доза эритроцитов ($440 \text{ мл} \pm 5\%$, гематокрит $70 - \%$) на протяжение 4 недель хранилась в пластиковом пакете, предварительно заполненном гемоконсервантом PAGGSM (Фрезениус Каби АГ, Германия), в состав которого входят раствор хлорида натрия, аденин, глюкоза, гуанозин и маннитол.

Забор крови добровольцев производился с использованием ЭДТА К2. Кровь была подвергнуты лейкофильтрации при сборе, после чего были получены суспензии эритроцитов в соответствии со стандартными процедурами подготовки. Контролем служила кровь добровольцев до хранения. Всего проведено 14 серий исследований. Исследование одобрено комитетом по этике учреждения здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория».

Определения деформируемости (использовали значения малоуглового рассеяния луча лазера (FSc)) проводили методом проточной цитометрии (цитофлуориметр-сортер FACS ARIA, США). Для этого пробы крови окрашивались monoclonalными антителами к линейному маркеру эритроцитов (гликофорину А, CD 235 а, Beckman Coulter, США), конъюгированному с флуорохромом PerCP/Cyanine 5.5. Настройка цитометра проводилась с использованием частиц CST (Cytometer Setup and Tracking, BD Bioscience, США). Для пробоподготовки использовали фосфатный буфер FACS Flow (BD Bioscience, США). Анализировали в каждой пробе не менее 40000 клеток. При попадании эритроцита в проточную ячейку происходит его деформация, вызванная различиями в скорости жидкостей. Ввод клеток в ячейку осуществляется с меньшим давлением, а рекомендуемое производителем давление составляет 70 Psi при установке сопла 70 мкм. Для оценки деформируемости клеток нами производилось пошаговое снижение давления потока обжимающей жидкости, что позволяло менять воздействие потока на эритроциты. Ниже приведена схема, на которой показаны примеры формирования сигнала от эритроцитов с разной способностью к деформации.

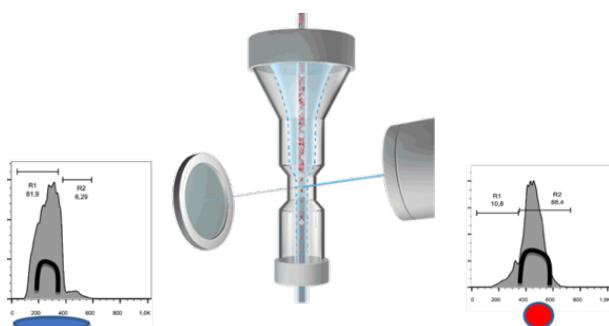


Рисунок 1 – Принципиальная схема определения деформируемости эритроцитов методом проточной цитометрии

После проведения цитометрического анализа проводили сортировку эритроцитов, различающихся по прямому светорассеянию и

деформируемости в отдельные пробирки для последующего анализа спектров поглощения и оценки сфероцитоза.

Настройка отрыва капли проводилась с использованием частиц Accudrop BD (Bioscience, США). В качестве положительного контроля использовались образцы хранящейся крови. Сортировка проводилась в режиме Purity (обеспечивает наибольшую чистоту целевой популяции) в две круглодонные пробирки объемом 5 мл. После сортировки клетки осаждались мягким центрифугированием, отбиралась надсадочная жидкость для получения эритроцитарной суспензии с необходимым гематокритом для последующей инкубации в условиях нормо-, гипо- и гипероксии, создаваемых в перчаточном боксе. Использовали сопло с диаметром 70 мкм, скорость потока и сортировки были минимальными. Чистота выделенных фракций превышала 97 %.

Для спектрофотометрии готовили образцы крови с гематокритом 5 %, разводя цельную кровь физиологическим раствором (Sigma-Aldrich, pH – 7,3) с сывороточным альбумином. Для создания различных значений содержания кислорода в атмосфере (4 и 12 % O₂) использовали перчаточный бокс, подключенный к генератору азота и баллону с углекислым газом (концентрация CO₂ была постоянной и составляла 4,7–5,3 %), в котором проводили исследования *in vitro*. Дополнительно планшетный спектрофлуориметр был укомплектован модулем поддержания концентрации газов (BioTek, Gas Controller), который в режиме реального времени автоматически поддерживал заданные значения газов (O₂ и CO₂).

Оценку степени сфероцитоза проводили с использованием эозин-5 малеимида (Eosin-5-Maleimide, Molecular Probes, (E5-M)), уровень флуоресценции которого снижается при дефектах цитоскелета эритроцитов, связанных с белком полосы 3 мембран клеток [4].

Полученные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием программы для персонального компьютера (JASP 0.18.3, Нидерланды). Полученные значения представлены в виде среднего и среднеквадратического отклонения. Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Достоверность полученных результатов оценивалась с использованием дисперсионного анализа. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента корреляции Спирмена. Схема исследования представлена на рисунке 2.



Рисунок 2 – Схема исследования

Оценку спектров и расчет фракций гемоглобина супензии эритроцитов производили по формулам [5] с уточнениями:

$$[\text{HbO}_2] = 29.8 \times A577 - 9.8 \times A630 - 22.2 \times A560. \quad 1,$$

$$[\text{HHb}] = -1.6 \times A577 + 2.5 \times A630 - 0.33 \times A560. \quad 2,$$

$$[\text{MetHb}] = 0.2 \times A577 - 0.4 \times A630 + 0.33 \times A560. \quad 3,$$

где $[\text{HbO}_2]$, $[\text{HHb}]$ и $[\text{MetHb}]$ – окси-, дезокси- и метгемоглобин, соответственно;

$A577$, $A630$ и $A560$ – значения поглощения при соответствующих длинах волн.

Результаты и их обсуждение. Анализ данных, полученных при помощи проточной цитометрии показал, что эритроциты здоровых добровольцев на всех режимах давления, создаваемого компрессором проточного цитометра (от 0,5 до 5,0 Бар), имеют два пика распределения красных кровяных телец по значению прямого светорассеяния. Левый пик (R1) характерен для клеток (рисунок 1), имеющих максимальные способности к деформации под влиянием напряжения сдвига.

Через 3 дня хранения эритроциты с высокой степенью к деформируемости практически не регистрируются на гистограмме распределения, скатерограмма распределения клеток по прямому и боковому светорассеянию представлена одной популяцией клеток (рисунок 3).

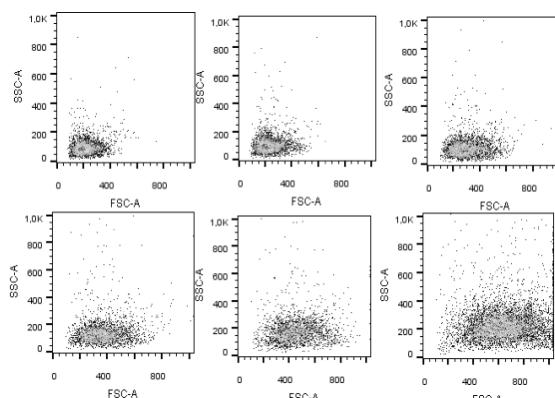


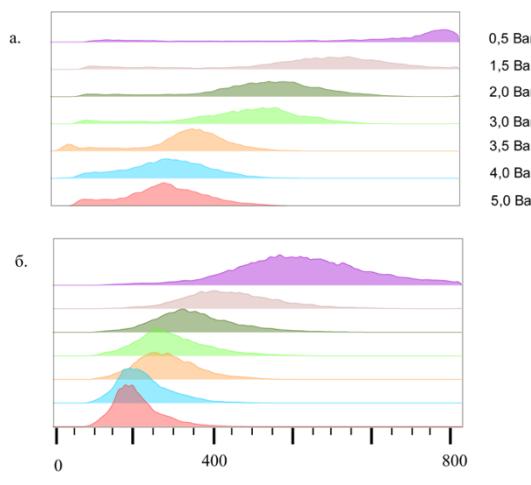
Рисунок 3 – Морфологические характеристики клеток, хранящихся 28 дней при разных скоростях сдвига

Примечание: * – гистограмма рассеяния клеток по малоугловому и боковому рассеянию луча лазера, FSC-A – малоугловое, SSc-A – боковое.

Хранящиеся эритроциты (рисунок 3) при всех режимах анализа характеризовались монофазным распределением величины прямого светорассеяния, при этом величина SSc на всех режимах потока обжимающей жидкости не изменялась.

Гистограмма распределения малоуглового рассеяния света луча лазера клетками «свежей» и хранящейся крови при разных скоростях сдвига показала (рисунок 4), что эритроциты в обеих группах анализа различались высокой неоднородностью, что указывает на присутствие в кровотоке клеток с различной способностью к деформации.

Важно отметить, что наличие двух пиков распределения света лучами лазера было характерно только для проб «свежей» крови.



**Рисунок 4 – Гистограмма распределения малоуглового рассеяния света луча лазера клетками крови при разных скоростях сдвига:
а – «свежей»; б – хранящейся**

При проведении сравнительного анализа деформируемости эритроцитов установлено (рисунок 5), что между группами наблюдения различия не выявляются только на больших скоростях сдвига. Так, в хранящейся крови деформируемость эритроцитов с 5,0 до 3,5 Bar составляла $154,3 \pm 31,3$, $293,7 \pm 43,8$ и $418,2 \pm 74,8$ о.е. соответственно.

Красные кровяные тельца «свежей» крови при сопоставимых режимах анализа имели более высокие значения прямого светорассеяния: $172,3 \pm 31,7$, $352,4 \pm 76,7$ и $541,2 \pm 81,2$ о.е. На режимах потока с меньшим давлением обжимающей жидкости, особенно при наименьшей скорости сдвига, в эритроцитах хранящейся крови способность к деформируемости была на 20 ($p < 0,05$) и

25 % ($p<0,05$) меньше, чем у клеток «свежей» крови при 0,5 и 1,5 Бар, соответственно.

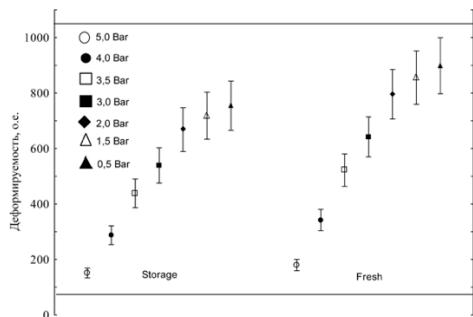


Рисунок 5 – Деформируемость эритроцитов крови при разных скоростях сдвига:
а – «свежей»; б – хранящейся

Анализ сферичности эритроцитов, измеренный по интенсивности флуоресценции E5-M, показал (рисунок 6), что все эритроциты образцов хранящейся крови имели сниженное значение флуоресценции зонда. В цельной крови здоровых добровольцев также присутствовали клетки с пониженным уровнем флуоресценции E5-M. Установлена прямо пропорциональная зависимость между деформируемостью красных кровяных телец и количеством белка полосы 3 мембран клеток $r=0,86$, $p<0,05$. На заключительном этапе исследования для анализа спектров поглощения двух различающихся популяций по деформируемости и содержанию белка полосы 3 клеток эритроцитарной суспензии проведена сортировка красных кровяных телец здоровых добровольцев, имеющих различия в флуоресценции эозин-5 малямида.

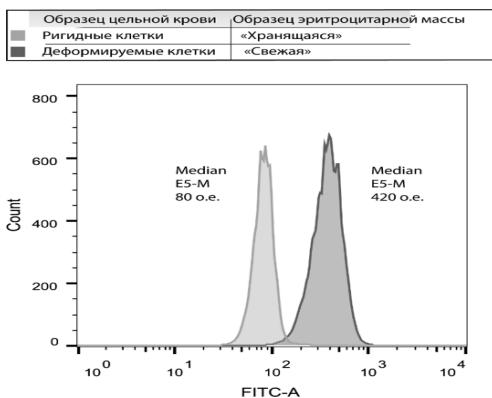


Рисунок 6 – Анализ сферичности эритроцитов, измеренный по интенсивности флуоресценции E5-M

Примечание: ось Y – количество клеток, ось X – интенсивность флуоресценции E5-M

Анализ спектров поглощения крови показал (рисунок 7), что при нормоксии клетки с высокой деформируемостью при 8 %-ном содержании кислорода в атмосфере имели долю фракции HbO₂ $43,9 \pm 1,3\%$, в то же время ригидные эритроциты характеризовались более высокой долей оксигемоглобина – $45,1 \pm 1,6\%$, $p<0,05$.

Инкубация эритроцитарной взвеси в течение 180 минут при 4 % O₂ в атмосфере спектрофлуориметра приводила к снижению доли оксигемоглобина до $36,6 \pm 2,2\%$ и $43,1 \pm 2,0\%$, у хранящейся и «свежей» крови, соответственно, $p<0,05$.

При максимальной концентрации кислорода (14 %) фракция гемоглобина выросла в обоих типах клеток, различающихся по деформируемости (рисунок 4). Так, доля фракции оксигемоглобина в популяции ригидных клеток составляла $52,6 \pm 1,6\%$. Эритроциты с высокой способностью к деформации при гипероксии имели большую долю HbO₂ ($66,8 \pm 2,2\%$), $p<0,05$. Фракция дезоксигемоглобина в процессе гипоксии/реоксигенации изменялась в зависимости от доли HbO₂, при этом величина фракции метгемоглобина зависела в основном от принадлежности к типу изучаемых клеток. В частности, в эритроцитах с высокой способностью к деформации процентное содержание MetHb было выше ($8,2 \pm 0,3\%$, $p<0,05$) в условиях нормоксии, а при гипероксии его доля возрастала до $11,1 \pm 0,7\%$, $p<0,05$. Ригидные клетки характеризовались более низкой долей метгемоглобина в начале эксперимента ($7,3 \pm 0,6\%$, $p<0,05$) и при реоксигенации ($8,4 \pm 0,8\%$, $p<0,05$). В условиях гипоксии различий между популяциями клеток в содержании MetHb не выявлено.

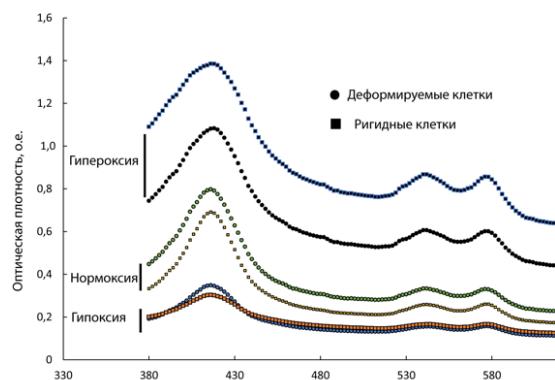


Рисунок 7 – Спектры поглощения эритроцитов крови при различном парциальном напряжении кислорода

Одной из основных характеристик, определяющих функции эритроцитов, является их деформируемость, которая проявляется в способности клеток адаптировать свою форму к динамически изменяющимся условиям потока, минимизируя сопротивление к нему. Это необходимо для пассажа клеток по капиллярам, имеющим внутренний диаметр меньший, чем эритроциты и снижение деформируемости может приводить к нарушению перфузии и доставки кислорода к периферическим тканям, поскольку «жесткие» эритроциты способны блокировать капилляры.

В нормальных физиологических условиях деформируемость эритроцитов обеспечивает адекватный кровоток. При увеличении продолжительности нахождения эритроцитов в кровотоке, при переливании хранящейся эритромассы сниженная способность клеток к деформации может влиять на посттрансфузионную функцию крови. Поскольку в организме могут находиться клетки, значительно различающиеся по продолжительности циркуляции в кровотоке, можно предположить наличие у части из них механизмов, обеспечивающих поддержание способности функционирования при снижении способности к деформации. Одним из таких механизмов, вероятно, является изменение функционирования L-аргинин-NO системы красных кровяных телец в ходе процесса превращения эритроцита от ретикулоцита до сфераэхиноцита, подвергающегося эритозу. При этом образующийся в разных количествах в зависимости от возраста эритроцита NO способен защищать мембранные эритроцитов от окислительного повреждения, обеспечивая их эластичность.

Нами показано, что и диета, богатая нитратами, и нормобарическая гипоксия приводят к росту содержания NO эритроцитов, что способно повысить деформируемость эритроцитов. Выявленные нами различия в оксигенации клеток при гипо- и гипероксии вероятно связаны как с особенностями морффункционального состояния эритроцитов, так и с участием L-аргинин-NO

системы красных кровяных телец. В работе A. Iolascon [6] показано, что при сфеноцитозе отмечается изменение сродства гемоглобина к кислороду в сочетании с изменениями объема клетки и ее внутренними структурными перестройками. Повышение оксигенации гемоглобина ригидных клеток при нормоксии вероятно связано с образованием нитрозилгемоглобина, поскольку при этих условиях в эритроцитах выявлено более низкое количество MetHb, повышающего сродство к кислороду, а HbFe²⁺-NO сдвигает кривую диссоциации вправо. При повышении парциального давления кислорода в условиях эксперимента зарегистрирован рост доли оксигемоглобина в клетках, имеющих большую способность к деформации по сравнению с ригидной популяций эритроцитов. Если предположить, что шеддинг эритроцитарной мембранны при старении клеток сопровождается постепенным уплотнением внутриэрритроцитарного гемоглобина, то такой характер изменений может приводить к снижению сродства гемоглобина к кислороду и ухудшению его способности к деформации.

Заключение. В ходе выполнения работы проведена оценка взаимосвязи между деформируемостью эритроцитов и их сродством к кислороду в условиях гипо- и гипероксии. Деформируемость красных кровяных телец прямо пропорционально зависит от интенсивности флуоресценции эозин-5 малеимида (используется для выявления клеток, дефицитных по белку полосы 3 мембран).

Установлено, что эритроциты образцов хранящейся крови имели сниженную деформируемость, особенно при небольших значениях напряжения сдвига.

В популяции эритроцитов практически здоровых добровольцев присутствуют клетки с различной деформируемостью и степенью оксигенации. Это необходимо учитывать при оценке газового состава и оксиметрии (особенно интегрального показателя сродства гемоглобина к кислороду – p50) крови пациентов.

Список цитированных источников

1. D'Alessandro, A. Erythrocyte adaptive metabolic reprogramming under physiological and pathological hypoxia / A. D'Alessandro, Y. Xia // Curr. Opin. Hematol. – 2020. – Vol. 27, N 3. – P. 155–162.
2. Akulich, N. V. A Comparative Analysis of the Nitrogen Monoxide Content and Optical-Morphometric Characteristics of Erythrocyte-Containing Blood Components during Storage / N. V. Akulich, V. V. Zinchuk // Biophysics. – 2023. – Vol. 68, N 1. – P. 63–69.
3. McKeown, S. R. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response / S. R. McKeown // BJR. – 2014. – Vol. 87, N 1035 (20130676).
4. Nitric oxide bioavailability for red blood cell deformability in the microcirculation: A review of recent progress / J. Kobayashi [et al.] // Nitric Oxide. – 2022. – Vol. 129 – P. 25–29.

5. Severinghaus, J. W. Blood gas calculator. / J. W. Severinghaus // Journal of Applied Physiology. – 1966. – Vol. 21, N 3. – P. 1108–1116.
6. Iolascon, A. Red blood cell membrane defects / A. Iolascon, S. Perrotta, G. W. Stewart // Rev. Clin. Exp. Hematol. – 2003. – Vol. 7, N 1. – P. 22–56.
7. Effects of Nitroglycerin on Erythrocyte Rheology and Oxygen Unloading / J.-P. Bin [et al.] // Circulation. – 2006. – Vol. 113, N 21. – P. 2502–2508.

Erythrocyte deformability and oxygenation in hypoxia and hyperoxia

N. V. Akulich^{1,2}, V. V. Zinchuk²

¹Republican Scientific and Practical Center of Sports, Republic of Belarus;

²Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

The analysis of deformability and oxygenation of erythrocytes in hypoxia/reoxygenation was carried out. Deformability was determined by flow cytofluorometry, reducing the pressure of the compression fluid flow, changing the effect of the flow on red blood

Keywords: spherocytosis, red blood cells, hypoxia, hyperoxia, flow cytometry.

Поступила 05.06.2024

УДК 616.24-006.6-091.8-07:547.995.15

ОБРАЗОВАНИЕ NET-ЛОВУШЕК И АКТИВНОСТЬ СЕКРЕТОРНЫХ ФЕРМЕНТОВ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Белевич Е. И.¹, Готько О. В.¹, Прохорова В. И.¹, Таганович А. Д.², Ковганко Н. Н.², Колб А. В.², Хотько Е. А.²

¹Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова»,

Минский р-н, аг. Лесной, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Изучена возможность использования способности нейтрофилов формировать NET-ловушки и секretировать ферменты для диагностики рака молочной железы (РМЖ). Установлено, что у пациентов с РМЖ увеличена интенсивность образования NET-ловушек относительно группы здоровых людей. Имеется статистически значимое увеличение активности секреторных ферментов нейтрофилов – миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы в случае пациентов с РМЖ по сравнению со здоровыми людьми.

Ключевые слова: рак молочной железы, диагностика, нейтрофил, NET-ловушка, миелопероксидаза, эластаза.

Введение. В Республике Беларусь по данным Белорусского канцер-регистра РМЖ занимает первое место по заболеваемости злокачественными новообразованиями у женщин (22,3 %) со средним приростом за 10 лет в 26,2 % [1]. В последние десятилетия комплексный

подход стал стандартом лечения РМЖ. Критериями эффективности медицинской помощи в данном случае служат ответ опухоли на терапию, частота рецидивирования и прогрессирования заболевания после завершения лечения. При соблюдении такого подхода показатель пятилетней

кумулятивной скорректированной выживаемости пациентов всех стадий РМЖ составляет 80,9 %. Однако, несмотря на успехи в лечении пациентов с данной патологией, у около 50 % женщин в течение 5 лет развивается рецидив или наблюдается прогрессирование заболевания, что свидетельствует о наличии ряда нерешенных проблем, связанных с оптимизацией выявления резистентности к специальному противоопухолевому лечению и прогнозированию возврата заболевания [2]. Прогнозирование, раннее выявление и своевременное лечение резистентных, рецидивирующих и метастатических форм РМЖ является значительным резервом улучшения общих результатов лечения.

Корректный выбор до- и послеоперационной терапии, оценка прогноза и вероятности рецидива могут основываться на исследовании диагностических и предиктивных факторов. Помимо давно предложенных клинических критериев, позволяющих планировать лечение и прогнозировать течение РМЖ, таких как возраст пациентов, размер опухоли, состояние периферических лимфатических узлов, гистологический тип опухоли, степень злокачественности, гормONO-рецепторный статус, на данный момент не существует четких лабораторных факторов прогноза непосредственных и отдаленных результатов лечения РМЖ, в связи с чем исследователи всего мира продолжают их поиски [3].

Нейтрофилы опухоли могут проявлять проопухолевую активность, способствуя усилинию ангиогенеза и потенцируя процессы метастазирования [4–6]. Имеются сведения, что воспалительные цитокины, высвобождаемые опухолью для привлечения нейтрофилов, привлекают клетки и способствуют их дальнейшему нетозу [7]. Показано, что NETs содействуют прогрессированию [2, 3] и метастазированию опухоли [4]. В других исследованиях активным формам кислорода, азота, галогенов и некоторым цитокинам, производимым этими клетками [5], отводят ключевую роль в регрессии опухолевого процесса, что говорит о противоопухолевой активности нейтрофилов.

Анализ доступной литературы свидетельствует о влиянии иммунных клеток как микрокружения опухоли, так и периферической крови, в том числе их морфофункциональных характеристик, на процессы канцерогенеза, лекарственной устойчивости и опухолевой прогрессии при злокачественных новообразованиях различных локализаций. Однако в настоящее время роль данных показателей при оценке химиорезистентности и прогрессирования РМЖ противоречива и

не полностью изучена в связи с гетерогенностью заболевания.

Цель работы – определить диагностическую информативность способности нейтрофилов к образованию NET-ловушек и активности их секреторных ферментов при РМЖ.

Материалы и методы. Все изучаемые показатели определены в группе клинически здоровых женщин (группа КЗЖ – 25 человек) и пациентов с РМЖ до начала лечения (60 человек). Клинико-морфологические характеристики пациентов, включенных в исследование, представлены в таблице 1. Сопоставлены уровни лабораторных показателей у клинически здоровых женщин и онкологических пациенток с РМЖ до начала лечения.

Таблица 1 – Характеристика пациентов с РМЖ, включенных в исследование

Параметр	Значение
Количество пациенток, всего	60
Возраст, лет ($S \pm \sigma$)	58,8 ± 12,3
Пол, м/ж	0/60
Стадия:	
– I	17 (28,3 %)
– II	29 (48,4 %)
– III	8 (13,3 %)
– IV	3 (5,0 %)
– Не определена	3 (5,0 %)
Распространенность опухолевого процесса:	
– T1	22 (36,7 %)
– T2	28 (46,7 %)
– T3	1 (1,6 %)
– T4	9 (15,0 %)
Поражение регионарных лимфатических узлов:	
– N0	34 (56,7 %)
– N1	28 (46,7 %)
– N2	2 (3,3 %)
– N3	5 (8,3 %)
Отдаленное метастазирование:	
– M0	56 (93,3 %)
– M1	4 (6,7 %)
Степень дифференцировки опухоли:	
– GI	5 (8,3 %)
– GII	39 (65,0 %)
– GIII	10 (16,7 %)
– Не определена	6 (10,0 %)

Окончание табл. 1

Локализация:	
– правая молочная железа	27(45,0 %)
– левая молочная железа	33 (55,0 %)
Гистологическая форма:	
– инвазивная карцинома	58 (96,6 %)
– метапластическая плоскоклеточная карцинома	1 (1,7 %)
– муцинозная карцинома	1 (1,7 %)
Молекулярно-биологический тип:	
– люминальный А	29 (48,3 %)
– люминальный В Her2-	15 (25,0 %)
– люминальный В Her2+	9 (15,0 %)
– Her2+-позитивный (не люминальный)	1 (1,7 %)
– триплементнегативный (TH)	6 (10,0 %)

Выделение фракции нейтрофилов периферической крови осуществляли методом разделительного центрифугирования. Венозную кровь насылаивали на градиент плотности Histopaque-1119 и Histopaque-1077 в пробирках Falcon объемом 15 мл и центрифугировали (700 g, 30 минут, 25 °C). Плазматические и мононуклеарные клетки отделяли, а слой, содержащий гранулоциты, переносили в отдельную пробирку и отмывали в 100 мл 155 mM раствора NaCl (270 g, 10 минут, 25 °C). Оставшуюся примесь эритроцитов лизировали с использованием раствора NH4Cl (0,83 %, pH 7,2) в течение 5 минут при 37 °C. Выделенные нейтрофилы отмывали в 100 мл 155 mM раствора NaCl (270 g, 10 минут, 25 °C) и ресуспендировали в 1 мл сбалансированного солевого раствора Хенкса – HBSS (pH 7,2) с добавлением 0,1 % желатина (мас./об.). Клеточные препараты содержали 80–90 % нейтрофилов с жизнеспособностью выше 95 % (тест с трипановым синим).

Определение уровня citH3 в плазме крови пациентов основной и контрольной групп осуществляли с использованием иммуноферментного анализа (Citrullinated Histone H3 ELISA Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, США).

Дополнительно анализировали уровень внеклеточной двухцепочечной ДНК. Для этого нейтрофилы (1×10^6 клеток/мл) инкубировали с гелем HBSS (контроль) и затем стимулировали форбол-12-миристат-13-ацетатом (1×10^{-7} моль/л) в течение 4 часов при 37 °C. Двойные нити ДНК количественно определяли флуориметрическим методом с помощью набора для анализа двухцепочечной ДНК «Quant-iT PicoGreen» (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с

рекомендациями производителя. Интенсивность флуоресценции исследуемых образцов измеряли на микропланшетном флуориметре (Bio-Rad Lab) при длинах волн возбуждения/испускания 502 нм и 523 нм соответственно.

Активность миелопероксидазы нейтрофилов (2×10^6 клеток/мл) определяли через реакцию образования хлорноватистой кислоты, которая затем реагировала с таурином с образованием хлорамина таурина. Хлорамин таурина после взаимодействия с 5-тио-2-нитробензойной кислотой (TNB) образовывал бесцветный продукт – 5,5'-дитио-бис-2-нитробензойную кислоту. Одна единица активности МПО определялась как количество фермента, который гидролизует субстрат и образует таурин-хлорамин для потребления 1,0 мкМ TNB в минуту при 25 °C.

Определение проводили путем измерения оптической плотности образца при 450 нм с использованием микропланшетного фотометра (Bio-Rad Lab).

Активность нейтрофильной эластазы анализировали после обработки суспензии нейтрофилов (2×10^6 клеток/мл) N-формилметионилнейцилфенилаланином (fMLP; 1×10^{-7} моль/л, 100 мл) в течение 30 минут при 37 °C. Через 30 минут измеряли оптическую плотность образовавшегося п-нитроанилина при 405 нм с использованием микропланшетного фотометра (Bio-Rad Lab).

Статистическую значимость различий оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (U-test) в программе STATISTICA 10.0.

Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $<0,05$.

Результаты и их обсуждение. В таблице 2 представлены результаты изученных лабораторных показателей обследованных пациенток и здоровых людей. Выявлены значимые различия ($p=0,037$) содержания гиперцитруллированного гистона citH3 в крови пациентов, страдающих РМЖ, и группой КЗЖ (0,746 и 0,326 нг/мл соответственно).

У 95 % пациенток группы РМЖ содержание citH3 в плазме крови колебалось от 0,361 до 0,859 нг/мл, а у 95 % лиц в группе КЗЖ – от 0,281 до 0,371 нг/мл.

Дополнительным критерием, подтверждающим повышенную способность нейтрофилов пациенток с РМЖ к формированию NET-ловушек, является уровень внеклеточной ДНК, который оказался выше по сравнению с группой КЗЖ (таблица 2).

Таблица 2 – Уровни маркеров NET-ловушек и активности секреторных белков нейтрофилов в крови пациенток при РМЖ и здоровых женщин

Показатель	Группа КЗЖ	Группа РМЖ	p
Цитруллированный гистон H3 (citH3), нг/мл	0,326 [0,281; 0,371]	0,746 [0,361; 0,859]	0,037
Внеклеточная ДНК, нг/мл	147,1 [111,3; 168,2]	193,7 [163,6; 223,5]	0,022
Активность миелопероксидазы, МU/мл	3,9 [1,5; 5,5]	7,1 [2,9; 9,3]	0,008
Активность нейтрофильной эластазы, МU/мл	2,7 [1,1; 3,9]	4,9 [2,8; 6,3]	0,012

Проведенный анализ показателей активности секреторных ферментов нейтрофилов – миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы показал статистически значимое увеличение уровня активности указанных выше ферментов у пациенток при РМЖ относительно здоровых женщин (таблица 2).

Заключение. Исследование функциональной активности нейтрофилов периферической крови у пациенток при РМЖ выявило значимое увеличение способности нейтрофилов к образованию NET-ловушек относительно группы клинически здоровых женщин. Показано значимое увеличение активности секреторных ферментов нейтрофилов – миелопероксидазы и нейтрофильной эластазы у пациенток при РМЖ по сравнению со здоровыми женщинами. Полученные результаты свидетельствуют об информативности изученных показателей.

Список цитированных источников

1. Рак в Беларуси: цифры и факты. Анализ данных Белорусского канцер-регистра за 2010–2019 гг. / А. Е. Океанов [и др.] ; под ред. С. Л. Полякова. – Минск : РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова, 2020. – 298 с.
2. Особенности диагностики и клинического течения разных иммуногистохимических подтипов рака молочной железы / М. Х. Ель Хажж [и др.] // Клінічна медицина. – 2014. – Т. 19, № 14. – С. 29–35.
3. Современные стандарты лечения больных первичным раком молочной железы (по материалам Международной конференции «Рак молочной железы», Москва, 22–24 января 2014 г.) / В. П. Летягин [и др.] // Опухоли женской репродукт. системы. – 2014. – № 1. – С. 21–31.
4. Связь иммунологических показателей с эффективностью неоадьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы / Я. В. Кухарев [и др.] // Сибирский онкологический журнал – 2013. – № 2 (56). – С. 50–57.
5. Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration / Q. D. Wu [et al.] // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2001. – Vol. 280, № 4. – P. 814–822.
6. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты: обзор / И. В. Нестерова [и др.] // Иммунология. – 2011. – Т. 33, № 5. – С. 281–287.
7. Gradient infiltration of neutrophil extracellular traps in colon cancer and evidence for their involvement in tumour growth / S. Arelaki [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, N 5.

Formation of NET traps and activity of secretory enzymes of neutrophils in breast cancer

Bialevich K. I.¹, Gotko O. V.¹, Prokhorova V. I.¹, Tahanovich A. D.², Kauhanka M. M.², Kolb A. V.², Khotko E. A.²

¹N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus,
Minsk District, Lesnoy, Republic of Belarus;

² Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The possibility of using the ability of neutrophils to form NET traps and secrete enzymes for the diagnosis of breast cancer was studied. It was found that in patients with breast cancer the intensity of NET trap formation is increased relative to the group of healthy people. Analysis of the activity of neutrophil secretory

enzymes – myeloperoxidase and neutrophil elastase – showed a statistically significant increase in patients with breast cancer compared to healthy people.

Keywords: breast cancer, diagnosis, neutrophil, NET trap, myeloperoxidase, neutrophil elastase.

Принята 05.06.2024

УДК 612.57:612.123:612.826.4

О ЗНАЧИМОСТИ АКТИВНОСТИ β -АДРЕНОРЕАКТИВНЫХ СИСТЕМ ГИПОТАЛАМИЧЕСКОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА В РЕГУЛЯЦИИ СОДЕРЖАНИЯ ЛИПИДОВ КРОВИ ПРИ ГИПЕРТЕРМИИ

Висмонт Ф. И., Жадан С. А., Абакумова Т. В., Яковлев Ф. Д., Шуляк Е. В.,
Шестель И. В.

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

Реферат. Известно, что адренореактивные системы гипоталамической области мозга в условиях действия на организм чрезвычайных раздражителей оказывают выраженное влияние на все процессы жизнедеятельности [1, 2]. Однако их роль в регуляции содержания холестерина (ХС) липопротеидов (ЛП) и уровня свободных жирных кислот (СЖК) крови в условиях гипертермии до сих пор остается не выясненной. Установлено, что развитие гипертермии, вызванной перегреванием животных, сопровождается снижением уровня СЖК, содержания ХС ЛПВП и ХС суммарной фракции ЛПОНП и ЛПНП в плазме крови, концентрации норадреналина (НА) в гипоталамусе и увеличением скорости его оборота. Центральное действие α -адреномиметиков клофелина (10 мкг) и мезатона (40 мкг) сопровождается повышением содержания ХС ЛПВП, уровня СЖК плазмы крови и снижением ректальной температуры. Напротив, введение в желудочки мозга β -адреномиметика изопротеренола в дозе 10 мкг приводит к снижению в крови содержания ХС ЛПВП, уровня СЖК и к повышению температуры тела. Перегревание крыс в условиях блокады центральных α -адренорецепторов феноксибензамином (50 мкг на крысу) в дозе, которая существенно не отражалась на изучаемых показателях у контрольных животных, сопровождалось более выраженным снижением уровня СЖК и концентрации ХС ЛПВП. Однако скорость нарастания ректальной температуры в этих условиях не изменялась. Центральное действие β -адреноблокатора пропранолола (50 мкг) устранило влияние перегревания на содержание ХС ЛП и уровень СЖК в плазме крови и способствовало развитию гипертермии. Результаты выполненных исследований дают основание полагать, что активность β -адренореактивных систем гипоталамической области мозга имеет значимость в развитии изменений содержания липидов крови при гипертермии и приспособлении организма к воздействию высокой внешней температуры.

Ключевые слова: холестерин липопротеидов, свободные жирные кислоты, адренореактивные системы гипоталамической области мозга, гипертермия.

Введение. Всестороннее изучение процессов поддержания жизнедеятельности при гипертермии – важная задача современной биологии и медицины.

Ее решению несомненно должно способствовать исследование особенностей обмена сложных липидов крови и механизмов их регуляции в этих условиях.

Многими исследователями показано, что адренореактивные системы гипоталамуса в условиях действия на организм чрезвычайных раздражителей оказывают выраженное влияние на все процессы жизнедеятельности [1, 2]. Однако их роль в регуляции содержания холестерина (ХС) липопротеидов (ЛП) и уровня свободных жирных кислот (СЖК) крови в условиях повышения

температуры тела и возможности регуляции обмена сложных липидов и уровня СЖК в крови путем воздействия фармакологическими средствами на функциональное состояние адренореактивных систем слабо изучены.

Цель работы – выяснение значимости активности адренореактивных систем гипоталамической области мозга в регуляции содержания ХС ЛП и уровня СЖК в крови у крыс при гипертермии.

Материалы и методы. Опыты выполнены на ненаркотизированных беспородных белых крысах обоего пола массой 160–180 г. Для создания известной экспериментальной модели гипертермии животных подвергали воздействию внешнего тепла в суховоздушной термокамере при температуре воздуха 40–42 °C. Через 15, 30 и 60 минут воздействия высокой внешней температуры животных декапитировали.

Митохондрии печени выделяли методом дифференциального центрифугирования при охлаждении в трис-сахарозной среде. Уровень СЖК в крови определяли по методу K. Falholf et al. [3]. ЛПВП получали после выделения из плазмы крови ЛПОНП + ЛПНП. Из полученных фракций липопротеидов экстрагировали липиды и определяли суммарный холестерин (ХС), используя реакцию Либермана–Бурхардта.

Гипоталамус извлекали при температуре 0–4 °C. Скорость оборота норадреналина (НА) в нем исследовали с применением ингибитора синтеза катехоламинов α -метил- β -тироцина (250 мг/кг, внутрибрюшинно, время действия – 12 ч) и ингибитора распада НА паргиллина (75 мг/кг, внутрибрюшинно, время действия – 30 минут). На фоне действия ингибиторов изучали влияние кратковременного перегревания организма на содержание НА в гипоталамусе. Содержание НА определяли флуорометрическим методом, описанным R. Laverty, K. Taylor [4]. Потребление животными кислорода определяли камерным способом (методом Мирапольского, описанным О. Н. Елизаровой) [5].

Для решения поставленных задач использовали методы возбуждения и блокады центральных адренореактивных систем фармакологическими средствами. С этой целью были использованы: α -адrenomиметики (битартрат моногидрат l-норадреналина, клофелин и мезатон), β -адrenomиметик (битартрат дигидрат изопротеренола), α -адреноблокатор (феноксибензамина), β -адреноблокатор (пропранол). Все вещества вводили в виде растворов в апирогенной дистиллированной воде в правый боковой желудочек мозга в объеме, не превышающем 20 мкл. Инъекции блокаторов

проводили за 15 мин до начала перегревания. Глубокую температуру тела (ректальную) измеряли электротермометром ТПЭМ-1.

Все полученные данные обработаны методами вариационной биологической статистики с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что развитие гипертермии, вызванной кратковременным перегреванием крыс в термокамере, сопровождалось повышением ректальной температуры (на 2,6 °C через 15 минут и на 2,8 °C через 30 минут) и значительными изменениями содержания ХС ЛП плазмы крови, которым сопутствуют сдвиги уровня СЖК (рисунок 1).

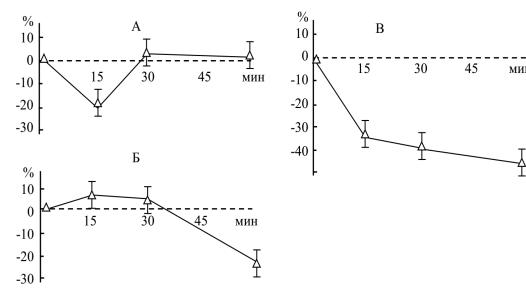


Рисунок 1 – Изменение содержания СЖК и холестерина в липопротеидах плазмы крови крыс в условиях гипертермии (% к исходному): A – холестерина в ЛПОНП + ЛПВП; Б – холестерина в ЛПОНП + ЛПНП; В – СЖК в плазме. По абсциссе – время воздействия внешней температуры (мин)

Уровень СЖК в крови животных через 15 минут температурного воздействия, понижался на 31,6 % и оставался низким в течение всего периода исследования (1 ч). Содержание ХС ЛПВП в условиях гипертермии также снижалось (на 21,6 % через 15 минут), однако этот показатель очень скоро (к 30-й минуте) возвращался к исходному значению.

Концентрация ХС суммарной фракции ЛПОНП + ЛПНП уменьшалась (на 22,7 %), если перегревание длилось 60 минут.

Наряду со сдвигами в содержании липидов крови в течение первых 30 минут теплового воздействия понижается концентрация НА в гипоталамусе, возвращаясь затем (60-я минута) к исходному значению. Что касается конкретных причин, приводящих к уменьшению содержания НА в гипоталамической области мозга при гипертермии, то опыты показали, что данное уменьшение происходит значительно быстрее, если этот фактор действует в условиях угнетения синтеза катехоламинов α -метил- β -тироцином. Предположение о повышении скорости оборота НА при

гипертермии подтвердилось результатами экспериментов с использованием ингибитора распада НА паргилина.

При этом развитие гипертермии сопровождалось более значительным нарастанием концентрации НА. Так, в результате острого перегревания животных в течение 15 минут скорость синтеза НА в гипоталамусе увеличивалась на 24 %, а скорость высвобождения – на 23 %.

Введение в боковые желудочки мозга водного раствора НА в дозе 10 мкг приводило к повышению концентрации ХС ЛПВП и уровня

СЖК в крови. Так, содержание ХС ЛПВП увеличивалось уже через 15 и 30 минут после инъекции соответственно на 14,1 и 15,6 %, а уровень СЖК – на 53,3 и 42,0 %.

Центральное действие НА в дозе 20 мкг через 30 минут после инъекции приводило к увеличению содержания ХС ЛПВП на 22,9 %, снижению концентрации ХС ЛПОНП + ЛПНП на 20,5 %, уровня СЖК на 45,1 % и потребления животными кислорода на 49,0 %. Температура тела снижалась на 1,0 °C через 15 минут.

Таблица 1 – Изменение содержания ХС ЛПВП, суммарной фракции ЛПОНП + ЛПНП, уровня СЖК плазмы крови и температуры тела после введения в желудочки мозга крыс клофелина (10 мкг)

Группа животных	Статистический показатель	Холестерин ЛПВП, ммоль/л	Холестерин ЛПОНП + ЛПНП, ммоль/л	СЖК, мкЭВ/л	Температура тела, °C
1. Контроль (интактные животные)	M ± m	0,96 ± 0,21	0,42 ± 0,011	312 ± 18,6	36,6 ± 0,05
2. Контроль (введение бидистиллированной воды) 15 минут	M ± m P ₂₋₁	0,95 ± 0,038 >0,05	0,41 ± 0,014 >0,05	374 ± 33,2 >0,05	36,4 ± 0,10 >0,05
3. Контроль (введение бидистиллированной воды) 30 минут	M ± m P ₃₋₁	0,96 ± 0,031 >0,05	0,43 ± 0,017 >0,05	446 ± 19,9 <0,001	36,7 ± 0,08 >0,05
4. Введение клофелина 15 минут	M ± m P ₄₋₂	1,10 ± 0,036 <0,05	0,41 ± 0,015 >0,05	531 ± 33,3 <0,001	34,7 ± 0,16 <0,001
5. Введение клофелина 30 минут	M ± m P ₅₋₃	1,12 ± 0,034 <0,05	0,43 ± 0,016 >0,05	760 ± 26,0 <0,001	33,8 ± 0,06 <0,001

Примечание: n = 8

Таблица 2 – Изменение содержания ХС ЛПВП, суммарной фракции ЛПОНП + ЛПНП, уровня СЖК плазмы крови и температуры тела после введения в желудочки мозга крыс изопротеренола (10 мкг)

Группа животных	Статистический показатель	Холестерин ЛПВП, ммоль/л	Холестерин ЛПОНП + ЛПНП, ммоль/л	СЖК, мкЭВ/л	Температура тела, °C
1. Контроль (интактные животные)	M ± t	0,94 ± 0,035	0,41 ± 0,016	358 ± 14,6	36,4 ± 0,10
2. Контроль (введение бидистиллированной воды) 15 минут	M ± t P ₂₋₁	0,93 ± 0,031 >0,05	0,42 ± 0,015 >0,05	422 ± 19,3 <0,01	36,5 ± 0,10 >0,05
3. Контроль (введение бидистиллированной воды) 30 минут	M ± t P ₃₋₁	0,95 ± 0,024 >0,05	0,41 ± 0,012 >0,05	466 ± 16,7 <0,001	36,6 ± 0,15 >0,05
4. Введение изопротеренола 15 минут	M ± t P ₄₋₂	0,80 ± 0,041 <0,05	0,38 ± 0,018 >0,05	308 ± 15,3 <0,001	37,0 ± 0,08 <0,01
5. Введение изопротеренола 30 минут	M ± t P ₅₋₃	0,75 ± 0,029 <0,001	0,38 ± 0,017 >0,05	233 ± 14,5 <0,001	37,3 ± 0,10 <0,02

Примечание: n = 8

Исходя из современных представлений о гетерогенности синапсов [6], были основания полагать, что НА в разных дозах неодинаково действует на α - и β -адренорецепторы, функциональное назначение которых в регуляции обмена ЛП в плазме крови различно.

Выявлено, что введение в желудочки мозга α -адреномиметиков клофелина (10 мкг), мезатона (40 мкг) приводят к повышению содержания ХС ЛПВП, уровня СЖК плазмы крови и снижению ректальной температуры (таблица 1). Напротив, введение изопротеренола в дозе 10 мкг сопровождается понижением содержания ХС ЛПВП, а также уровня СЖК в условиях слабого подъема температуры тела (таблица 2). Активация центральных β -адренорецепторов вызывала в первые

15 минут также понижение (на 66,3 %) количества потребляемого животными кислорода, в то время как введение клофелина или мезатона существенно не сказывалось на этом показателе.

Заключение. 1. Центральное действие блокатора β -адренорецептора пропранолола предупреждает возникновение сдвигов уровня свободных жирных кислот и содержания ХС ЛПВП в плазме крови – реакцию на кратковременное воздействие высокой внешней температуры.

2. По-видимому, активность β -адренореактивных систем гипоталамической области мозга имеет значимость в регуляции содержания липидов в крови при гипертермии и приспособлении организма к воздействию высокой внешней температуры.

Список цитированных источников

1. The role of the dorsal noradrenergic pathway of the brain (locus coeruleus) in the regulation of liver cytochrome P450 activity / M. Kot [et al.] // European Journal of Pharmacology. – 2015. – Vol. 751. – P. 34–41.
2. Гурин, В. Н. Центральные механизмы терморегуляции / В. Н. Гурин. – Минск : Беларусь, 1980. – 122 с.
3. Falholt, K. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fatty acids in plasma / K. Falholt, B. Lund, W. Falholt // Clinica Chimica Acta. – 1973. – Vol. 46, N 1. – P. 405–111.
4. Laverty, R. The fluorometric assay of catecholamines and related compounds / R. Laverty, K. Taylor // Analytical Biochemistry. – 1968. – Vol. 22, N 2. – P. 269–279.
5. Елизарова, О. Н. Определение пороговых доз промышленных ядов при пероральном введении / О. Н. Елизарова. – Москва : Медгиз, 1962. – 174 с.
6. Глебов, Р. Н. Функциональная биохимия синапсов / Р. Н. Глебов, Г. Н. Крыжановский. – Москва : Медицина, 1978. – 328 с.

On the significance of the activity of β -adrenoreactive systems of the brain hypothalamic area in the regulation of blood lipid contents during hyperthermia

Vismont F. I., Zhadan S. A., Abakumova T. V., Yakovlev F. D., Shulyak E. V., Shestel I. V.
Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The purpose of the study was to determine the significance of the hypothalamic adrenoreactive systems activity in the regulation of lipoprotein cholesterol level and the level of free fatty acids in the blood of rats with hyperthermia.

It was established that the activity of β -adrenoreactive systems of the hypothalamic region of the brain is important in the regulation of lipid levels in the blood during hyperthermia and the body's adaptation to high external temperatures.

Keywords: lipoprotein cholesterol, free fatty acids, adrenoreactive systems of the hypothalamic region of the brain, hyperthermia.

Поступила 05.06.2024

УДК 616.132.2-089.843-093-002:616-018.74-008.6

ВЛИЯНИЕ СТЕНТИРОВАНИЯ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ НА БИОМАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

*Владимирская Т. Э., Адзериухо И. Э., Жилкевич А. В., Рачок С. М., Семенкова Г. Н.,
Устемчук А. М.*

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

Реферат. Исследуемую группу составили 45 пациентов, которые находились на лечении в инфарктном отделении МОКБ в течение 2023 года, у которых проводилось стентирование коронарных артерий по причине острого инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST. У пациентов проводилось взятие образцов крови до операции стентирования, через 6 и 12 месяцев после операции. Группу контроля составили 15 пациентов с постинфарктным кардиосклерозом (ПКС). Исследовали изменение содержания в крови пациентов интерлейкинов 1 β и 6, межклеточной молекулы адгезии 1, фактор роста тромбоцитов, фактор Виллебрандта методом иммуноферментного анализа. Установлено, что повышенные уровни провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6, а также фактора Виллебрандта и тромбоцитарного фактора роста у пациентов с острым инфарктом миокарда после стентирования коронарных артерий сохраняются в течение 6–12 месяцев с момента операции.

Ключевые слова: стентирование коронарных артерий, провоспалительные цитокины, маркеры эндотелиальной дисфункции.

Введение. Несмотря на достигнутые успехи в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, они по-прежнему остаются главной проблемой XXI века и занимают ведущее место в списке причин инвалидности и смертности во всем мире, ежегодно унося 7,2 млн человеческих жизней, тем самым обуславливая высокую медико-социальную значимость [1]. Эндоваскулярные вмешательства открыли новый этап в кардиологии, значительно расширив возможности лечения 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, одним из которых является вновь развившийся атеросклероз (неоатеросклероз) в зоне установки стента [2]. Неоатеросклероз, как поздний этап формирования пролиферативного заболевания коронарных артерий на установленных стентах, характеризуется развитием своеобразной гистологической картины атеромы, способной к разрыву и тромбообразованию, гистологически и ангиографически схожей с картиной

неустойчивой атеромы с тонкой покрышкой [3]. Причины и механизмы формирования неоатерогенных изменений в стентированных коронарных артериях (КА) до сих пор недостаточно изучены. Немногочисленные экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют о том, что возникновение неоатеросклероза в интиме стентированных артерий может быть связано с эндотелиальной дисфункцией и часто сопровождается активацией системного воспаления [4, 5].

Анализ изученных литературных источников показывает, что научные исследования, посвященные сведениям о патогенезе атеросклероза после стентирования КА немногочисленны и противоречивы. Недостаточно исследованы возможности лабораторных методов, дающих ценную диагностическую и прогностическую информацию в выявлении неустойчивых атеросклеротических бляшек.

Цель работы – изучить влияние коронарного стентирования на динамику провоспалительных цитокинов и биомаркеров эндотелиальной дисфункции в крови пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ).

Материалы и методы. Исследуемую группу составили 45 пациентов, которые находились на лечении в инфарктном отделении МОКБ в течение 2023 года, у которых проводилось стентирование КА по причине ОИМ с подъемом сегмента ST. Из них мужчин – 34, женщин – 11. Средний возраст мужчин – 58 (52; 63), средний возраст женщин – 60 (53; 65). Все стенты были с покрытием – медикаментозным, лекарственным, сетчатым.

В срок 6 месяцев после установки стентов было проведено контрольное обследование пациентов исследуемой группы, включающее клинико-анамнестические, инструментальные и лабораторные методы. У пациентов проводилось взятие образцов крови ($n=109$) до операции стентирования (I группа), через 6 месяцев (II группа) и через 12 месяцев после операции (III группа). Группу контроля составили 15 пациентов с постинфарктным кардиосклерозом (ПКС). Исследовали изменение содержания в крови интерлейкинов 1 β (IL-1 β) и 6 (IL-6) (Cloud-Clone Corp, Китай), межклеточной молекулы адгезии 1 (ICAM1) (Cloud-Clone Corp, Китай); фактор роста тромбоцитов (PDGF), фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1 α), фактор Виллебрандта (VWF) (Elabscience Biotechnology Inc., Китай).

Оптическую плотность измеряли на универсальном фотометре Витязь Ф300 (Республика Беларусь). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета

прикладных программ Microsoft Excel 2010 и Statistica (версия 10,0, StatSoft, Inc., США).

Результаты и их обсуждение. У пациентов с ОИМ в 29,3 % случаев встречалось поражение коронарных артерий с преимущественной локализацией в передней межжелудочковой ветви (ПМЖВ) и в 19,4 % – в правой коронарной артерии (ПКА). В 34,1 % случаев наблюдалось мультифокальное поражение трех артерий, две артерии поражены в 19,4 %. Количество стентов, имплантированных в инфаркт-связанную артерию (ИСА) у пациентов с ОИМ составило 1,1, из них в ПМЖВ имплантировано 53,0 %, в ПКА 34,7 %, в огибающую ветвь (ОВ) – 12,2 %. Ангиографический успех после стентирования наблюдался у 95 % пациентов с ОИМ. Частота рестеноза у пациентов с ОИМ через 6 месяцев после ЧКВ ИСА составляла менее 1 %, степень стенозирования ИСА – 60 %. Результаты иммуноферментного анализа IL-1 β в крови пациентов после стентирования показали статистически значимое ($p<0,05$) увеличение концентрации цитокина в крови через 12 месяцев после стентирования по сравнению с контролем (таблица 1).

Динамика уровня IL-6 показала увеличение концентрации цитокина через 6 и 12 месяцев после ЧКВ ($p<0,05$). Иммуноферментный анализ концентрации VWF в крови пациентов показал статистически значимые ($p<0,05$) различия в концентрации биомаркера всех групп и контроля (таблица 2).

Таблица 1 – Динамика концентрации цитокинов в крови стентированных пациентов

Показатели (нг/мл)	Группы				P
	I	II	III	K	
IL-1 β	0,39 (0,26; 0,58)	0,44 (0,39; 0,57)	0,49 (0,36; 0,58)	0,46 (0,39; 0,47)	$P_{3-k}<0,05$
IL-6	39,01 (34,01; 45,03)	49,63 (39,85; 57,39)	47,01 (38,63 ;58,06)	37,71 (23,19; 49,18)	$P_{1-2}<0,05$ $P_{1-3}<0,05$ $P_{1-k}<0,05$

Таблица 2 – Динамика концентрации факторов эндотелиальной дисфункции в крови стентированных пациентов

Показатели (нг/мл)	Группы				P
	I	II	III	K	
VWF	85,58 (74,15; 90,07)	92,93 (88,03; 96,46)	93,88 (88,03; 98,50)	26,68 (24,35; 32,88)	$P_{1-2}<0,05$ $P_{1-3}<0,05$ $P_{1-k}<0,05$ $P_{2-k}<0,05$ $P_{3-k}<0,05$
Icam-1	95,3 (81,7; 116,3)	102,6 (78,7; 121,1)	100,5 (59,5; 122,0)	58,4 (14,3; 78,5)	$P_{1-k}<0,05$ $P_{2-k}<0,05$ $P_{3-k}<0,05$
PDGF	0,28 (0,22; 0,35)	0,34 (0,32; 0,42)	0,38 (0,25; 0,50)	0,32 (0,27; 0,46)	$P_{1-2}<0,05$

Через 6 и 12 месяцев после стентирования уровень VWF в крови пациентов был значимо выше ($p<0,05$) по сравнению с нестентированными пациентами. Также отмечалось значимое повышение ($p<0,05$) концентрации PDGF через 6 месяцев после операции, сохранялась тенденция к повышению концентрации биомаркера через 12 месяцев после стентирования. Отмечали повышение уровня Icam-1 в крови пациентов с ОИМ и после стентирования по сравнению с нестентированными пациентами с хронической ишемической болезнью сердца ($p<0,05$).

Как показывают результаты исследования, стентирование КА является эффективным способом реваскуляризации миокарда, однако не сопровождается нормализацией отдельных патобиохимических процессов. Проведение стентирования КА сопровождается активацией провоспалительного потенциала, выражющееся в увеличении продукции цитокинов IL-1 β и IL-6 в течение 12 месяцев после ЧКВ. В воспалительную реакцию вовлекаются эндотелиальные и гладкомышечные клетки, а также клетки крови. Проведенные исследования маркеров дисфункции эндотелия в сыворотке крови стентированных пациентов с ОИМ свидетельствуют о неспособности эндотелия выполнять защитную функцию, так как измененные эндотелиоциты под воздействием цитокинов экспрессируют тромбогенные

факторы. Стойкое повышение уровня VWF в крови стентированных пациентов указывает на цитолиз эндотелиоцитов и потерю эндотелиальной выстилки.

Локальное воспаление в стенке сосуда характеризуется прежде всего взаимодействием эндотелиоцитов с лейкоцитами посредством участия адгезивных молекул, продуцируемых эндотелием. Icam-1 способствует проникновению через поврежденный эндотелиальный барьер пенистых макрофагов и развитию атеросклероза в стенке артерии. Таким образом, стойкое повышение уровня Icam-1 в крови стентированных пациентов может быть признаком развития неоатеросклеротических процессов.

Тромбоцитарный фактор роста PDGF является одним из регуляторов функциональной активности эндотелия и фактором пролиферации клеток сосудистой стенки. Повышенный уровень PDGF в крови пациентов с ОИМ в течение 12 месяцев после стентирования может свидетельствовать о хронической воспалительной реакции и повреждении эндотелиального барьера.

Заключение. Повышенные уровни провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6, а также маркеров эндотелиальной дисфункции VWF и PDGF у пациентов с ОИМ после стентирования коронарных артерий сохраняются в течение 6–12 месяцев с момента операции.

Список цитированных источников

1. Heart disease and stroke statistics – 2014 update: a report from the American Heart Association / A. S. Go [et al.] //Circulation. – 2014. – Vol. 129. – N 3. – P. 280–292.
2. Neoatherosclerosis: Coronary stents seal atherosclerotic lesions but result in making a new problem of atherosclerosis / H. Komiyama [et al.] //World journal of cardiology. – 2015. – Vol. 7. – N 11. –P. 776.
3. Mazin, I. Neoatherosclerosis – from basic concept to clinical implication / I. Mazin, G. Paul, E. Asher // Thrombosis Research. – 2019. – Vol. 178. – P. 12–16.
4. Evaluation of the peri-strut low intensity area following sirolimus-and paclitaxel-eluting stents implantation: insights from an optical coherence tomography study in humans / H. Otake [et al.] //International journal of cardiology. – 2012. – Vol. 157. – N 1. – P. 38–42.
5. Morphological and Quantitative Analysis of Vascular Wall and Neointimal Hyperplasia After Coronary Stenting – Comparison of Bare-Metal and Sirolimus-Eluting Stents Using Optical Coherence Tomography / I. Goto [et al.] //Circulation Journal. – 2011. – Vol. 75. – N 7. – P. 1633–1640.

Influence of coronary artery stenting on biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction

Vladimirskaya T. E., Adzeriho I. E., Zhilkevich A. V., Rachok S. M., Semenkova G. N., Ustiamchuk A. M.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The study group consisted of 45 patients who were treated in the infarction department of MOCH during 2023, who underwent coronary artery stenting due to acute ST-segment elevation myocardial infarction. Blood

samples were collected from patients before stenting surgery, 6 and 12 months after surgery. The control group consisted of 15 patients with postinfarction cardiosclerosis (PCS). The changes in the content of interleukins 1 β and 6, intercellular adhesion molecule 1, platelet growth factor, Willebrandt factor in the patients' blood were studied by enzyme immunoassay. It was found that the increased levels of proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6, as well as Willebrandt factor and platelet growth factor in patients with acute myocardial infarction after coronary artery stenting persist for 6-12 months after the operation.

Keywords: coronary artery stenting, proinflammatory cytokines, markers of endothelial dysfunction.

Поступила 05.06.2024

УДК 616.132.2-089-06:616.13-004.6:[611.018:576.32/.36+576.385

АПОПТОЗ СОСУДИСТЫХ КЛЕТОК ПРИ НЕОАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЯХ В СТЕНТИРОВАННЫХ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЯХ

Владимирская Т. Э., Адзерихо И. Э., Жилкевич А. В., Рачок С. М., Семенкова Г. Н.

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

Реферат. Для оценки апоптоза в зоне внутристентового атеросклероза были проведены исследования образцов коронарных артерий, взятых на аутопсиях у 11 пациентов с острым инфарктом миокарда, умерших в течение 6–12 месяцев после установки стентов. Исследовались участки коронарных артерий в области стента ($n=45$) и вне зоны стента ($n=63$), изготавливали парафиновые срезы, окрашивали гематоксилином и эозином, TUNEL и иммуногистохимическим методами. Установлено, что в неоатеросклеротических бляшках отмечается значительное снижение интенсивности апоптоза гладкомышечных клеток и макрофагов и активация апоптоза эндотелиальных клеток. Механизмы апоптоза в стентированных и нестентированных участках коронарных артерий различны: при неоатеросклерозе активируется антиапоптотический фактор Bcl-2, при атеросклерозе инактивируется проапоптотический фактор Bax. Активация антиапоптотического фактора Bcl-2 при неоатеросклерозе является неблагоприятным фактором, ведущим к прогрессированию и дестабилизации неоатерогенных повреждений

Ключевые слова: апоптоз, Bax, Bcl-2, неоатеросклероз, нестабильная бляшка, стентирование.

Введение. Атеросклероз коронарных артерий является причиной развития ишемической болезни сердца (ИБС) и, несмотря на достижения современной медицины, занимает лидирующее место в структуре смертности населения во всем мире. На сегодняшний день хирургическое лечение пациентов с ИБС, включающее стентирование коронарных артерий (КА), является широко используемым методом для поддержания правильного кровотока через коронарное кровообращение в миокарде. Однако, при выполнении стентирования могут возникать осложнения, такие как ранний и поздний тромбозы стента, рестеноз и неоатеросклероз в области установки стента

[1,2]. Лекарственные полимерные покрытия стентов также могут способствовать хроническому воспалению и вызывать развитие неоатеросклероза.

Ранние патологоанатомические сообщения о неоатеросклерозе документировали скопление пенистых макрофагов, прилегающих к просветной поверхности стента и без связи с исходным атеросклерозом. В целом процесс неоатеросклероза стента проявляется макрофагальной инфильтрацией и апоптозом и приводит к образованию некротического ядра. Морфологическая картина обнаруженных поражений так же соответствует по строению нестабильной атеросклеротической

бляшке с тонкой покрышкой. Разрыв такой бляшки считается основной причиной острого коронарного синдрома, однако механизмы эволюции неоатеросклеротической бляшки в стентированных коронарных артериях до сих пор недостаточно изучены [3,4]. Одними из факторов, влияющих на стабильность бляшки, является апоптоз сосудистых клеток [5].

Цель работы – оценить апоптоз сосудистых клеток в зоне неоатеросклеротического поражения коронарной артерии

Материалы и методы. Материалом для морфологического исследования были образцы коронарных артерий (КА) со стентами, а также КА без стентов, как группа сравнения. Вскрытие и забор аутопсийного материала осуществлялся на базах УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро» и УЗ «Минское областное патологоанатомическое бюро» спустя 6 месяцев и более после установки стентов. При микроскопическом исследовании КА после извлечения стентов признаки внутристентового атеросклероза обнаружились на аутопсиях у 11 пациентов, у которых проводилось стентирование КА по причине ОИМ с подъемом сегмента ST. Троим пациентам были имплантированы голые металлические стенты (НПС), стенты с лекарственным покрытием (СЛП) имплантированы восьми пациентам. В 100 % наблюдений стентировались инфаркт-связанные коронарные артерии со стенозом 75-90 %. Причиной смерти пациентов после стентирования КА была остшая сердечная недостаточность. Среди умерших было 8 мужчин, средний возраст $63 \pm 6,2$ и 3 женщины, средний возраст $73 \pm 5,1$.

Для гистологического исследования вырезали участки КА в области установки стента ($n=45$) и вне зоны стента ($n=63$). После стандартной гистотехнической обработки материал заливали в парафин, из парафиновых блоков изготавливали срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином, TUNEL и иммуногистохимическим (ИГХ) методами. ИГХ исследование КА проводили с использованием антител к Bcl-2 (Wuhan Elabscience Biotech. Incorp. Comp., Китай) и BAX (Cloud-Clone Corp., США). Для выявления апоптоза клеток коронарной артерии использовали набор TUNEL In Situ Apoptosis Kit (Wuhan Elabscience Biotech. Incorp. Comp., Китай).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010 и Statistica (версия 10,0, StatSoft, Inc., США). Отличные от нормального распределения результаты описывали в виде медианы (Me), интервала между 25 и

75 процентилями. Для определения статистической значимости различий между группами использовали ранговый анализ вариаций Краскела–Уолиса (Н-критерий).

Результаты и их обсуждение. При макроскопическом исследовании тромбоз стента наблюдался в 2 случаях (18,2 %). Нарушения целостности сосудистой стенки (диссекции, перфорации, формирование аневризм) не визуализировались. Не отмечались деформации, фрагментация, переломы каркаса изделия в имплантированных стентах.

При проведении гистологического исследования КА вне зоны стента атероматозные бляшки в большинстве наблюдений (77 %) имели толстую фиброзную покрышку без видимых повреждений, в 37 % наблюдений бляшки были нестабильные – отмечена выраженная клеточная реакция вокруг липидного ядра в атеросклеротической бляшке и очагово в поверхностных слоях покрышки бляшки, истончение и надрывы покрышки бляшки.

При гистологическом исследовании сегментов КА после извлечения стента все бляшки (100 %) имели признаки уязвимости: тонкая фиброзная покрышка, воспалительная инфильтрация покрышки, скопления в ней пенистых макрофагов, надрывы и разрывы фиброзной капсулы, отложения депозитов кальция (рисунок 1). Отмечалась инкапсуляция витков стента с интеграцией капсулы в ткань сосудистой стенки (рисунок 2). Капсула (неоинтима) была выполнена фиброзной или склерозированной тканью, характеризовалась неполной эндотелизацией.

Детекция апоптоза TUNEL-окрашиванием проводилась на срезах КА в участках неоатеросклеротического поражения зоны стента (НСБ), вне зоны стента в стабильных (АСБс) и нестабильных (АСБн) атероматозных бляшках.

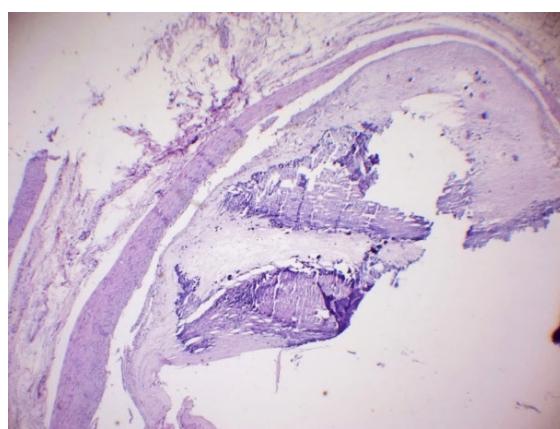
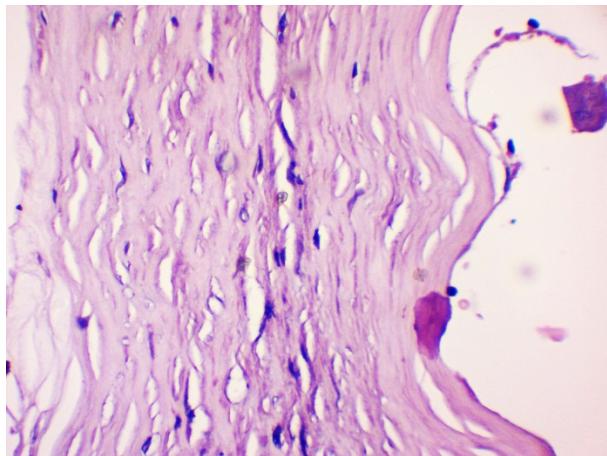


Рисунок 1 – Некротически-дистрофическая кальцинированная уязвимая бляшка, $\times 50$



**Рисунок 2 – Инкапсуляция стента.
На базальной мембране эндотелиальных
клеток, ×400**

Исследование апоптоза показало статистически значимое ($p<0,05$) уменьшение апоптотического индекса (АИ) гладкомышечных (ГМК) и макрофагов (МФ) в стентированных участках КА с неоатеросклеротическими поражениями, по сравнению с нестентированными участками (таблица 1).

АИ для эндотелиальных клеток (ЭК) был значительно ниже в нестабильных бляшках вне зоны стента по сравнению со стабильными. В нестабильных НСБ АИ ЭК был выше на ~47,5 % по сравнению с АСБс и на ~71,4 % по сравнению с АСБн.

Результаты морфометрического исследования экспрессии Bcl-2 и Bax в стентированных коронарных артериях представлены в таблице 2.

Таблица 1 – Интенсивность апоптоза ГМК, МФ и ЭК в стентированных коронарных артериях

Клетки	АИ, %			P Н-критерий
	АСБс	АСБн	НСБ	
	1	2	3	
ГМК	7,2 (0,0; 18,3)	4,1 (0,0; 6,85)	1,85 (0,0; 3,7)	P ₁₋₂ <0,05 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,05
МФ	10,7 (0,0; 18,4)	6,4 (0,0; 10,4)	2,8 (0,0; 5,2)	P ₁₋₂ <0,05 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,05
ЭК	17,8 (9,1; 20,1)	9,7 (3,45; 16,6)	33,9 (19,2; 40,2)	P ₁₋₂ <0,05 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,05

Таблица 2 – Показатели экспрессии Bcl-2 и Bax в стентированных коронарных артериях

Клетки	АИ, %			P Н-критерий
	АСБс	АСБн	НСБ	
	1	2	3	
Bcl-2	26,0 (18,0; 33,5)	28,8 (16,7; 42,2)	41,0 (32,6; 46,5)	P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,05
Bax	27,0 (20,0; 33,1)	11,0 (5,7; 24,3)	6,5 (5,7; 8,6)	P ₁₋₂ <0,05 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,05
Bcl-2/ Bax	1,1 (0,8; 1,4)	1,9 (0,7; 4,8)	5,1 (3,7; 6,8)	P ₁₋₂ <0,05 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,05

Значительное уменьшение проапоптотического белка Bax наблюдали в АСБн по сравнению с АСБс, при этом экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 существенно ($p>0,05$) не менялась.

В НСБ отмечали значительное ($p<0,05$) увеличение Bcl-2 по сравнению с АСБ.

Таким образом, полученные данные показывают, что снижение АИ ГМК, ЭК и МФ в нестентированных участках КА ассоциировалось с

дестабилизацией атероматозных бляшек. В отдельных исследованиях показано, что апоптотические механизмы способны предотвращать некроз [6], следовательно, при ингибировании апоптоза запускается некротический механизм клеточной гибели. Снижение апоптоза МФ и ГМК приводит к распространению некротического детрита, увеличению липидного ядра вследствие накопления пенистых МФ и воспалению. Снижение АИ ЭК связано в большей степени с пролиферацией неапоптотических ЭК новообразованных сосудов нестабильной бляшки, чем с некрозом ЭК покрышки. Еще большее снижение апоптоза МФ и ГМК в неоатеросклеротических бляшках, по-видимому, является неблагоприятным фактором риска развития осложнений бляшки.

Дестабилизация неоатеросклеротической бляшки происходит на фоне значительной активации апоптоза ЭК ($p<0,05$) в отличие от нестентированных участков КА.

В данном случае, уязвимость бляшки может быть обусловлена неполной эндотелиализацией стента, связанной с повышенной гибелью ЭК. Кроме того, ЭК в стентированных КА отличаются повышенной экспрессией фактора Виллебранда, что усиливает тромбогенный потенциал эндотелиальной выстилки [7].

Важным показателем апоптоза является соотношение белков Bcl-2/Bax, которое указывает на гибель или выживание клетки. В стабильных

бляшках Bcl-2/Bax близок к единице, что обеспечивает относительное равновесие клеточного гомеостаза. В нестабильных бляшках вне зоны стентирования ингибирование апоптоза связано со снижением синтеза проапоптотического белка Bax, в неоатеросклеротических бляшках – с повышением ~1,4 раза антиапоптотического белка Bcl-2 и снижением ~1,6 раза проапоптотического белка Bax.

Заключение. В уязвимых неоатеросклеротических бляшках в стентированных коронарных артериях, умерших с острым инфарктом миокарда, отмечается значительное снижение интенсивности апоптоза гладкомышечных клеток и макрофагов и активация апоптоза эндотелиальных клеток.

Механизмы апоптоза в стентированных и нестентированных участках коронарных артерий, умерших с острым инфарктом миокарда, различны: вне зоны стента ингибирование апоптоза реализуется за счет активации проапоптотического белка Bax при неизменной экспрессии антиапоптотического Bcl-2, а при неоатеросклерозе в стене снижение апоптоза в большей степени регулируется активацией антиапоптотического белка Bcl-2.

Активация антиапоптотического фактора Bcl-2 при неоатеросклерозе является неблагоприятным фактором, ведущим к прогрессированию и дестабилизации неоатерогенных повреждений.

Список цитированных источников

1. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model / R. Schwartz [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 1992. – Vol. 19 (2). – P. 267–274.
2. The pathology of neoatherosclerosis in human coronary implants: bare-metal and drug-eluting stents / G. Nakazawa [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2011. – Vol. 57 (11). – P. 1314–1322.
3. Mazin, I./ Neoatherosclerosis—from basic concept to clinical implication / I. Mazin, G. Paul, E. Asher // Thrombosis Research. – 2019. – Vol. 178. – P. 12–16.
4. Morphological and physiological characteristics of ruptured plaques in native arteries and neoatherosclerotic segments: An OCT-based and computational fluid dynamics study / C. Jin [et al.] //Frontiers in cardiovascular medicine. – 2022. – Vol. 9 (890799).
5. Владимирская, Т. Э. Роль апоптоза макрофагов и эндотелиоцитов в дестабилизации атеросклеротических поражений коронарных артерий /Т. Э. Владимирская, И. А. Швед // Здравоохранение. – 2013. – № 1. – С. 15–2.
6. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease / J. N. Weiss [et al.] // Circ. Res. – 2003. – Vol. 93. – P. 292–301.
7. Оценка структурно-функционального состояния эндотелия в стентированных коронарных артериях / Т. Э. Владимирская [и др.] // Здравоохранение. – 2015. – № 5. – С. 7–12.



Vascular cell apoptosis in neoatherosclerotic lesions in stented coronary arteries

Vladimirskaya T. E., Adzeriho I. E., Zhilkevich A. V., Rachok S. M., Semenkova G. N.
Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

To evaluate apoptosis in the zone of intra-stent atherosclerosis, coronary artery samples taken at autopsies from 11 patients with acute myocardial infarction who died within 6-12 months after stent placement were studied. Coronary artery sections in the stent area ($n=45$) and outside the stent area ($n=63$) were studied, paraffin sections were made, stained by hematoxylin and eosin, TUNEL and immunohistochemical methods. It was found that in neoatherosclerotic plaques there is a significant decrease in the intensity of apoptosis of smooth muscle cells and macrophages and activation of apoptosis of endothelial cells. The mechanisms of apoptosis in stented and unstented sections of coronary arteries are different: in neoatherosclerosis the antiapoptotic factor Bcl-2 is activated, in atherosclerosis the proapoptotic factor Bax is inactivated. Activation of anti-apoptotic factor Bcl-2 in neoatherosclerosis is an unfavorable factor leading to progression and destabilization of neoatherogenic lesions.

Keywords: apoptosis, Vach, Bcl-2, neoatherosclerosis, unstable plaque, stenting.

Поступила 05.06.2024

УДК 616:001.895

РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫПОЛНЕНИЯ ПОДПРОГРАММЫ «ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ» ГОСУДАРСТВЕННОЙ ПРОГРАММЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ «ТРАНСЛЯЦИОННАЯ МЕДИЦИНА» (2021–2023 гг.)

Гайн Ю. М., Станкевич С. И., Манаева Н. А., Станкевич В. В.

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

Реферат. Освещаются основные полученные научные и практические результаты выполнения подпрограммы «Иновационные технологии клинической медицины» Государственной программы научных исследований «Трансляционная медицина» в период 2021–2023 гг., направленные на решение актуальных проблем практического здравоохранения.

Ключевые слова: государственная программа научных исследований «Трансляционная медицина», подпрограмма «Иновационные технологии клинической медицины».

Введение. Государственная программа научных исследований (ГПНИ) «Трансляционная медицина» на 2021–2025 гг. сформирована в соответствии с утвержденными приоритетными направлениями научной, научно-технической и инновационной деятельности Республики Беларусь [1]. Создание и внедрение новых эффективных медицинских технологий, включающих разработку эффективных скрининговых программ

раннего выявления патологии, внедрение высокотехнологичных малоинвазивных и органосохраниющих методов лечения социально значимых заболеваний, развитие превентивной прецизионной медицины являются основными целями подпрограммы «Иновационные технологии клинической медицины» (далее – подпрограмма) ГПНИ «Трансляционная медицина» на 2021–2025 годы, утвержденной постановлением Совета

Министров Республики Беларусь от 27.07.2020 № 438 [2].

С 2021 по 2023 гг. головной организацией-исполнителем работ подпрограммы являлось государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (БелМАПО). В настоящее время функцию головной организации-исполнителя работ по подпрограмме выполняет учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет» (БГМУ), являющийся правопреемником БелМАПО после реорганизации.

В период 2021–2023 гг. в подпрограмме выполнялось 2 комплексных задания, в том числе 1 задание по научно-организационному сопровождению, включающие 35 научно-исследовательских работ (НИР). За анализируемый период 22 задания были успешно выполнены. В реализации научных заданий подпрограммы принимали участие 213 исполнителей из 7 государственных научных медицинских организаций.

Финансирование выполняемых НИР подпрограммы осуществлялось преимущественно за счет бюджетных средств. За 3-летний период доля бюджетного финансирования подпрограммы составила 23,4 % от общего объема израсходованных бюджетных средств на выполнение ГПНИ, доля привлеченного внебюджетного финансирования – 21 %.

Результаты и их обсуждение. В результате выполнения подпрограммы разработано и освоено 39 новшеств в виде инструкций по применению новых методов оказания медицинской помощи, рационализаторских предложений, создана 1 лабораторная технология, установлено 14 новых закономерностей и 6 зависимостей, зарегистрировано 5 информационных ресурсов, издано 3 монографии, 9 учебно-методических пособий и справочников, опубликовано 476 научных работ, из них 240 научных статей. Результаты исследований внедрены в практическое здравоохранение, используются для собственных нужд в образовательном процессе медицинских вузов и последипломном образовании. Получено 42 акта о внедрении, в том числе 28 – в практическое здравоохранение.

По итогам реализации НИР за анализируемый период получены следующие важнейшие научные результаты.

В рамках НИР «Разработать метод диагностики легочной гипертензии на ранней

стадии развития» (научные руководители: д.м.н., профессор Адзерихо И. Э., к.б.н., доцент Владимирская Т. Э., БГМУ) установлено усиление провоспалительной активности нейтрофилов на ранней стадии легочной гипертензии (ЛГ), что подтверждается повышенной секрецией во внеклеточное пространство потенциальных индукторов оксидативного стресса, таких как миелопероксидаза и хлорноватистая кислота, а также уменьшением в плазме крови уровня восстановленного глутатиона. Установлено, что у пациентов на ранней стадии развития ЛГ ФК I-II (ВОЗ) индекс одышки по шкале Борг $\geq 1,6$ и тест 6-минутной ходьбы (T6MX) $\leq 347,5$ м. Наиболее информативным биохимическим критерием ЛГ ФК I-II является содержание в сыворотке крови IL-6, PDGF, TGF- β 1, ICAM1, VEGF, FvW и eNOS.

Разработан алгоритм диагностики легочной артериальной гипертензии (инструкция по применению № 105–1123 от 29.12.2023) с целью раннего выявления пациентов с таким жизнеугрожающим состоянием, как легочная гипертензия, что позволяет своевременно начать проведение патогенетической терапии и таким образом значительно увеличить выживаемость пациентов с данной патологией, снизить уровень их инвалидизации (рисунок 1).

Метод внедрен в работу учреждения здравоохранения «Минская областная клиническая больница».

В рамках НИР «Разработать новые методы диагностики и прогнозирования исхода лечения артропатий коленного сустава» (научный руководитель: д.м.н., профессор Герасименко М. А., БГМУ) подобраны специфические пары праймеров и зонды для выявления РНК Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae в синовиальной жидкости и синовиальной ткани пациентов с гонартрозами.

Разработан метод выявления РНК Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae в синовиальной жидкости (инструкция по применению № 041–0521 от 11.06.2021), который обладает высокой аналитической чувствительностью и используется как для оценки эффективности фармакотерапии, так и в качестве дополнительного теста при отрицательных результатах выявления ДНК указанных патогенов в случаях затруднения поиска этиологического агента.

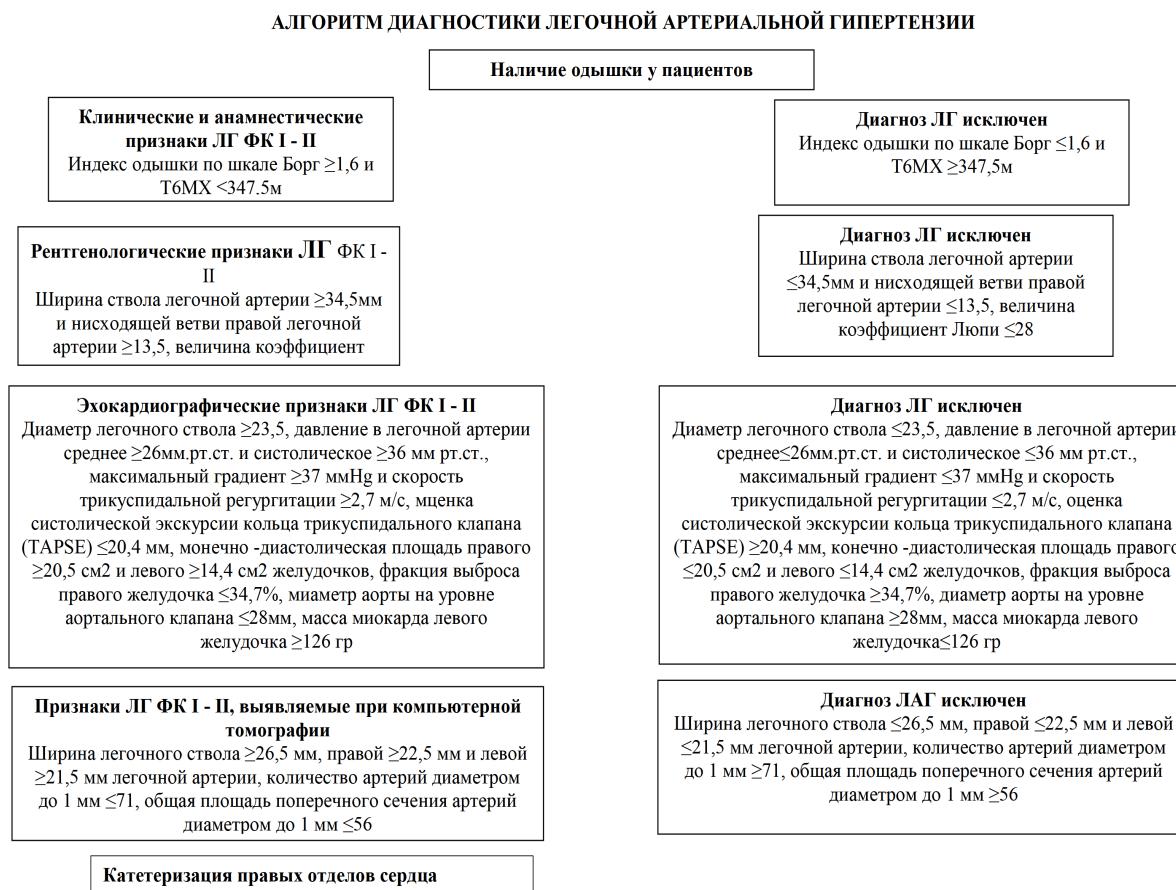


Рисунок 1 – Алгоритм диагностики легочной артериальной гипертензии

Разработан метод медицинской профилактики инфекционных осложнений эндопротезирования коленного сустава (инструкция по применению № 174–1221 от 24.12.2021), основанный на результатах молекулярно-генетических исследований по выявлению латентной низковирулентной микрофлоры в синовиальной жидкости. Разработана оптимальная методика получения аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, заключающаяся в сочетании центрифугирования при 500g 3 мин с последующим центрифугированием при 1500g 4 мин, использование которой позволяет получить препарат, содержащий тромбоциты в количестве 2467 (2210/2729) × 10⁹/л (рисунок 2).

Результаты НИР внедрены в образовательную деятельность при подготовке специалистов травматологического профиля и работу научно-исследовательской лаборатории БелМАПО, в медицинскую деятельность учреждения здравоохранения «Минская областная клиническая больница», государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии».

В рамках НИР «Разработать метод лечения пациентов с синдромом обструктивного апноэ сна и храпом с использованием индивидуального внутриротового устройства» (научный руководитель: д.м.н., профессор, член-корр. Национальной академии наук Беларуси Рубникович С. П., БГМУ) разработан метод определения состояния челюстно-лицевой области и верхних дыхательных путей на основании данных конусно-лучевой компьютерной томографии.

Создан метод лечения синдрома обструктивного апноэ во сне с использованием внутриротового стоматологического устройства.

Разработан клинический протокол диагностики и лечения апноэ и храпа на клиническом приеме врача стоматолога-ортопеда по МКБ-10: «R06.5 Дыхание через рот (храп), G47.32 Синдром обструктивного апноэ/гипопноэ во сне (СОАС)».

Разработана компьютерная программа Апноэ-Бел, позволяющая провести анализ состояния челюстно-лицевой области и верхних дыхательных путей (рисунок 3).

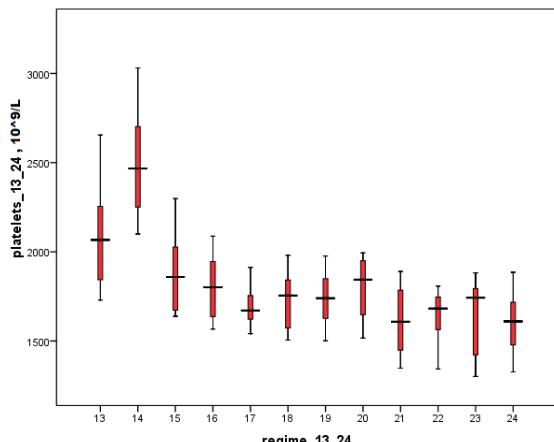


Рисунок 2 – Содержание тромбоцитов периферической крови при использовании режимов центрифугирования:
первое – от 500г 2 мин до 500г 5 мин;
второе – от 1500г 5 мин до 2500г 2 мин



Рисунок 3 – Результаты работы программы по оценке геометрических параметров выделенного участка верхних дыхательных путей

Результаты работы внедрены в учебный процесс БелМАПО, БГМУ, учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» при подготовке специалистов стоматологического профиля, в работу коммунального унитарного предприятия «Клиника эстетической стоматологии». Разработки представлены на выставочной экспозиции ВДНХ г. Москвы.

В рамках НИР «Установить спектр мутаций эпителия у пациентов с лейкоплакией слизистой оболочки рта» (научный руководитель: д.м.н., профессор Карпук И. Ю., ВГМУ) установлены высокопатогенные генетические

варианты (соматические мутации): APC (p.Glu853Ter, p.Gln1378Ter), TP53 (p.Arg248Gln), MSH2 (p.Arg406Ter), PTEN (p.Gly293Ter), MSH3 (p.Lys383ArgfsTer32), MSH6 (p.Phe1088LeufsTer5), KRAS (p.Gly13Asp, p.Gly12Asp), ERCC3 (p.Arg425Ter), SMARCA4 (p.Thr859Met), с высокой вероятностью являющиеся непосредственной причиной формирования плоскоклеточного рака слизистой оболочки рта (СОР). Данные генетические варианты имеют высокую клиническую значимость (рисунок 4).

Выявлены вероятно патогенные варианты – PIK3CA (p.Glu545Lys, p.Gln546His), KRAS (p.Gln61His), TP53 (p.Gln167Ter), HOXB13 (p.Gly84Glu), PTCH1 (p.Asn1392ThrfTer60), NOTCH3 (p.Arg207Ser), SDHA (p.Leu649GlufsTer4). Данные генетические варианты с высокой вероятностью ассоциированы с дисплазией эпителиальных клеток СОР и развитием лейкоплакий СОР, ввиду чего имеют меньшую клиническую ценность с позиции прогнозирования или лабораторного подтверждения злокачественной трансформации лейкоплакий (рисунок 5).

Сформирована база клинически значимых мутаций генома при лейкоплакиях с плоскоклеточной интраэпителиальной неоплазией 1-й степени эпителия СОР и при плоскоклеточном раке СОР.

Разработан метод прогнозирования злокачественной трансформации лейкоплакий слизистой оболочки рта (инструкция по применению № 051–0621 от 11.06.2021).

Результаты работы внедрены в учебный процесс учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», БГМУ, в учреждения здравоохранения «39-я городская поликлиника» г. Минска и «30-я городская поликлиника» г. Минска.

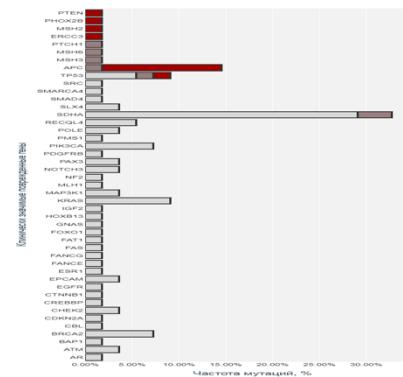


Рисунок 4 – Последствия выявленных мутаций и их сравнительная частота

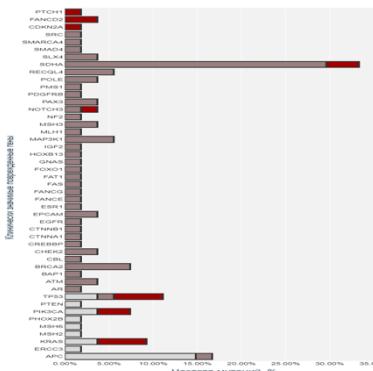


Рисунок 5 – Основные гены, варианты которых были выявлены в ходе биоинформационного анализа

В рамках НИР «Разработать метод стимуляции раневого заживления» (научный руководитель: д.м.н., доцент Федягин С. Д., БГМУ) установлено, что скорость заживления раневых дефектов в 1,83 раза достоверно выше при

применении аутомиелоаспираторов ($p<0,05$). Кроме того, аутологичные аспиры костного мозга обладают мощным регенераторным потенциалом и сокращают длительность 2-й фазы раневого процесса у пациентов с хроническими ранами на 7 дней.

Установлено, что аутологичные аспиры красного костного мозга благоприятно влияют на заживление хронических ран после непрямой реvascularизации нижних конечностей у пациентов с диабетической ангиопатией, способствуя заживлению раневых дефектов в 70 % случаев.

Установлено, что аутологичные аспиры красного костного мозга увеличивают интенсивность экспрессии маркеров Ki67 у женщин, CD68 и снижают экспрессию CD16, что характеризует стимуляцию регенераторных процессов в ранах.

Полученные данные легли в основу разработки метода стимуляции раневого заживления (инструкция по применению № 106–1021 от 24.12.2021) (рисунок 6).



А



Б



В

Рисунок 6 – Раневая поверхность:

А – 6-е сутки после введения аутологичного аспираата красного костного мозга; Б – 12-е сутки после введения аутологичного аспираата красного костного мозга; В – вид голени через 2 года после операции

Внедрение метода в практическое здравоохранение позволяет сократить сроки госпитализации пациентов на 13 койко-дней и снизить летальность на 5,3 %. Метод успешно внедрен в работу учреждений здравоохранения «Витебская областная клиническая больница», «Витебская городская центральная клиническая больница», «Витебская городская клиническая больница № 1», «4-я городская клиническая больница им. Н. Е. Савченко» г. Минска; «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи» г. Минска, в учебный процесс учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, БелМАПО». По результатам исследования успешно защищена и утверждена Высшей аттестационной

комиссией Республики Беларусь докторская диссертация Федянина С. Д.

В рамках НИР «Разработать метод медицинской профилактики неврологических нарушений в грудном и раннем возрасте у недоношенных детей» (научный руководитель: к.м.н., доцент Жевнеронок И. В., БГМУ) исследована роль гестации в последующих неврологических нарушениях недоношенных детей в возрасте 2 лет, выполнен ROC-анализ. Установлено, что при отсутствии комплексного лечения с включением в абилитацию препаратов кофеина и карнитина хлорида в неонатальном периоде исход хуже и не зависит от гестационного возраста при сроке рождения до 32 недель ($p<0,001$). При включении в лечение препаратов кофеина и карнитина

хлорида в неонатальном периоде исходы неврологического развития улучшались и значимо зависели от возраста гестации при рождении, с максимальной эффективностью при рождении 32 недели и выше ($p<0,001$) (рисунок 7).

Разработана Шкала рисков неврологических нарушений в раннем возрасте у недоношенных новорожденных, на основании которой можно выделить различные группы риска и назначить дифференцированную терапию и реабилитацию, которая используется для медицинской профилактики неврологических нарушений в грудном и раннем возрасте у недоношенных детей с различным сроком гестации (рисунок 8).

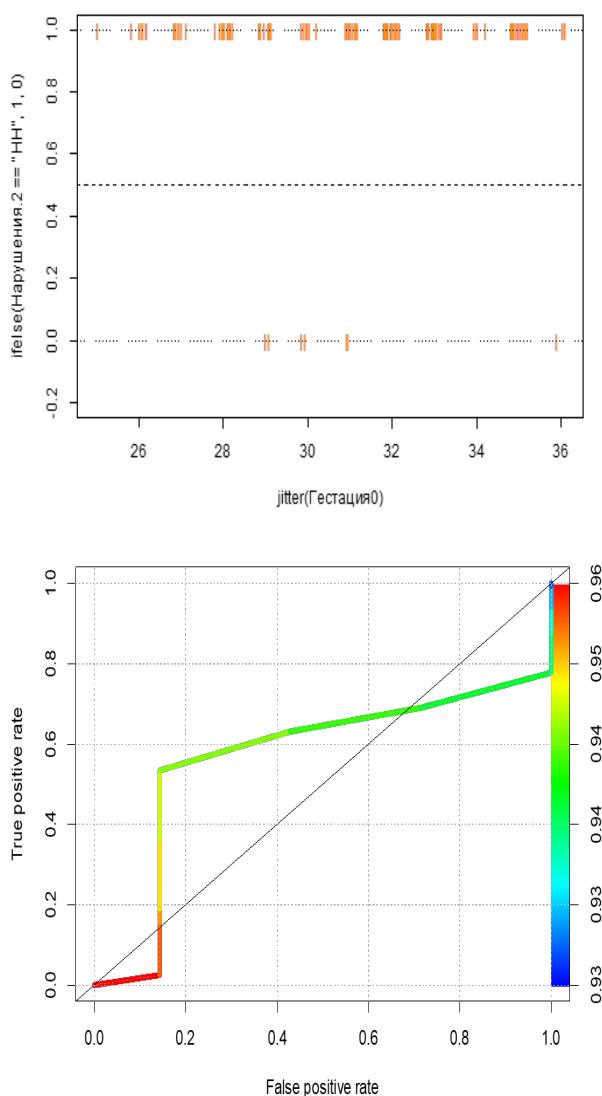


Рисунок 7 – Зависимость неврологических нарушений недоношенных детей в возрасте 2-х лет от срока гестации

Признак	3 балла	2 балла	1 балл	0
Срок гестации, нед	31 и менее	32 - 34	35 - 37	доношенный
ИВЛ, дни	Более 7	3 - 6	1 - 3	Не нуждался
pH	7,1 и менее	7,1 - 7,25	7,26 - 7,3	норма
ВУИ	сепсис	инфекция НС	Вр. пневмония	Нет ВУИ
ВЧК	ВЖК 3-4	ВЖК 2	ВЖК 1	Нет ВЧК
Поражение белого вещества	ПВЛ 2	ПВЛ 1	Повышение сигнала более 2-х недель	Нет структурных изменений
IR (ПМА)	0,78 и выше	0,74 - 0,77	0,7 - 0,73	норма
Судороги	2 и более	однократно	готовность	нет
Рефлексы	Атония, арефлексия, угнетены	высокие	повышенны	соответствуют

Рисунок 8 – Шкала рисков неврологических нарушений в раннем возрасте у недоношенных новорожденных

Разработан метод медицинской профилактики неврологических нарушений, включающий применение лекарственных препаратов кофеина и левокарнитина, улучшающих исход нейромоторного развития в отдаленном периоде; разработан метод медицинской профилактики неврологических нарушений у недоношенных детей» (инструкция по применению № 116–1123 от 23.11.2023) на основе клинических, нейрофункциональных, нейровизуализационных, иммuno-логических, молекулярно-биологических факторов риска неврологических нарушений у недоношенных детей с различным сроком гестации, который используется в комплексе медицинских услуг, направленных на снижение количества неблагоприятных исходов перинатального поражения у недоношенных детей. Метод внедрен в учебный процесс БГМУ, БелМАПО, в работу государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя».

В рамках НИР «Разработать метод прогнозирования осложнений при химиотерапии острых лимфобластных лейкозов у детей» (научные руководители: д.м.н., доцент Климкович Н. Н., д.м.н., профессор Костюк С. А., БГМУ) установлена частота выявления различных вариантов генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 у детей с острыми лимфобластными лейкозами и у взрослых пациентов с острым миелобластным лейкозом. Установлено наличие ассоциации полиморфных вариантов генов цитохрома P450 с частотой развития токсических осложнений 3–4-й степени на фоне полихимиотерапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), превышающей таковую от 6 до 17 раз по сравнению с носителями аллеля дикого типа. Вероятность развития аллергических реакций в виде бронхоспазма и анафилаксии в 9 раз выше при наличии мутантного аллеля TT (полиморфизм C-1053T

(rs2031920)) в гене CYP2E1; острого панкреатита – в 6 раз выше при наличии гетерозиготного аллеля A/del (полиморфизм A2549del (rs35742686)) в гене CYP2D6; гипергликемии выше 13,9 ммоль/л – в 17 раз выше при наличии мутантного аллеля del/del (полиморфизм A2549del (rs35742686)) в гене CYP2CD6.

Разработана модель риска развития токсических осложнений 3–4-й степени при лечении ОЛЛ в зависимости от вариантов генотипа генов CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6. Чувствительность модели для риска развития панкреотоксических осложнений составила 80,1 %, специфичность – 89,7 %, точность – 88,9 %. Для риска развития гипергликемии выше 13,9 ммоль/л чувствительность модели – 78,1 %, специфичность – 96,6 %, точность – 92,1 %. Для риска развития аллергических осложнений 3–4-й степени чувствительность модели составила 67,0 %, специфичность – 72,4 %, точность – 69,8 % (рисунок 9–11).

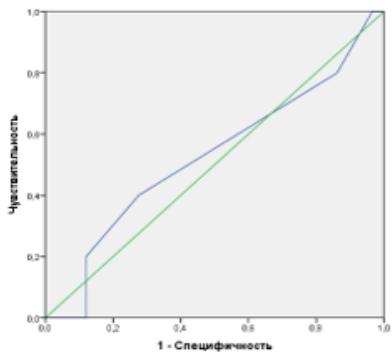


Рисунок 9 – ROC-анализ оценки риска развития аллергических реакций 3–4-й степени (бронхоспазм, анафилаксия) на фоне полихимиотерапии ОЛЛ у детей

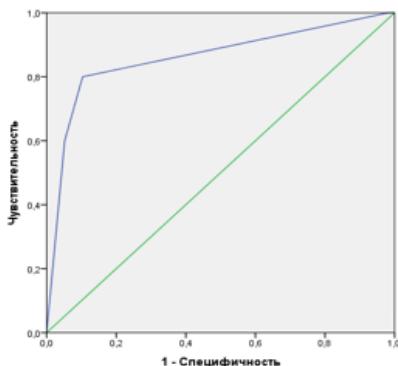


Рисунок 10 – ROC-анализ оценки риска развития токсического панкреатита 3–4-й степени токсичности на фоне полихимиотерапии ОЛЛ у детей

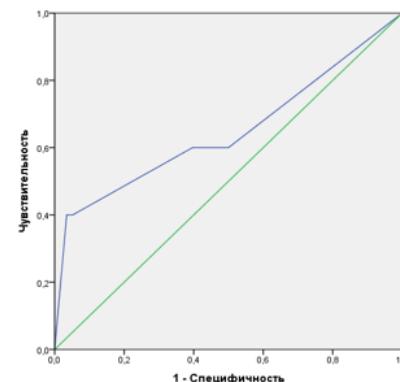


Рисунок 11 – ROC-анализ оценки риска развития гипергликемии выше 13,9 ммоль/л на фоне полихимиотерапии ОЛЛ у детей

Разработан метод оценки вероятности развития токсических осложнений 3–4-й степени при лечении острого лимфобластного лейкоза у детей (инструкция по применению № 091–0923 от 29.04.2023), внедрение которого в медицинскую практику способствует уменьшению количества госпитализаций в отделение круглосуточного пребывания и отделение реанимации по поводу эпизодов токсических осложнений с 3,8 до 1,3 раз в год, а также сокращению средних сроков стационарного лечения с 18,7 до 10,6 койко-дней.

В рамках НИР «Разработать метод хирургического лечения пациентов с осложненной дивертикулярной болезнью ободочной кишки» (научные руководители: д.м.н., профессор, член-корр. Национальной академии наук Беларусь Воробей А. В.; д.м.н., профессор Констюк С. А., БГМУ) установлены молекулярно-микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристики различных тканей ободочной кишки пациентов с дивертикулярной болезнью: выявлены факторы риска развития дивертикулярной болезни ободочной кишки, ее осложнений и рецидивов; выявлены изменения уровней нормализованной экспрессии генов, участвующих в формировании соединительной ткани, приводящие к нарушению строения экстрацеллюлярного матрикса, снижению его эластичности, деструкции и деградации, сопровождающиеся воспалением (рисунок 12).

Разработан метод хирургического лечения осложненной дивертикулярной болезни и ликвидации колостом, который апробирован на пациентах Республиканского центра реконструктивной хирургической гастроэнтерологии и колопроктологии. Внедрение данного метода в практическое здравоохранение позволяет снизить

вероятность несостоительности колоректальных анастомозов и улучшить реабилитационный потенциал данной категории пациентов, а также сократить средние сроки стационарного лечения с 21 до 17 койко-дней.

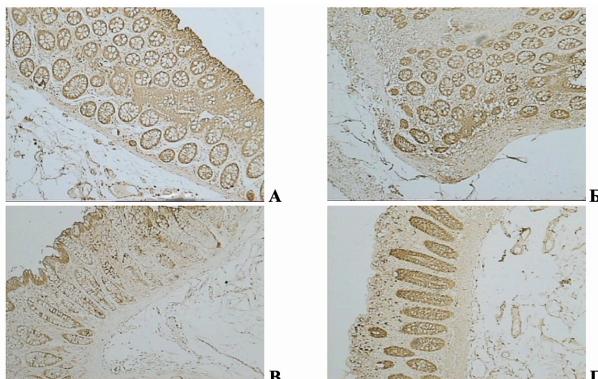


Рисунок 12 – Экспрессия Galectin 3 в ободочной кишке. ИГХ-окрашивание с АТ к Galectin 3, $\times 100$:

- А – Экспрессия Galectin 3 стенки кишки в зоне дивертикула без осложнения;
- Б – Экспрессия Galectin 3 стенки кишки в зоне осложненного дивертикула;
- В – Экспрессия Galectin 3 стенки кишки без дивертикула;
- Г – Экспрессия Galectin 3 стенки кишки контроля

В рамках НИР «Оптимизировать антибактериальное лечение пациентов с сепсисом, вызванным *Klebsiella pneumoniae*» (научные руководители: к.м.н., доцент Горбич Ю. Л., д.м.н., профессор Костюк С. А., БГМУ) установлено, что все изоляты карбапенем-резистентных *Klebsiella pneumoniae*, выделенные от пациентов, относились к экстремально-резистентному фенотипу (XDR). В изученных бактериальных культурах *K. pneumoniae* ($n=348$) установлена высокая частота выявления генетических детерминант устойчивости blaOXA-48, blaKPC, blaNDM (93,10 %, $n=324$) (рисунки 13–16). Молекулярно-генетические маркеры устойчивости к колистину (увеличение уровня нормализованной экспрессии генов (PhoQ и/или pmrK) и/или изменение структуры гена mgrB) были выявлены в 149 образцах (95,51 %).

Подготовлен проект клинического протокола «Диагностика и лечение пациентов с сепсисом», включающий антибактериальное лечение пациентов с сепсисом, вызванным *Klebsiella pneumoniae*, который позволяет своевременно выявлять пациентов инфицированных антибиотикорезистентными штаммами возбудителя, что

позволяет быстро корректировать лечебную тактику и назначать антибактериальные лекарственные средства в зависимости от профиля генетических маркеров устойчивости возбудителя, чем достигается уменьшение количества госпитализаций в отделении реанимации и интенсивной терапии по поводу осложнений сепсиса и септического шока с 2,6 до 1,4 раз в год, а также сокращение средних сроков стационарного лечения с 45,7 до 36,2 койко-дней.

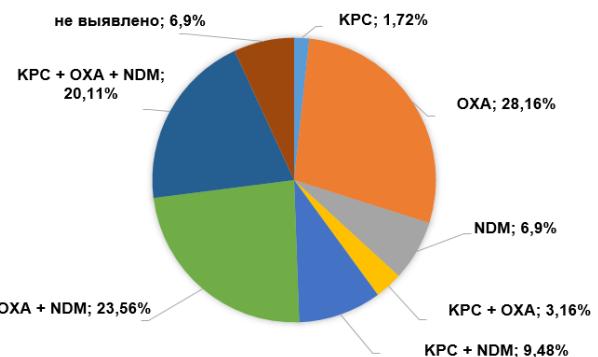


Рисунок 13 – Результаты выявления генетических детерминант устойчивости к карбапенемам в бактериальных культурах *K. pneumoniae*

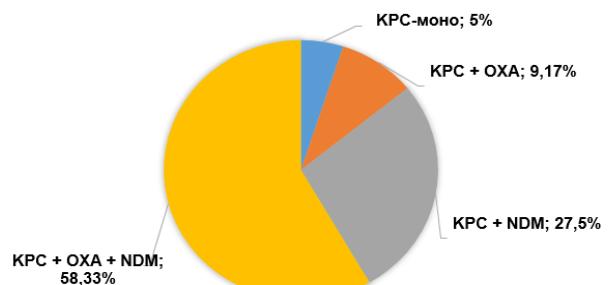


Рисунок 14 – Результаты выявления гена blaKPC в бактериальных культурах *K. pneumoniae*

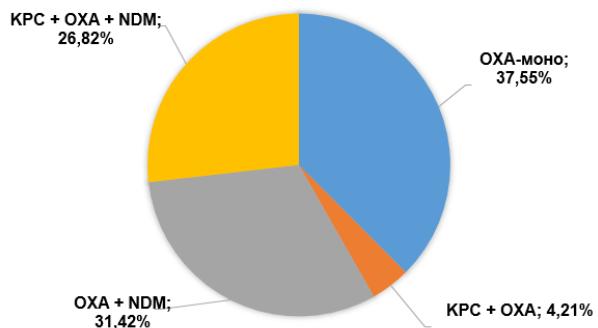


Рисунок 15 – Результаты выявления гена blaOXA-48 в бактериальных культурах *K. pneumoniae*

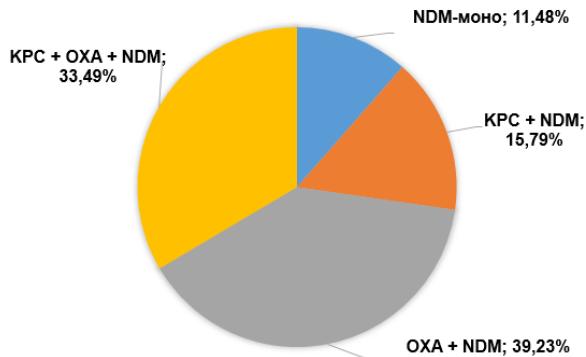


Рисунок 16 – Результаты выявления гена blaNDM в бактериальных культурах *K. pneumoniae*

Заключение. Результаты научно-исследовательских работ в рамках заданий подпрограммы «Инновационные технологии

клинической медицины» ГПНИ «Трансляционная медицина» на 2021–2025 гг. направлены на разработку инновационных методов медицинской профилактики, наукоемких методов диагностики и лечения, углубленного изучения патогенеза и разработку методов коррекции патологических состояний, внедрение новых подходов и технологий в практическое здравоохранение, что позволит повысить качество и доступность медицинской помощи, увеличить продолжительность и качество жизни, сохранить и укрепить здоровье населения Республики Беларусь.

Наиважнейшим результатом выполнения подпрограммы «Инновационные технологии клинической медицины» ГПНИ «Трансляционная медицина» является обеспечение тесной связи между наукой, образованием и медицинской практикой.

Список цитированных источников

1. О приоритетных направлениях научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы: Указ Президента Республики Беларусь № 156 от 7 мая 2020 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pravo.by> (Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь). – Дата доступа: 16.04.2024.
2. О перечне государственных программ научных исследований на 2021–2025 годы: постановление Совета Министров Республики Беларусь № 438 от 27 июля 2020 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pravo.by> (Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь). – Дата доступа: 10.05.2024.

Results of implementation of the subprogram “innovative technologies of clinical medicine” of the state research program “Translational medicine” (2021–2023)

*Gain Yu. M., Stankevich S. I., Manayeva N. A., Stankevich V. V.
Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

The main scientific and practical results obtained from the implementation of the subprogram “Innovative Technologies of Clinical Medicine” of the State Research Program “Translational Medicine” in 2021–2023 and aimed at solving current interests of practical healthcare are covered.

Keywords: State scientific research program “Translational Medicine”, subprogram “Innovative Technologies of Clinical Medicine”.

Поступила 05.06.2024

УДК 612.13 + 004.921

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ЧИСЛЕННОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ГЕМОДИНАМИКИ ОТРЕЗКА СОСУДА

Гольцов М. В., Мансуров В. А., Рагунович Л. Д.

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

Реферат. В работе рассматривается визуализация гемодинамических процессов в виртуальной численной модели гемодинамики, изучение которой представляет значительную трудность при подготовке медицинских специалистов, а также применения полученных моделей в целях прогноза динамики медико-биологических процессов и в учебном процессе при подготовке специалистов в области медицины. В данных моделях учитывается такой важный параметр гемодинамики, связанный с атеросклеротическими явлениями, как напряжение сдвига на стенке сосуда, существенно зависящее от геометрии сосудистого русла.

Ключевые слова: гемодинамика, численное моделирование, напряжение сдвига на стенке сосуда, атеросклероз.

Введение. В настоящее время одним из важнейших требований современной медицины является высокий уровень квалификации персонала медицинских организаций. Владение этими специалистами необходимыми знаниями, умениями и навыками, формирующими профессиональные компетенции, позволяют им качественно оказывать медицинские услуги населению, выполнять свои должностные обязанности. Уровень подготовки данных специалистов во многом определяется и зависит от наличия доступных и эффективных систем, форм и средств обучения, реализующих максимально приближенные к реальности примеры медицинских процессов и явлений.

Постижение гемодинамических процессов, определяющих движения крови в сосудистом русле, представляет значительную трудность при подготовке медицинских специалистов, поскольку эти процессы зависят от многих факторов, которые находятся в неразрывной связи, а именно: реологические свойства крови; механика сердечного сокращения; упругие свойства стенок различных сегментов сосудов; артериальное и венозное давление; механизмы управления гемодинамикой, ее адаптивной регуляцией.

Цель работы – создание реалистичных численных моделей гемодинамики, которые будут служить основой для эффективного, реалистичного взаимодействия пользователей с объектами и средой моделирования на основе программно-аппаратных решений. В этих моделях

необходимо учитывать важный показатель гемодинамики – напряжение сдвига на стенке сосуда, которое существенно зависит от геометрии сосудистого русла и связано с атеросклеротическими явлениями. Применить полученные модели возможно в целях прогноза динамики медико-биологических процессов и в учебном процессе подготовки специалистов в области медицины. Для визуализации гемодинамических процессов планировалось разработать виртуальные объекты, соответствующие реальным объектам.

Материалы и методы. *Виртуальная реальность.* Для достижения поставленной цели созданы и обоснованы предпосылки разработки численных медико-биологических моделей для использования их в системах виртуальной реальности, которая в настоящее время все больше и больше используется для решения практических задач медицины, а также на этапах подготовки медицинских специалистов. Объекты виртуальной реальности обычно ведут себя близко к поведению аналогичных объектов материальной реальности. Пользователь может воздействовать на эти объекты в согласии с реальными законами физики. Виртуальная реальность широко используется в медицинских целях. Она позволяет врачам-специалистам получать трехмерную информацию, что значительно повышает уровень качества оказания медицинских услуг. Основой для создания объектов виртуальной реальности является численное моделирование изучаемого объекта и процессов, происходящих в нем.

Виртуальная модель отрезка сосуда. Геометрия модели соединения передней соединительной артерией средней мозговой артерии и передней мозговой артерий состоит из трех соединяющихся каналов и различного сечения, которые переходят в один канал. Эти каналы ограничены упругой стенкой. В концах соединяющихся каналов под действием давления движется поток жидкости, в конце одиночного канала предполагается, что давление равно нулю. На стенках канала создается механическое напряжение, возникающее в результате вязкого сопротивления и давления жидкости (рисунок 1).

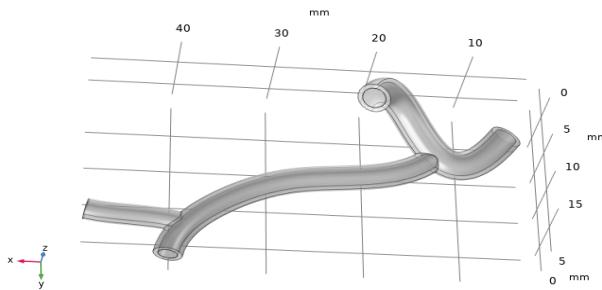


Рисунок 1 – Использованная геометрическая модель

Для расчетов использованы значения модуля упругости Юнга, вязкости крови, приведенные в научной литературе. В результате численного моделирования создается виртуальный объект с известной геометрией и заданными свойствами, который является аналогом реального объекта. Для обсуждаемого объекта свойствами являлись: механика – модуль упругости сосудистой стенки E , коэффициент Пуассона ν и реология – свойства текущей среды, описанные моделью Кросса (μ_0 – начальная вязкость, μ_∞ – конечная вязкость, n – индекс течения) [1].

Численное моделирование. Основным методом моделирования взаимодействия течения с упругой стенкой сосуда был метод конечно-разностного интегрирования уравнения Навье-Стока и условий механического равновесия сосудистой стенки для связанных задач расчета течения вязкой жидкости и деформации упругой среды. Поток жидкости может деформировать стенку, поэтому для численного моделирования профиля течения в непрерывно деформируемой геометрии необходимо использовать метод Лагранжа-Эйлера (ALE – arbitrary Lagrange-Euler). Метод ALE использует динамику деформирующей геометрии и движущихся границ с помощью движущейся сетки (moving mesh). Стенка канала является деформируемым материалом, который может упруго деформироваться под воздействием

нагрузки. Следовательно, поток жидкости также следует новому пути, поэтому течение в исходной геометрии будет отличаться от течения деформируемой геометрии [2].

Трансформация результатов численного моделирования для анализа и визуализации. Сценарии трансформации скалярных и векторных полей результатов исследований, проведенных на основе медико-биологических моделей, представляют собой важный инструмент для анализа и визуализации полученных данных. При использовании таких сценариев происходит переход от исходного пространства исследования к новому представлению данных в виде виртуального объекта с неструктурируемой сеткой. В результате получается новый набор данных, содержащий информацию о точках, их координатах, свойствах и их связях.

Далее следует этап трансформации облака точек в форматы, удобные для визуализации. Это включает в себя изменение структуры данных и представление информации в таком виде, чтобы она могла быть эффективно отображена на экране или других устройствах вывода. На этом этапе также проводится фильтрация и обработка данных, чтобы убрать шумы или сглаживать значения. Это позволяет более наглядно представить результаты и получить новые инсайты из существующих медико-биологических моделей.

Неструктурируемая сетка. Интерполяция Делоне. Интерполяция Делоне основана на понятии триангуляции Делоне – это деление плоскости на непересекающиеся треугольники, которые полностью охватывают заданный набор точек. Принцип интерполяции Делоне заключается в том, что для заданных исходных данных, например, значений функции в некоторых точках, находится такая функция, которая в этих точках совпадает с исходной и достаточно гладкая на остальной плоскости. Метод достигается путем аппроксимации исходных данных с использованием треугольной сетки, создаваемой триангуляцией Делоне [3].

Одним из преимуществ интерполяции Делоне является ее высокая точность и эффективность. Однако следует отметить, что интерполяция Делоне также имеет некоторые ограничения и особенности. В некоторых случаях может возникнуть проблема прокола, когда создание треугольной сетки и поиск соседних точек становятся трудозатратными задачами.

Влияние патологий на гемодинамику в виртуальной модели. Гипертензия – сложный патофизиологический процесс. Особенно развитые формы гипертензии обычно связаны с

сосудистыми повреждениями, и эти повреждения служат причиной изменения гемореологического статуса. Ухудшение гемореологических показателей приводит к изменению гемодинамики по причине увеличения давления, связанного с увеличением периферического кровообращения. *Диабет* – еще одно важное заболевание, которое сопровождается общими циркуляторными нарушениями, увеличением вязкости крови и плазмы, нарушениями агрегации эритроцитов и изменением эритроцитарной деформируемости [4, 5]. Наиболее сильные изменения общего гомеостаза происходят при *сепсисе*. При этом обнаруживаются значительные изменения гемореологических показателей при этом заболевании. И клинические и лабораторные исследования указывают, что сепсис характеризуется значительным ухудшением деформируемости эритроцитов и усилением агрегативной способности [6]. Такие изменения в эритроцитах могут оказать значительное влияние на сосудистые проблемы, встречающиеся при сепсисе. Также необходимо отметить *гематологические заболевания*, в которых гемореологические изменения могут служить причиной проблем тканевой перфузии. Серповидная анемия является наиболее ярким примером, для которого клинические проявления могут быть непосредственно отнесены к сильным реологическим изменениям в эритроцитах и, следовательно, гемодинамическим изменениям.

Не только патологические процессы, но и *физиологические условия* могут быть также охарактеризованы изменением гемореологических показателей. Интенсивные утомительные физические упражнения оказывают значительное влияние на гемореологические параметры [7].

Визуализация наиболее значимых морфологических участков. В рассматриваемом отрезке сосудов можно выделить две представляющих интерес бифуркации (рисунок 2).

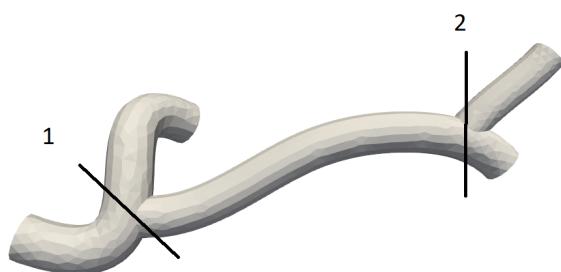


Рисунок 2 – Участки бифуркации в использованной геометрической модели

Для сечений этих компонентов выполнена визуализация скоростей течения, градиента скорости и напряжения, возникающее в стенке этих сосудов. Рассматривается градиент скорости (формула 1) в двух бифуркациях данного отрезка сосудов. Градиент скорости – важнейший параметр, характеризующий условия течения, определяющих гемодинамику в этом отрезке и является одной из главных причин атеросклероза [1]:

$$\dot{\gamma} = \Delta v / \Delta x, \quad (1)$$

где $\dot{\gamma}$ – градиент скорости; v – вектор скорости течения в данной точке; x – поперечная координата.

В классическом представлении напряжение сдвига (shear stress) – это сила, прикладываемая к верхнему слою текущей жидкости, вызывающая смещение нижележащих слоев относительно друг друга в направлении прикладываемой силы. При этом разность в скорости движения слоев по отношению к глубине их залегания определяется градиентом скорости (формула 2):

$$\tau_w = \eta \cdot \frac{\Delta v}{\Delta x} \Big|_{x=r_w}, \quad (2)$$

где τ_w – напряжение сдвига на стенке сосуда; η – вязкость при заданном градиенте скорости; v – вектор скорости течения в данной точке; x – поперечная координата; r_w – размер сосуда.

Для всех рассматриваемых бифуркаций в месте соединения отрезков бифуркации возникает выпуклая деформация сосудистой стенки, что является причиной изменения гемодинамики. Для анализа результатов использовалось максимальное напряжение фон Мизеса. Максимальное напряжение по Мизесу основывается на теории Мизес–Хенки (Mises–Hencky), также известной как теория энергии формоизменения (формула 3).

$$\sigma_{\text{vonMises}} = \sqrt{\frac{[(\sigma_1 - \sigma_2)^2 + (\sigma_2 - \sigma_3)^2 + (\sigma_1 - \sigma_3)^2]}{2}}, \quad (3)$$

где σ_{1-3} – главные напряжения тензора напряжений.

Теория утверждает, что пластичный материал начинает повреждаться в местах, где напряжение по Мизесу становится равным предельному напряжению.

Инструменты визуализации результатов численного моделирования. Большую пользу для

визуализации может оказать программный пакет PyVista (ранее VTK) – это адаптируемый вспомогательный модуль и API высокого уровня для набора инструментов визуализации (VTK).

Этот пакет имеет оптимизированный интерфейс для VTK, который обеспечивает анализ сетки на основе Python и построение трехмерных фигур. PyVista используются для выполнения 3D-интерполяции с изменяемым параметром альфа, который управляет расстоянием между двумя смежными точками.

В данной работе применялся ParaView – открытый графический кроссплатформенный пакет для интерактивной визуализации в исследовательских целях, разрабатываемый Национальной Лабораторией Сандиа, компанией Kitware и Национальной Лабораторией Лос-

Аламоса. Пакет ParaView предоставляет пользователю возможности интерактивной визуализации и исследования больших массивов данных для качественного и количественного анализа.

Результаты и их обсуждение. Методом конечно-разностного численного моделирования были произведены расчеты зависимости абсолютной деформации стенки сосуда для 3D моделей соединения передней соединительной артерией средней мозговой артерии и передней мозговой артерий (рисунки 3–5).

На рисунках 6–11 приведены скорости течения градиента скорости и напряжения фон Мизеса для бифуркаций, представленных на рисунке 2.

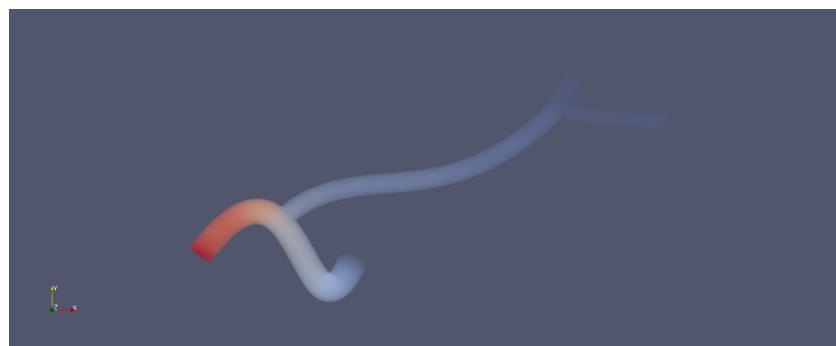


Рисунок 3 – Распределение давления в использованной геометрической модели

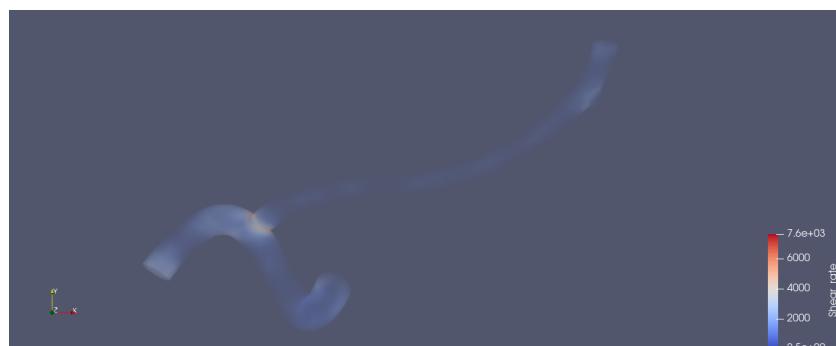


Рисунок 4 – Градиент скорости на стенках использованной геометрической модели

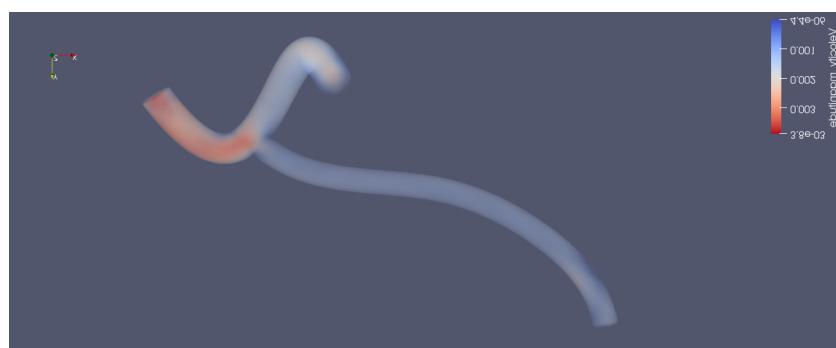


Рисунок 5 – Скорость течения в использованной геометрической модели

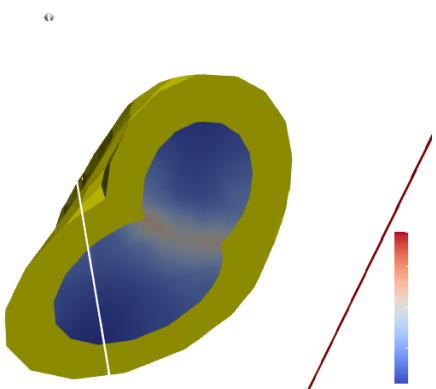


Рисунок 6 – Градиент скорости течения для бифуркации 1

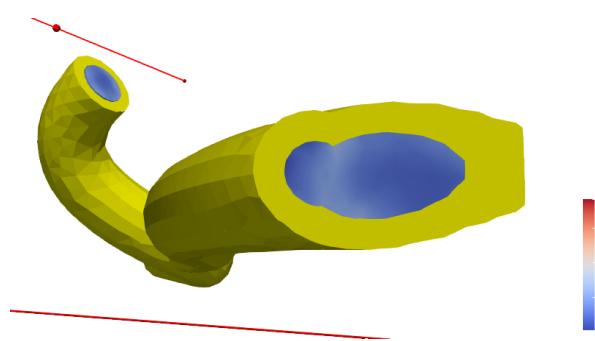


Рисунок 9 – Градиент скорости течения для бифуркации 2

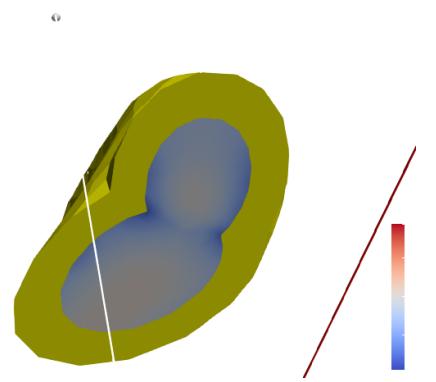


Рисунок 7 – Скорость течения для бифуркации 1

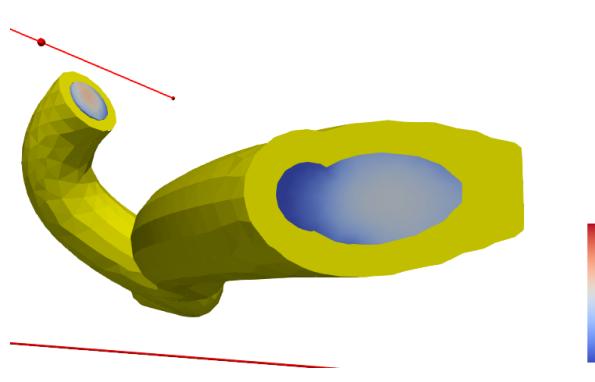


Рисунок 10 – Скорость течения для бифуркации 2

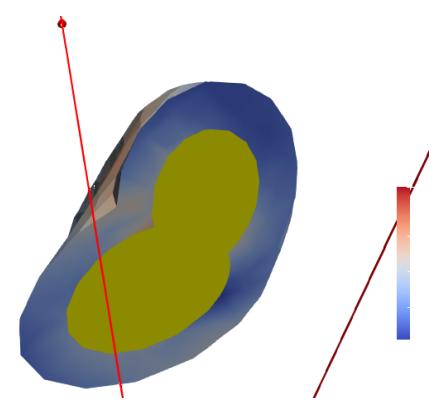


Рисунок 8 – Напряжение фон Мизеса для бифуркации 1

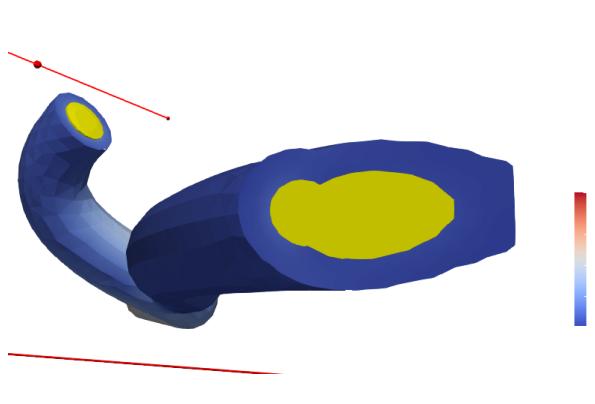


Рисунок 11 – Напряжение фон Мизеса для бифуркации 2

Заключение. На примере моделирования гемодинамики отрезка сосуда разработаны варианты визуализации при изменении механических свойств объектов модуля упругости сосудистой стенки.

В работе применялся ParaView – открытый графический кроссплатформенный пакет.

В работе созданы и обоснованы предпосылки создания численных медико-биологических моделей для использования их в системах виртуальной реальности, которые в настоящее время все больше и больше используются для решения практических задач медицины, а также на этапах подготовки медицинских специалистов.

Список цитированных источников

1. Handbook of hemorheology and hemodynamics: Biomedical and Health Research / O. K. Baskurt [et al.]. – Berlin. – IOS Press, 2007. – Vol. 69. – 455 p.
2. Bungartz, J. Fluid-Structure Interaction: Modelling, Simulation, Optimization : Lecture Notes in Computational Science and Engineering / ed. by H. J. Bungartz, M. Schäfer. – London: Springer, 2006. – Vol. 53. – 388 p.
3. Скворцов, А. В. Триангуляция Делоне и ее применение / А. В. Скворцов. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2002. – 128 с.
4. McMillan, D. E. Hemorheological studies in the diabetes control and complications trial / D. E. McMillan // Clin. Hemoreol. – 1993. – Vol. 13 – P. 147–154.
5. Гемореологические профили у пациентов с артериальной гипертензией в сочетании с синдромом гипервязкости / А. В. Муравьев [и др.] // Физиология человека. – 1998. – Т. 24, № 4. – С. 113–117.
6. Baßkurt, O. K. Red blood cell aggregation in experimental sepsis / O. K., Baßkurt, A. Temiz, H. J. Meiselman // Clin. Med. – 1997. – Vol. 130 – P. 183–190.
7. Effects of swimming exercise on red blood cell rheology in trained and untrained rats / O. Yalcin [et al.] // J. Appl. Physiol. – 2000. – Vol. 88 – P. 2074–2080.

Visualization of the vascular section hemodynamics numerical modeling

Goltsev M. V., Mansurov V. A., Ragunovich L. D.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Visualization of hemodynamic processes in virtual hemodynamics numerical models has been discussed as well as the application of the models developed for predicting the dynamics of the processes in medicine and biology and modelling for students. The learning of this topic experiences a lot of difficulties. These models take into account such an important hemodynamic parameter associated with atherosclerotic phenomena as shear stress on the blood vessel wall, which significantly depends on the geometry of the vascular bed.

Keywords: hemodynamic, numerical modeling, atherosclerosis, vascular sheerstress.

Поступила 05.06.2024

УДК 612.13 + 004.921

ПОСТРОЕНИЕ ВИРТУАЛЬНЫХ ТРЕХМЕРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЧИСЛЕННОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ГЕМОДИНАМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Гольцев М. В., Мансуров В. А., Рагунович Л. Д.

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

Реферат. В данной работе созданы и обоснованы предпосылки создания численных медико-биологических моделей для использования их в системах виртуальной реальности. Рассмотрены основные приемы создания трехмерных численных виртуальных трехмерных моделей для численного моделирования гемодинамических процессов. Показан пример моделирования гемодинамических процессов в сосудах в области соединения передней соединительной артерии, средней и передней мозговых артерий.

Ключевые слова: численное моделирование, физические модели гемодинамики, упругость сосудистой стенки, взаимодействие жидкости с сосудистой стенкой, визуализация гемодинамических процессов.

Введение. Виртуальная реальность (VR, англ. virtual reality, VR, искусственная действительность) – созданный техническими средствами мир, передаваемый человеку через его ощущения: зрение, слух, осязание и другие. Виртуальная реальность имитирует как воздействие, так и реакции на воздействие.

Объекты виртуальной реальности обычно ведут себя близко к поведению аналогичных объектов материальной реальности. Пользователь может воздействовать на эти объекты в согласии с реальными законами физики. Виртуальная реальность дает возможность хирургу смоделировать ход операции, отработать технику выполнения на трехмерных моделях, рассмотреть чрезвычайные ситуации, которые могут возникнуть в ходе вмешательства и отточить до автоматизма действия по их устраниению.

Актуальность. Численное моделирования осуществляется с использованием компьютеров, которые позволяют имитировать достаточно сложные системы, и, как правило, речь идет именно о моделях, то есть о некоторых идеальных копиях живых систем, отражающих лишь некоторые их свойства, причем схематически. Компьютерные модели представляют собой подтипы математических моделей и содержат «знания» об объекте в виде математических формул, таблиц, графиков, баз данных. Они позволяют изучать поведение системы при изменении внутренних характеристик и внешних условий, проигрывать сценарии, решать задачу оптимизации. Однако каждая компьютерная реализация соответствует конкретным, заданным параметрам системы [1].

Системы трехмерного геометрического моделирования создают среду, подобную той, в которой создаются и изменяются физические модели. Другими словами, в системе геометрического моделирования разработчик изменяет форму модели, добавляет и удаляет ее части, детализируя форму визуальной модели. Визуальная модель может выглядеть точно так же, как физическая, но она нематериальна.

Однако трехмерная визуальная модель хранится в компьютере вместе со своим математическим описанием, благодаря чему устраняется главный недостаток физической модели – необходимость выполнения измерений для последующего прототипирования или серийного производства [2].

Цель работы – создать виртуальные численные модели гемодинамических процессов и деформации стенок в сосудах, которые будут служить основой для эффективного, реалистичного взаимодействия пользователей с объектами и средой моделирования на основе программно-аппаратных решений. Разработать алгоритм создания таких моделей.

Материалы и методы. Работа выполнена в рамках задания 3.04.2 «Построение и верификация компьютерных моделей медико-биологических объектов и процессов, исследование их поведения в спроектированных средах на базе технологий виртуальной и дополненной реальности» государственной программы научных исследований «Конвергенция 2025».

Данные для построения реалистической геометрической модели сосудистого русла можно получить посредством компьютерной рентгеновской или ЯМР томографии, УЗИ сканирования или посредством посмертных слепков в виде облака точек поверхности. Для создания геометрической модели сосудистое древо разбивается на несколько частей, например, отдельно материнский сосуд и отдельно дочерний. Из этого выбираются несколько сечений, из этих сеченийчитываются центральная точка сечения и наибольшее и наименьшее расстояние от центра сечения до стенки сосуда.

При придании физических свойств элементам геометрической модели эта модель становится виртуальным аналогом реального объекта, который используется при математическом моделировании процессов, происходящих в нем. Для этого необходимо использовать гипотезу сплошной среды. Сплошная среда – это механическая система, обладающая бесконечным числом внутренних степеней свободы. Её движение в пространстве, в отличие от других механических систем, описывается не координатами и скоростями отдельных частиц, а скалярным полем плотности и векторным полем скоростей. Гипотеза сплошной среды применяется к обширным расчетным зонам [3] виртуальной модели. В этом случае игнорируется клеточная теория – биологический объект заменяется гипотетической сплошной средой.

Для моделирования гемодинамических процессов исследуются характеристики тканей органов и сосудов и их взаимодействие с кровью. Для описания упругих свойств сосудистой стенки

используется понятие энергии напряжения W , рассчитываемая согласно модели neo-Hookean (формула (1)) [4]:

$$W = \frac{\mu}{2}(I_1 - 3) - \mu \ln J + \frac{\lambda}{2}(\ln J)^2, \quad (1)$$

где μ, λ – коэффициенты Ламе; I_1 – первый инвариант тензора деформаций; J – сжимаемость материала.

Эта модель и линейная эластичность дают похожие профили деформации при небольших напряжениях. При больших напряжениях модель neo-Hookean дает гораздо лучшее описание деформации и применима для напряжений вплоть до 20 % [5]. Также сердечно-сосудистые ткани считаются несжимаемыми ($J=1$), что упрощает функцию до одного слагаемого.

Тензор напряжения Коши для несжимаемых материалов вычислялся согласно формуле (2):

$$\sigma = 4\frac{\mu}{2}\left(\varepsilon - \frac{1}{3}\text{tr}(\varepsilon)I_1\right) + 2\frac{\kappa}{2}\text{tr}(\varepsilon)I_1, \quad (2)$$

где μ, κ – коэффициенты Ламе; ε – тензор деформаций; I_1 – первый инвариант тензора деформаций.

Вязкостные свойства представляются как маловязкие суспензии, такие как цельная кровь, обладающие сложным реологическим поведением, несущем ценную информацию о взаимодействии и изменении формы частиц суспензии. При небольших скоростях сдвига порядка 1 c^{-1} вязкость крови зависит от агрегируемости, а при скоростях сдвига порядка 100 c^{-1} – от деформируемости эритроцитов. Агрегируемость и деформируемость эритроцитов изменяются при различных патологиях. Для описания этих явлений используется наиболее общая реологическая модель Каро, которая описывается формулой (3) [6]:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta_\infty + (\eta_0 - \eta_\infty) \cdot (1 + \lambda^2 \dot{\gamma}^2)^{-(n-1)/2}, \quad (3)$$

где $\dot{\gamma} = \nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T$ – градиент скорости; η_∞ – вязкость при бесконечно большой скорости сдвига; η_0 – вязкость при бесконечно малой скорости сдвига; λ – структурный параметр, зависящий от деформируемости эритроцитов; n – структурный параметр, зависящий от агрегируемости эритроцитов.

Достоинством модели, использующей приближение сплошной среды, является использование надежных уравнений механики сплошной среды, решаемых не менее надежными

численными методами. В первую очередь для структурного моделирования это метод конечных элементов (FE-method), позволяющий включать в расчет модель материала для учета особых характеристик и поведения объекта при внешней нагрузке [5]. Данный метод применяется в моделях как жидкостной, так и твердой части кровеносной системы.

Основным методом моделирования взаимодействия упругой стенки сосуда с движущейся кровью являлся метод конечно-разностного интегрирования уравнения Навье-Стока и условий механического равновесия сосудистой стенки для связанных задач течения вязкой жидкости и деформации упругой среды. Поток жидкости может деформировать стенку, поэтому для численного моделирования профиля течения в непрерывно деформируемой геометрии необходимо использовать метод Лагранжа-Эйлера (ALE, arbitrary Lagrange-Euler). Метод ALE использует динамику деформирующей геометрии и движущихся границ с помощью движущейся сетки (moving mesh). Стенка канала является деформируемым материалом, который может упруго деформироваться под воздействием нагрузки. Следовательно, поток жидкости также следует новому пути, поэтому течение в исходной геометрии будет отличаться от течения деформируемой геометрии

Последовательность создания виртуальной модели следующее. Построение формы обычно осуществляется по 3D изображению, полученного из компьютерной рентгеновской или ЯМР томографии (DITCOM файл), определяются координатные точки осевой линии сосудистого объекта. Далее посредством сплайн-операции строятся осевые линии (они должны иметь общую точку). По выбранным сечениям строятся эллипсы или окружности, соответствующие результатам измерений 3D изображению в плоскости, перпендикулярной осевой линии с наибольшим и наименьшим расстоянием от центра до стенки сосуда (угол поворота эллипса должен быть измерен предварительно). На следующем этапе строятся сплошные элементы по сечениям. Таким образом, образуется трехмерное сплошное тело – внутренняя часть сосуда, которой приписываются в дальнейшем свойства жидкости. Для построения сосудистой стенки в данном случае можно использовать операцию придать толщину. Следует заметить, что по данным томографии измерить толщину стенки сосуда сложно (ограниченная разрешающая способность), поэтому приходится брать данные из литературы. Окончательная трехмерная геометрическая модель

показа на рисунке 1. Следующим этапом является добавление физических свойств в построенную геометрическую модель. Физические свойства сред, показанные в таблице 1, являются гипотетическими и совпадают с литературными данными по порядку величины.

Результаты и их обсуждение. В качестве начальных и граничных условий предполагалось, что средние скорости течения на входе толстого дочернего сосуда находятся в диапазоне $10,7 \div 18,5$ см/с (среднее значение – 15 см/с), на входе тонкого дочернего сосуда – $12 \div 19,5$ см/с (среднее значение – 16 см/с). На стенке сосуда условия прилипания, окончания отрезков сосудов неподвижны [7]. Рассчитывались поля скоростей течения, напряжение фон Мизеса на стенке сосуда, распределение давления внутри отрезка сосуда, градиент скорости на стенке сосуда. Результаты моделирования сравнивались с литературными данными и показали удовлетворительное согласие с ними. Полученная таким образом модель не является точной копией данного отрезка сосуда, но с достаточной степенью точности воспроизводит основные черты процессов течения (рисунки 2–5).

Таблица 1 – Динамика концентрации цитокинов в крови стентированных пациентов

Упругая среда			Жидкая среда		
Плотность	1070	кг/м ³	Начальная вязкость	0,014	Па·с
Модуль Юнга	10^6	Па	Конечная вязкость	0,004	Па·с
Коэффициент Пуассона	0,48	-	Индекс течения	0,85	–
			Время релаксации	0,2	с
			Плотность	1050	кг/м ³

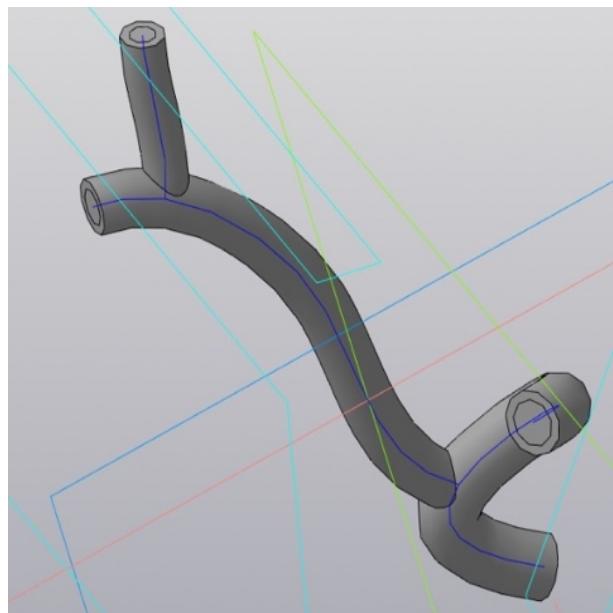


Рисунок 1 – Модель сосудов в области соединения передней соединительной артерии, средней мозговой артерии и передней мозговой артерии

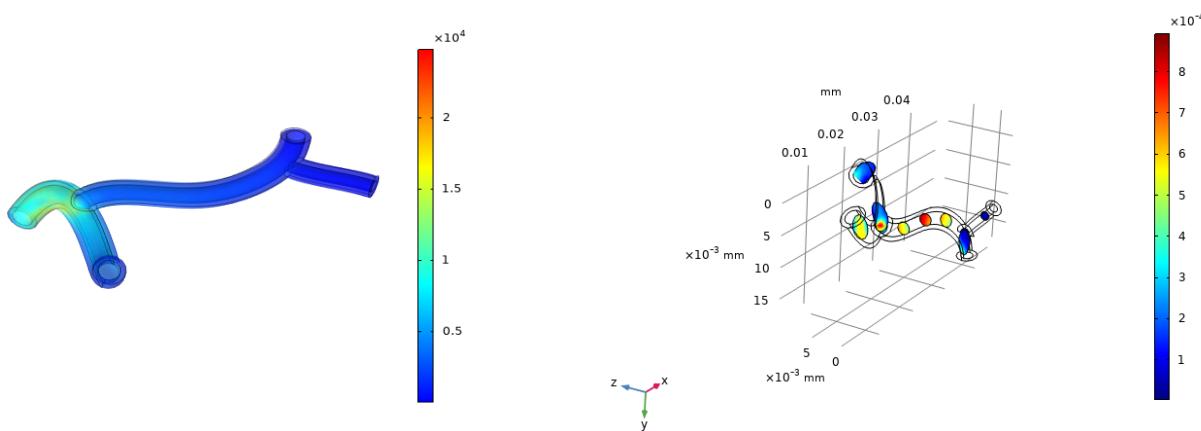


Рисунок 2 – Напряжение фон Мизеса

Рисунок 3 – Скорости течения в разных сечениях

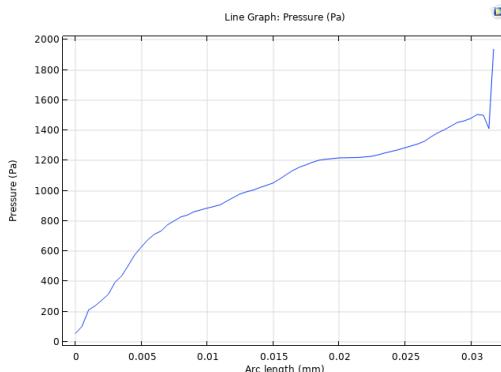


Рисунок 4 – Распределение давления по материнскому сосуду

Заключение. Используя вышеописанный алгоритм, была построена геометрическая модель сосудов в области соединения передней соединительной артерией, средней мозговой артерии и передней мозговой артерий системы вилли-зивого круга.

Физические свойства построенной геометрической модели биологического объекта придают этому объекту законченную трехмерную математическую модель, доступную для численного моделирования. При придании физических

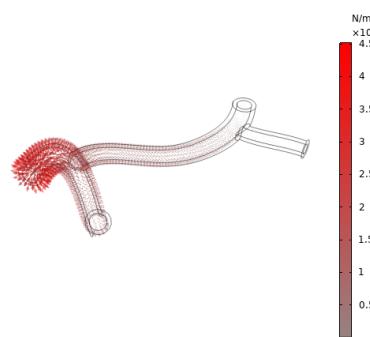


Рисунок 5 – Нагрузка на стенку сосуда

свойств элементам геометрической модели эта модель становится виртуальным аналогом реального объекта, который используется при математическом моделировании процессов, происходящих в нем.

Оценка полноты и адекватности построенной физической численной модели элемента проводилась посредством сравнения результатов моделирования с литературными данными и показала удовлетворительное согласие с ними

Список цитированных источников

1. Дмитриев, А. В. Математические модели структуры сосудистого русла тела человека (обзор литературы) / А. В. Дмитриев, Я. А. Лысых, О. К. Зенин // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2019. – № 2 (50). – С. 78–88.
2. Structural modelling of the cardiovascular system / B. Owen [et al.] // Biomechanics and Modelling in Mechanobiology. – 2018. – Vol. 17, iss. 5. – P. 1217–1242.
3. A coupled momentum method for modelling blood flow in three-dimensional deformable arteries / C. A. Figueroa [et al.] // Computer methods in applied mechanics and engineering. – 2006. – Vol. 195, iss. 41–43. – P. 5685–5706.
4. Gasser, T. C. Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fibre orientations / T. C. Gasser, R. W. Ogden, G. A. Holzapfel // J. R. Soc. Interface. – 2006. – Iss. 3 (6). – P. 15–35.
5. Fluid-Structure Interaction: Modelling, Simulation, Optimization: Lecture Notes in Computational Science and Engineering / ed. by H. J. Bungartz, M. Schäfer. – Springer, 2006. – Vol. 53. – 388 p.
6. Handbook of hemorheology and hemodynamics: Biomedical and Health Research / ed by. O. K. Baskurt [et al.]. – IOS Press, 2007. – Vol. 69. – 455 p.
- 7 Педли, Т. Гидродинамика крупных кровеносных сосудов / Т. Педли. – Москва : Мир, 1983. – 400 с.

Construction of virtual 3D elements of the vascular system for numerical modeling of hemodynamic processes

Goltsev M. V., Mansurov V. A., Ragunovich L. D.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The article gives grounds to the prerequisites for the creation of numerical medical and biological models for their application in virtual reality systems. The principle techniques for creating three-dimensional

numerical virtual three-dimensional models for numerical modeling of hemodynamic processes are considered. An example of modeling of the hemodynamic processes in blood vessels between anterior, middle and posterior cerebral arteries has been demonstrated.

Keywords: numerical modeling, hemodynamic physical models, elasticity of vascular wall, hemodynamic process visualization.

Поступила 05.06.2024

УДК 616.5-002.525.2-06:575.174.015.3

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА RS2542151 ГЕНА PTPN2 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ

Достанко Н. Ю.¹, Ягур В. Е.¹, Синявская Е. С.², Гончарова Р. И.²

¹ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;

² Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Ген PTPN2 кодирует протеин тирозинфосфатазу нерекцепторного 2-го типа, которая экспрессируется в макрофагах, Т-лимфоцитах, дендритных клетках, клетках эпителия кишечника, регулирует несколько ключевых сигнальных путей, включая JAK/STAT, MAPK и NF-кВ, действует как сдерживающий регулятор воспалительных процессов, а также влияет на барьерную функцию эпителия кишечника и его проницаемость. Полиморфизмы в гене PTPN2 были ассоциированы с риском развития различных аутоиммунных заболеваний, в том числе ревматоидного артрита и его ответом на терапию ингибиторами ФНО-α. Нами была изучена частота встречаемости однонуклеотидного полиморфизма rs2542151 гена PTPN2 у пациентов с системной красной волчанкой по сравнению с контрольной группой здоровых доноров и показано двукратное повышение риска развития системной красной волчанки для носителей полиморфизма rs2542151 в белорусской популяции пациентов как в целом, так и среди женщин.

Ключевые слова: протеин тирозинфосфатаза нерекцепторного 2-го типа, системная красная волчанка, PTPN2, rs2542151.

Введение. Ген PTPN2 кодирует протеин тирозинфосфатазу нерекцепторного 2-го типа. Исследования показали, что PTPN2 экспрессируется в макрофагах, Т-лимфоцитах, дендритных клетках, клетках эпителия кишечника, и действует как негативный регулятор воспалительных процессов, сдерживая или предупреждая развитие воспаления и способствуя иммунологической толерантности [1, 2]. Ген PTPN2 регулирует несколько ключевых сигнальных путей, включая JAK/STAT, MAPK и NF-кВ, которые играют важную роль в воспалении и клеточной пролиферации, дифференцировки и выживаемости [2, 3]. Удаление или частичная абляция PTPN2 приводили к гиперактивации этих путей, что способствовало усилинию воспалительного ответа,

спонтанному, хроническому и аутоиммунному воспалению, особенно в коже, печени, легких и почках. Было показано также, что изменения в уровне экспрессии и активности PTPN2 могут служить индикаторами патологических процессов и даже быть использованы для прогнозирования исхода заболеваний. Высокий уровень экспрессии PTPN2 может ассоциироваться с благоприятным прогнозом, тогда как низкий уровень может указывать на неблагоприятный исход. Кроме того, PTPN2 может быть использован в качестве мишени для разработки новых терапевтических стратегий: ингибиторы или активаторы PTPN2 могут быть использованы для модуляции его активности и улучшения лечения различных заболеваний. [2] Количество работ в PubMed,

посвященных изучению роли PTPN2, еще не так велико по сравнению с другими генами и не превышает пятисот, тем не менее за последние 15 лет интерес к нему возрос.

Полиморфизмы в гене PTPN2, а также модуляция его активности в экспериментальных работах были ассоциированы с развитием различных аутоиммунных заболеваний: воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), к которым относятся язвенный колит и болезнь Крона, ревматоидный артрит (РА), ювенильный ревматоидный артрит, болезнь Грейвса, целиакия, сахарный диабет 1-го типа [2, 4–6], а также с развитием и прогрессированием ряда системных заболеваний, где воспаление является важным компонентом патогенеза, таких как атеросклероз [3], неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), диабет 2-го типа [7], способствовали увеличению проатерогенной активности, прогрессированию атеросклероза и НАЖБП [3, 7].

Интересно, что ген PTPN2 может влиять также на прогрессирование различных видов рака, так как, увеличивая его экспрессию, клетки опухоли могут уходить от иммунного ответа, что было описано для клеток рака щитовидной железы, глиомы [1]. Увеличение экспрессии PTPN2 клетками данных опухолей способствовало усилинию пролиферации и миграции клеток рака щитовидной железы, глиомы, что указывает на проонкогенную роль PTPN2 в данном контексте за счет способности влиять на иммунное окружение опухоли и ее способность избегать иммунного надзора. При этом в экспериментах было показано, что к увеличению экспрессии данного гена в клетках этих опухолей приводит воспалительный ответ и оксидативный стресс. Это подтверждает гипотезу о том, что PTPN2 может быть индуцирован этими факторами. Вместе с тем известно, что при Т-клеточных лейкозах и лимфомах данный ген наоборот дезактивирован, что подчеркивает его роль как сдерживающего гена при данных видах опухолей [1, 2].

Кроме того, описан еще один важный механизм, посредством которого полиморфизмы в гене PTPN2 могут вносить свой вклад в развитие аутоиммунных процессов. PTPN2 регулирует взаимодействие между макрофагами и кишечными эпителиальными клетками, регулируя продукцию цитокинов и хемокинов, которые влияют на барьерную функцию эпителиальных клеток, включая плотность межклеточных контактов и проницаемость эпителия [2, 7].

Было показано, что тирозинфосфатаза Т-клеток экспрессируется в кишечном эпителии и регулирует экспрессию и функцию белков

плотных контактов, таких как окклюдин и клаудин, которые важны для поддержания целостности кишечного барьера и снижения его проницаемости.

Удаление и инактивация PTPN2 приводили к нарушению взаимодействий между макрофагами и эпителиальными клетками, иммунной гиперактивации, повышенной экспрессии провоспалительных цитокинов и хемокинов, таких как IL-6, TNF- α , и повышенной воспалительной реакции, снижению экспрессии белков, участвующих в формировании плотных контактов, увеличению проницаемости кишечного барьера, а мутации в гене PTPN2 были связаны с повышенным риском развития ВЗК и приводили к развитию ранней аутоиммунной энтеропатии.

Кроме того, в экспериментальных исследованиях было показано, что PTPN2 играет ключевую роль в регуляции формирования аутофагосом в клетках кишечника, а снижение его экспрессии приводило к снижению аутофагии в эпителии кишечника, способствовало накоплению повреждений и усилиению воспаления, что также может способствовать развитию и усугублять течение ВЗК [4].

Важно подчеркнуть, что состояние кишечного барьера, а именно его повышенная проницаемость, может непосредственно влиять на риск развития большого числа аутоиммунных заболеваний, а не только воспалительных заболеваний кишечника, а также на риск прогрессирования НАЖБП до гепатита и цирроза и риск развития диабета 2-го типа у пациентов с НАЖБП [7].

Было показано, что ген PTPN2 является локусом предрасположенности к РА у европейцев, снижение его экспрессии при РА влияло на большое количество провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ФНО- α), в том числе повышало количество ИЛ-6, синтезируемого синовиальными фибробластами и снижало их аутофагию, что имеет значение для прогрессирования РА и разрушения суставов, а высокие уровни PTPN2, наоборот, способствовали увеличению резистентности синовиальных фибробластов к апоптозу и увеличению аутофагии [5].

Полиморфизмы в гене ассоциировались с ответом на терапию ингибиторами ФНО- α , увеличением пролиферации Т-клеток и восприимчивостью к микобактериям у пациентов с РА [8].

Тем не менее, публикации, посвященные анализу гена PTPN2 при системной красной волчанке (СКВ) практически отсутствуют, за исключением одной работы, где упоминается об ассоциации полиморфизма в данном гене с наличием перикардита и серозита у пациентов с СКВ [9].

Цель работы – оценить частоту полиморфизма rs2542151 гена PTPN2 у пациентов с СКВ по сравнению с контрольной группой.

Материалы и методы. Сбор данных и материалов для проведения исследования проводили на базе ревматологического отделения государственного учреждения «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» (МНПЦХТиГ) с согласия этического комитета МНПЦХТиГ как часть НТП Союзного государства «ДНК-идентификация», раздел «Молекулярно-генетическая оценка риска аутоиммунных заболеваний». У всех пациентов, участвовавших в исследовании, а также у здоровых доноров, входивших в группу сравнения, было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании. Все пациенты, принявшие участие в исследовании, соответствовали классификационным критериям Американской коллегии ревматологов (ACR) для системной красной волчанки (1997).

Экстракцию ДНК из образцов периферической крови осуществляли фенол-хлороформным методом. Аллельный статус гена PTPN2 по полиморфизму rs2542151 оценивали методом real-time PCR (полимеразная цепная реакция в реальном времени) с использованием флуоресцентно меченых TaqMan-зондов. При оценке результатов и определении генотипов использовали программное обеспечение CFX Maestro 1.0 компании «БиоРад».

Данный этап исследования был проведен на базе государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии НАН Беларусь». Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение Statistica 10.0. и SNPStats web tool. При оценке результатов использовали описательную статистику по генотипам и аллелям, тест на соответствие закону Hardy-Weinberg, критерий Пирсона χ^2 , двухсторонний точный метод Фишера (ТМФ, p_{2-t}) для оценки значимости различий между группами, рассчитывали прогностическое отношение шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (ДИ) для оценки прогностической значимости аллельного статуса по изучаемому полиморфизму при различных моделях наследования, а также информационные критерии Akaike (AIC) и Bayesian (BIC) для каждой модели (ко-доминантная,

доминантная, рецессивная, сверхдоминантная и лог-аддитивная).

Результаты и их обсуждение. В исследование были включены 56 женщин и 4 мужчин с СКВ в возрасте от 18 до 72 лет (средний возраст составил 38,9 года, 95% ДИ 35,7–42,1 года, медиана возраста – 37,1 года) и 345 человек группы сравнения, среди которых было 257 женщин и 88 мужчин в возрасте от 18 до 63 лет (средний возраст – 38,1 года, 95% ДИ 36,9–39,2 года, медиана возраста – 37,5 года). Значимых различий в сравниваемых группах по возрасту выявлено не было (U критерий Манна–Уитни, $p = 0,98$). Учитывая наличие различий между группами по полу (U критерий Манна–Уитни, $p < 0,001$, 6,4 % мужчин в группе СКВ и 25,5 % мужчин в группе сравнения), при последующем анализе проводили корректировку полученных результатов по полу, а также выполнили дополнительные аналогичные расчеты только по женщинам. Значимых различий по возрасту в сравниваемых группах женщин также не было выявлено (U критерий Манна–Уитни, $p = 0,56$).

Соответствие распределения генотипов закону Hardy-Weinberg оценивали с помощью точного теста Фишера, при этом значимых отклонений для исследованного SNP в группе СКВ ($p = 0,26$) и группе сравнения ($p = 0,84$), а также в общей группе обследуемых ($p = 0,72$) выявлено не было, в том числе при проверке только в группах женщин ($p = 0,26$, $p = 0,62$ и $p = 0,22$ соответственно).

Распределение частот аллелей в основной и контрольной группах в общей выборке (Ж, М) и среди женщин (Ж) статистически значимо не различалось ($p = 0,25$ и $p = 0,14$ соответственно), что представлено в таблице 1.

Распределение частот генотипов гена PTPN2 с полиморфизмом rs2542151 в группе пациентов с СКВ и контрольной группе для общей выборки и среди женщин представлено в таблицах 2 и 3.

Частоты генотипов полиморфного гена PTPN2 по rs2542151 в основной группе и группе сравнения основной выборки и среди женщин, значения отношения шансов наличия СКВ, соответствующие p и рассчитанные информационные критерии AIC и BIC для разных моделей наследования приведены в таблицах 4 и 5.

Таблица 1 – Частоты аллелей гена в исследуемых группах

Пол	Аллель	Все исследуемые		Группа сравнения		Группа СКВ	
		n	относительная частота	n	относительная частота	n	относительная частота
Ж, М	T	673	0,83	580	0,84	93	0,78
	G	137	0,17	110	0,16	27	0,22
Ж	T	523	0,84	437	0,85	86	0,77
	G	103	0,16	77	0,15	26	0,23

Таблица 2 – Частоты генотипов гена PTPN2 в исследуемых группах в общей выборке

Генотип	Все испытуемые		Группа сравнения		Группа СКВ	
	n	относительная частота	n	относительная частота	n	относительная частота
G/G	10	0,02	9	0,03	1	0,02
T/G	117	0,29	92	0,27	25	0,42
T/T	278	0,69	244	0,71	34	0,57
NA	3	–	0	–	3	–

Примечание: NA – генотип не определен, n – число выявленных генотипов в группе испытуемых.

Таблица 3 – Частоты генотипов гена PTPN2 в исследуемых группах среди женщин

Генотип	Все испытуемые		Группа сравнения		Группа СКВ	
	n	относительная частота	n	относительная частота	n	относительная частота
G/G	5	0,02	4	0,02	1	0,02
T/G	93	0,3	69	0,27	24	0,43
T/T	215	0,69	184	0,72	31	0,55
NA	3	–	0	–	3	–

Примечание: NA – генотип не определен, n – число выявленных генотипов в группе испытуемых.

Таблица 4 – Риск развития СКВ, ассоциированный с носительством полиморфного аллеля гена PTPN2 при разных моделях наследования (общая выборка с коррекцией по полу)

Модель наследования	Гено-тип	Относитель-ная частота	n	Относитель-ная частота	n	Относитель-ная частота	BIC
Кодоминант-ная	T/T	244 (70,7 %)	34 (56,7 %)	1,0	0,085	330	346,1
	G/T	92 (26,7 %)	25 (41,7 %)	1,94 (1,09–3,46)			
	G/G	9 (2,6 %)	1 (1,7 %)	1,11 (0,13–9,47)			
Доминантная	T/T	244 (70,7 %)	34 (56,7 %)	1,0	0,031	328,3	340,3
	G/T-G/G	101 (29,3 %)	26 (43,3 %)	1,88 (1,07–3,33)*			
Рецессивная	T/T-G/T	336 (97,4 %)	59 (98,3 %)	1,0	0,91	333	345
	G/G	9 (2,6 %)	1 (1,7 %)	0,88 (0,10–7,44)			

Окончание табл. 4

Сверх-доминантная	T/T- G/G	253 (73,3 %)	35 (58,3 %)	1,0	0,026	328	340,1
	G/T	92 (26,7 %)	25 (41,7 %)	1,93 (1,09–3,43)*			
Лог-аддитивная	–	–	–	1,66 (1,00–2,75)	0,056	293,3	341,3

Примечание: * – Значимые различия между группами.

Таблица 5 – Риск развития СКВ у женщин, ассоциированный с носительством полиморфного аллеля гена PTPN2 при разных моделях наследования

Модель наследования	Гено-тип	Группа сравнения	Группа СКВ	OR (95%ДИ)	p	AIC	BIC
Кодоминантная	T/T	184 (71,6 %)	31 (55,4 %)	1,0	0,065	294,6	305,8
	G/T	69 (26,9 %)	24 (42,9 %)	2,06 (1,13–3,76)			
	G/G	4 (1,6 %)	1 (1,8 %)	1,48 (0,16–13,72)			
Доминантная	T/T	184 (71,6 %)	31 (55,4 %)	1,0	0,02	292,7	300,2
	G/T-G/G	73 (28,4 %)	25 (44,6 %)	2,03* (1,12–3,68)			
Рецессивная	T/T-G/T	253 (98,4 %)	55 (98,2 %)	1,0	0,9	298	305,5
	G/G	4 (1,6 %)	1 (1,8 %)	1,15 (0,13–10,49)			
Сверх-доминантная	T/T-G/G	188 (73,2 %)	32 (57,1 %)	1,0	0,021	292,7	300,2
	G/T	69 (26,9 %)	24 (42,9 %)	2,04* (1,13–3,71)			
Лог-аддитивная	–	–	–	1,82* (1,07–3,11)	0,031	293,4	300,9

Примечание: * – Значимые различия между группами.

Данные анализа, приведенные в таблицах 4 и 5, позволяют говорить о том, что были выявлены значимые различия в частоте генотипов гена PTPN2 в основной и контрольной группе как в общей выборке исследуемых лиц, так и среди женщин. В общей группе исследуемых значимые различия были получены для доминантной и сверхдоминантной модели наследования, при этом сверхдоминантная модель обладала лучшими показателями AIC and BIC в отношении прогнозирования риска СКВ. В группе женщин значимые различия были выявлены для доминантной, сверхдоминантной, а также лог-аддитивной модели, при этом доминантная и сверхдоминантная модели обладали лучшими метриками и одинаково хорошо представляли наблюдаемую генетическую архитектуру признака в данной выборке. Таким образом, анализ моделей наследования генотипов гена PTPN2 выявил почти

двукратное увеличение риска СКВ в общей группе мужчин и женщин и двукратное увеличение риска для женщин при наличии полиморфизма rs2542151 для носителей генотипов G/T и G/G.

При этом выявление сверхдоминантности может указывать на то, что гетерозиготы могут обладать определенным преимуществом в изучаемой популяции, возможно в отношении более активного ответа на инфекции. Результаты, полученные в нашем исследовании, согласуются с ранее опубликованными данными, где также была показана роль полиморфизма rs2542151 в развитии аутоиммунных заболеваний [6].

Заключение. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о повышении риска развития системной красной волчанки в белорусской популяции пациентов для носителей полиморфизма rs2542151 PTPN2

**Список цитированных источников**

1. PTPN2 in the Immunity and Tumor Immunotherapy: A Concise Review / J. Song [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23, N 17. – P. 10025.
2. Characterization of PTPN2 and its use as a biomarker / S. Bussières-Marmen [et al.] // Methods. – 2014. – Vol. 65, N 2. – P. 239–246.
3. PTPN2 negatively regulates macrophage inflammation in atherosclerosis / X. Hu [et al.] // Aging (Albany NY). – 2020. – Vol. 13, N 2. – P. 2768–2779.
4. Protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 2 regulates autophagosome formation in human intestinal cells / M. Scharl [et al.] // Inflamm. Bowel Dis. – 2012. – Vol. 18, N 7. – P. 1287–1302.
5. Aradi, B. Protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 2: an important regulator of Interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts / B. Aradi, M. Kato, M. Filkova // Arthritis Rheumatol. – 2015. – Vol. 67, N 10. – P. 2624–2633.
6. The susceptibility loci juvenile idiopathic arthritis shares with other autoimmune diseases extend to PTPN2, COG6, and ANGPT1 / S. D. Thompson [et al.] // Arthritis Rheum. – 2010. – Vol. 62, N 11. – P. 3265–3276.
7. Genetic susceptibility of increased intestinal permeability is associated with progressive liver disease and diabetes in patients with non-alcoholic fatty liver disease / L. Miele [et al.] // Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. – 2020. – Vol. 30, N 11. – P. 2103–2110.
8. Polymorphisms in STAT4, PTPN2, PSORS1C1 and TRAF3IP2 Genes Are Associated with the Response to TNF Inhibitors in Patients with Rheumatoid Arthritis / P. Conigliaro [et al.] // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, N 1 (0169956).
9. A polymorphism upstream MIR1279 gene is associated with pericarditis development in Systemic Lupus Erythematosus and contributes to definition of a genetic risk profile for this complication / C. Ciccacci [et al.] // Lupus. – 2017. – Vol. 26, N 8. – P. 841–848.

Accociation of PTPN2 rs2542151 polymorphism with systemic lupus erythematosus risk

Dostanko N. Y.¹, Yagur V. E.¹, Siniauskaya E. S.², Goncharova R. I.²

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

² Institute of Genetic and Cytology of NASB, Minsk, Republic of Belarus

The PTPN2 gene encodes the protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2, which is expressed in macrophages, T-lymphocytes, dendritic cells and intestinal epithelial cells, regulates several key signaling pathways, including JAK/STAT, MAPK and NF- κ B, acting as a negative regulator of inflammatory processes. It also influences the barrier function of the intestinal epithelium and its permeability. Polymorphisms of the PTPN2 gene have been associated with the risk of various autoimmune diseases including rheumatoid arthritis and its response to TNF- α inhibitors. We studied the frequency of rs2542151 PTPN2 polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus compared to a control group of healthy donors. We revealed a twofold increase in the risk of systemic lupus erythematosus for carriers of the rs2542151 polymorphism in the Belarusian population, both in general cohort and among women.

Keywords: protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2, systemic lupus erythematosus, PTPN2, rs2542151.

Поступила 05.06.2024

УДК 616.24-002.155:616.235-002-074-036

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО И БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КРОВИ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ФИБРОЗА ЛЕГКИХ У ПАЦИЕНТОВ С ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫМИ ЛЕГОЧНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ

*Лукашевич А. А.¹, Юдина О. А.^{1,2}, Давидовская Е. И.³, Пермякова А. О.¹,
Сакович М. В.¹, Руденков Д. С.¹, Дядичкина О. В.¹, Кадушкин А. Г.¹*

¹ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;

² Государственное учреждение «Республиканский клинический медицинский центр»
Управления делами Президента Республики Беларусь, г. Минск, Республика Беларусь;

³ Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
пульмонологии и фтизиатрии», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Подходы к лечению пациентов с прогрессирующими фиброзирующими фенотипом интерстициальных легочных болезней (ПФ-ИЛБ) и без прогрессирующего фиброзирующего фенотипа (не-ПФ-ИЛБ) существенно разнятся, что свидетельствует о необходимости раннего, свое-временного выделения группы пациентов с ПФ-ИЛБ. Целью настоящего исследования явилось определение значения показателей клеточного и биохимического состава периферической крови пациентов с ИЛБ для прогнозирования прогрессирования фиброза легких. В исследование были включены пациенты с ИЛБ, которые (основываясь на результатах двухлетнего наблюдения) были разделены на две подгруппы – с ПФ-ИЛБ (n=33) и не-ПФ-ИЛБ (n=59). У пациентов с ПФ-ИЛБ пациентов оказалось значительно более высокими отношение абсолютных количеств нейтрофилов к лимфоцитам (ОНЛ), отношение абсолютных количеств тромбоцитов к лимфоцитам (ОТЛ), индекс системного воспалительного ответа (ИСВО), системный индекс совокупного воспаления (СИСВ), производное отношение абсолютного количества нейтрофилов к абсолютному количеству лимфоцитов (пОНЛ), концентрация С-реактивного белка (СРБ) и фибриногена, и существенно более низким отношение абсолютных количеств лимфоцитов к моноцитам (ОЛМ) по сравнению с не-ПФ-ИЛБ пациентами. Эффективность этих тестов для прогнозирования прогрессирования фиброза легких у пациентов с ИЛБ составила от 60,9 до 80,4 %. Разработана математическая модель прогнозирования прогрессирования фиброза легких у пациентов с ИЛБ, которая включает результаты определения ОНЛ и уровня СРБ. Она обладает чувствительностью 81,8 %, специфичностью – 86,4 %, эффективностью – 84,8 %, площадью под ROC-кривой – 0,899.

Ключевые слова: интерстициальные легочные болезни, прогрессирование фиброза легких, отношение абсолютных количеств нейтрофилов к лимфоцитам, С-реактивный белок.

Введение. Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) представляет собой хроническую прогрессирующую фиброзирующую интерстициальную легочную болезнь (ИЛБ) неизвестной этиологии, для которой характерна высокая летальность. Средняя продолжительность жизни пациентов с ИЛФ без лечения составляет всего 3-5 лет [1]. Вместе с тем, несмотря на адекватное лечение, фиброз легких может также прогрессировать в течение 61-80 месяцев с момента появления симптомов у 18-32 % пациентов с другими

формами ИЛБ, в частности, с гиперчувствительным пневмонитом, идиопатической интерстициальной пневмонией, идиопатической неспецифической интерстициальной пневмонией, пневмокониозами, саркоидозом, ИЛБ, обусловленными заболеваниями соединительной ткани, лекарственно-индукционными ИЛБ [2]. При этом пациенты, страдающие другими, чем ИЛФ, формами ИЛБ с прогрессирующим фиброзирующим фенотипом (ПФ-ИЛБ), умирают раньше, чем пациенты с ИЛБ без ИЛФ и без прогрессирующего

фиброзирующего фенотипа (не-ПФ-ИЛБ), а клиническое течение (без надлежащей терапии) и неблагоприятный прогноз в отношении смертности у пациентов с ПФ-ИЛБ и ИЛФ практически не различаются [3].

В настоящее время подходы к лечению пациентов с ПФ-ИЛБ и не-ПФ-ИЛБ существенно разнятся, что свидетельствует о необходимости раннего, своевременного выделения группы пациентов с ПФ-ИЛБ. Показана целесообразность назначения антифибротической терапии (нинтеданибом) у пациентов с ПФ-ИЛБ. Так, использование нинтеданиба у этой группы пациентов приводило к значительному замедлению снижения форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) в течение 1 года наблюдения по сравнению с пациентами, принимавшими плацебо [4]. Кроме того, у пациентов с ПФ-ИЛБ должен быть рассмотрен вопрос о возможности проведения трансплантации легких. Однако до сих пор отсутствуют надежные, валидизированные биомаркеры, которые можно было бы использовать для прогнозирования прогрессирования фиброза легких у пациентов с другими, чем ИЛФ, формами ИЛБ [2].

Помимо сходства в клинических проявлениях и терапевтических опциях, различные формы ПФ-ИЛБ также характеризуются общими молекулярно-клеточными механизмами повреждения легочной ткани, которые приводят к ее фиброзированию. Ключевую роль в развитии ПФ-ИЛБ отводят клеткам-участникам воспалительного процесса и формирования участков фиброза.

Сообщается, что рутинные тесты общего и биохимического анализов крови могут использоваться для прогнозирования течения ИЛБ. Так, повышенное ($\geq 2,9$) отношение абсолютного количества нейтрофилов к абсолютному количеству лимфоцитов (ОНЛ) позволяет выявить группу пациентов с ИЛФ с повышенным риском смерти [5]. В другом исследовании у пациентов с ИЛФ обнаружена взаимосвязь ФЖЕЛ с ОНЛ, отношением абсолютного количества лимфоцитов к абсолютному количеству моноцитов (ОЛМ), индексом системного воспалительного ответа (ИСВО) и совокупным индексом системного воспаления (СИСВ) [6]. В работе С. J. W. Stock и соавторов было показано, что высокий уровень С-реактивного белка (СРБ) ассоциирован со снижением продолжительности жизни пациентов с ИЛБ [7]. Однако диагностическая значимость, в том числе эффективность, чувствительность и специфичность показателей общего и биохимического анализов крови для оценки вероятности

прогрессирования фиброза легких у пациентов с другими, чем ИЛФ, формами ИЛБ ранее не изучалась.

Цель работы – определить значение показателей клеточного и биохимического состава периферической крови пациентов с ИЛБ для прогнозирования прогрессирования фиброза легких.

Материалы и методы. В исследование были включены две группы пациентов (основная и экзаменационная) с ИЛБ численностью 92 и 32 человека, находившихся на стационарном лечении в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии» (г. Минск, Республика Беларусь) в период с апреля 2015 года по март 2022 года. Последующий (от момента госпитализации и включения пациента в исследование) доступный для анализа (отраженный в медицинских документах) период наблюдения за каждым пациентом составлял минимум 2 года (максимум до 9 лет).

Диагноз ИЛБ у обеих групп пациентов был установлен междисциплинарной командой, состоящей из врача-пульмонолога, врача-рентгенолога и врача-патологоанатома. Все пациенты имели клинические признаки фибротических изменений легких. Критериями включения являлись наличие характерного ИЛБ рентгенологического паттерна, установленного по данным компьютерной томографии высокого разрешения (КТВР); морфологически верифицированный диагноз заболевания, входящего в группу ИЛБ. Из исследования исключались пациенты с системными заболеваниями соединительной ткани, проявлениями лекарственной токсичности и фиброзом, развившимся вследствие лучевой терапии.

Таблица 1 – Характеристика участников исследования

Характеристика	Основная группа пациентов (n=92)	Экзаменационная группа пациентов (n=32)
Пол, м/ж	60/32	21/11
Возраст (годы)	58,0 (46,0–63,8)	59,0 (46,5–65,0)
Курильщики (активные или экс-курильщики)	44	14
ФЖЕЛ, % от должностного значения	88,0 (75,8–107,3)	91,0 (78,0–101,5)
Критерии прогрессирования заболевания в течение 24 месяцев, кол-во пациентов (%)	33 (35,9 %)	11 (34,4 %)

Демографические (возраст, пол, индекс массы тела), клинические (тяжесть респираторных симптомов, продолжительность заболевания, история курения и лечения пациентов), рентгенологические (степень фиброза по данным КТВР) данные и результаты оценки функции внешнего дыхания, включая сведения о ФЖЕЛ, были получены из записей историй болезни. Параметры общего анализа крови, подсчитанные на гематологическом анализаторе Cell-Dyn Ruby (Abbott Laboratories, США), биохимического анализа крови, измеренные на биохимическом анализаторе Architect c4000 (Abbott Laboratories, США), и концентрация фибриногена, вычисленная на автоматическом коагулометре Helena AC-4 (Helena Biosciences, Великобритания), также были включены в последующий анализ.

Индексы клеточного состава крови рассчитывали по следующим общепринятым формулам: ОНЛ – отношение абсолютного количества нейтрофилов к абсолютному количеству лимфоцитов; пОНЛ (производное ОНЛ) – отношение абсолютного количества нейтрофилов к разнице между абсолютным количеством лейкоцитов и абсолютным количеством нейтрофилов; ОТЛ – отношение абсолютного количества тромбоцитов к абсолютному количеству лимфоцитов; ОЛМ – отношение абсолютного количества лимфоцитов к абсолютному количеству моноцитов; ИСВО (индекс системного воспалительного ответа) – производное абсолютных количеств нейтрофилов и моноцитов, деленное на абсолютное количество лимфоцитов; СИСВ (системный индекс совокупного воспаления) – производное абсолютных количеств нейтрофилов, моноцитов и тромбоцитов, деленное на абсолютное количество лимфоцитов.

Основываясь на результатах двухлетнего наблюдения, основная группа пациентов с ИЛБ была разделена на две подгруппы – с прогрессирующими ($n=33$) либо непрогрессирующими ($n=59$) фиброзом легких. Критериям прогрессирования фиброза легких в течение двух лет (несмотря на исчерпывающую стандартную терапию) относили:

1) снижение ФЖЕЛ на $\geq 10\%$ от должного значения;

2) снижение ФЖЕЛ от 5 до $< 10\%$ от должного значение в совокупности с ухудшением респираторных симптомов или увеличением степени фиброза легких по данным КТВР;

3) ухудшение респираторных симптомов и увеличение степени фиброза легких по данным КТВР [4].

Настоящее ретроспективное исследование было проведено в соответствии с принципами Хельсинской декларации и одобрено решением комитета по биомедицинской этике учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета статистического анализа данных MedCalc (MedCalc Software, Бельгия). Для проверки гипотезы нормальности распределения данных использовали критерий Шапиро-Уилка. В связи с тем, что количественные значения показателей не подчинялись нормальному распределению, их анализ проводили методами непараметрической статистики. Сравнение показателей между двумя независимыми группами проводили путем расчета U-критерия Манна-Уитни. Для суждения о взаимосвязи между показателями вычисляли коэффициент корреляции Спирмена. Диагностическую информативность лабораторных тестов оценивали на основе эффективности, чувствительности, специфичности, положительной и отрицательной прогностической ценности, площади под ROC-кривой. При выборе величины порогового значения учитывали оптимальное сочетание чувствительности и специфичности теста.

Построение прогностической модели проводили методом бинарной логистической регрессии. Качество приближения регрессионной модели оценивали при помощи функции правдоподобия. Анализ согласованности данных модели и реальных данных осуществляли по результатам теста Хосмера-Лемешова. При всех видах статистического анализа критическое значение уровня значимости принимали как равное 5 %.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследования у пациентов с ПФ-ИЛБ и не-ПФ-ИЛБ были проанализированы показатели общего и биохимического анализов крови (таблица 2).

Из всех анализируемых показателей значительно более высокими были ОНЛ, ОТЛ, ИСВО, СИСВ, пОНЛ, концентрация СРБ и фибриногена в крови у ПФ-ИЛБ пациентов, чем у не-ПФ-ИЛБ пациентов. Значение ОЛМ также существенно различалось в зависимости от прогрессирования фиброза легких у пациентов с ИЛБ. Результаты корреляционного анализа показывают их корреляционную связь с прогрессированием фиброза легких: $R=0,590$ ($p<0,001$) для ОНЛ; $R=0,283$ ($p=0,006$) для ОТЛ; $R=-0,312$ ($p=0,003$) для ОЛМ; $R=0,475$ ($p<0,001$) для ИСВО; $R=0,413$ ($p<0,001$) для СИСВ; $R=0,572$ ($p<0,001$) для пОНЛ; $R=0,236$ ($p=0,048$) для концентрации фибриногена; $R=0,458$ ($p<0,001$) для уровня СРБ. Обнаруженная

взаимосвязь дала основание включить показатели биохимического и клеточного состава крови в ROC-анализ.

Эффективность каждого отдельного параметра для прогнозирования прогрессирования фиброза легких у пациентов с ИЛБ, рассчитанная

на основе их чувствительности и специфичности, составила от 60,9 до 80,4 % (таблица 3).

Каждый из этих параметров характеризовался достаточно высокой прогностической значимостью, о чем свидетельствует площадь под ROC-кривой, которая находилась в диапазоне от 0,640 до 0,855.

Таблица 2 – Значения параметров общего и биохимического анализов крови у пациентов с интерстициальными легочными болезнями

Показатель	Не-ПФ-ИЛБ (n=59)	ПФ-ИЛБ (n=33)	Значимость отличий, p
ОНЛ	1,63 (1,22–2,06)	2,60 (2,14–3,74)	<0,001
ОТЛ	98,14 (84,83–121,19)	136,82 (95,13–187,63)	0,007
ОЛМ	4,33 (3,17–6,11)	3,22 (2,71–4,00)	0,003
ИСВО	0,89 (0,59–1,25)	1,41 (1,13–2,51)	<0,001
СИСВ	215,58 (128,19–320,91)	436,33 (205,41–587,93)	<0,001
пОНЛ	1,27 (0,92–1,56)	1,86 (1,55–2,51)	<0,001
Общий белок, г/л	74,0 (71,9–77,8)	76,0 (69,8–78,3)	0,549
Фибриноген, г/л	2,85 (2,25–3,49)	3,33 (2,90–4,58)	<0,01
СРБ, мг/л	3,0 (1,3–5,0)	7,2 (4,3–13,1)	<0,001
Креатинин, мкмоль/л	78,8 (68,0–86,1)	78,3 (64,0–89,1)	0,711
Холестерол общий, ммоль/л	5,3 (4,7–6,1)	5,4 (4,6–5,8)	0,882
Мочевая кислота, мкмоль/л	375 (279–440)	360 (283–420)	0,896
Лактатдегидрогеназа, ЕД/л	207,5 (160,0–323,0)	231,0 (185,0–284,5)	0,804
Гаммаглутамин-транспептидаза, ЕД/л	26,0 (18,3–32,0)	24,5 (20,0–63,5)	0,406

Примечание: ПФ-ИЛБ – пациенты с прогрессирующим фиброзирующим фенотипом интерстициальных легочных болезней; не-ПФ-ИЛБ – пациенты с интерстициальными легочными болезнями без прогрессирующего фиброзирующего фенотипа; СРБ – С-реактивный белок; ОНЛ – отношение абсолютного количества нейтрофилов к абсолютному количеству лимфоцитов; пОНЛ – производное отношение абсолютного количества нейтрофилов к абсолютному количеству лимфоцитов; ОТЛ – отношение абсолютного количества тромбоцитов к абсолютному количеству лимфоцитов; ОЛМ – отношение абсолютного количества лимфоцитов к абсолютному количеству моноцитов; ИСВО – индекс системного воспалительного ответа; СИСВ – системный индекс совокупного воспаления.

Таблица 3 – Характеристики ROC-кривых для показателей клеточного и биохимического состава крови при прогнозировании прогрессирования фиброза легких у пациентов с интерстициальными легочными болезнями

Показатель	ПЗ	Чувств. (95% ДИ)	Специф. (95% ДИ)	Эфф.	AUC (95% ДИ)	p (vs AUC = 0,5)	ИЮ
ОНЛ	>2,07	81,8 (64,5–93,0)	76,3 (63,4–86,4)	78,3	0,855 (0,766–0,920)	<0,001	0,581
ОТЛ	>134,23	51,5 (33,5–69,2)	81,4 (69,1–90,3)	70,7	0,670 (0,56–0,765)	0,007	0,329
ОЛМ	≤4	81,8 (64,5–93,0)	57,6 (44,1–70,4)	66,3	0,687 (0,582–0,780)	0,001	0,395

Окончание табл. 3

ИСВО	>1,13	75,8 (57,7–88,9)	71,2 (57,9–82,2)	72,8	0,786 (0,688–0,865)	<0,001	0,469
СИСВ	>345,01	63,6 (45,1–79,6)	81,4 (69,1–90,3)	75,0	0,749 (0,648–0,833)	<0,001	0,450
пОНЛ	>1,7	63,6 (45,1–79,6)	89,8 (79,2–96,2)	80,4	0,844 (0,754–0,911)	<0,001	0,535
Фибриноген, г/л	>2,98	66,7 (48,2–82,0)	57,6 (44,1–70,4)	60,9	0,640 (0,518–0,751)	0,034	0,304
СРБ, мг/л	>6,11	66,7 (48,2–82,0)	84,7 (73,0–92,8)	78,3	0,776 (0,677–0,856)	<0,001	0,514

Примечание: ПЗ – пороговое значение; чувств. – чувствительность; специф. – специфичность; эфф. – эффективность; ДИ – доверительный интервал; AUC – площадь под ROC-кривой; р (vs AUC=0,5) – уровень значимости, при котором оцениваемая площадь под ROC-кривой статистически значимо отличается от неинформативного значения 0,5; ИЮ – индекс Юдена.

Для повышения эффективности прогнозирования отобранные лабораторные показатели анализировались методом бинарной регрессии.

Пошаговое включение параметров биохимического и клеточного состава крови в статистическую модель привело к составлению регрессионного уравнения, позволяющего прогнозировать прогрессирование фиброза легких у пациентов с ИЛБ с чувствительностью 81,8 %, специфичностью 86,4 % и эффективностью 84,8 % (формула 1, таблица 4).

$$Y = \frac{\exp(-5,177 + 1,699 \times X_1 + 0,134 \times X_2)}{1 + \exp(-5,177 + 1,699 \times X_1 + 0,134 \times X_2)} \quad (1),$$

где Y – прогрессирование фиброза легких у пациентов с ИЛБ; X₁ – ОНЛ; X₂ – СРБ; exp (~ 2,718) – основание натурального логарифма; – 5,177 – константа регрессионного уравнения; 1,699, 0,134 – коэффициенты регрессии.

Таблица 4 – Параметры уравнения логистической регрессии

Фактор-ный признак	Коэффи-циент регрессии	Стан-дарт-ная ошибка	ОШ	95% ДИ ОШ
ОНЛ	1,699	0,455	5,47	2,24 – 13,33
СРБ	0,134	0,054	1,14	1,03 – 1,27

Примечание: ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал.

Прогностическая ценность положительного результата (ПЦПР) для данной модели

составила 77,1 %, прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦОР) – 89,5 %.

Индекс Юдена был равен 0,683.

Оптимальное пороговое значение вероятности для чувствительности и специфичности данной модели составило 0,331. Это значит, что если Y>0,331, то существует высокая вероятность прогрессирования фиброза легких, а если Y≤0,331, то имеется высокая вероятность того, что фиброз легких не будет прогрессировать.

На следующем этапе исследования была проанализирована коллинеарность между предикторными переменными ОНЛ и СРБ. Известно, что между параметрами в уравнении логистической регрессии должна отсутствовать сильная корреляционная связь, то есть они не должны зависеть друг от друга. В разработанной нами модели наблюдалась умеренная корреляционная связь между ОНЛ и СРБ ($R=0,303$, $p=0,003$). Это значит, что обе переменные обоснованно включены в уравнение логистической регрессии Y.

В оцениваемой регрессионной модели начальный отрицательный удвоенный логарифм функции правдоподобия ($-2\log \text{Likelihood}$, $-2LL$) составил 120,1. Включение в уравнение предикторных переменных (уровня СРБ и значения ОНЛ) привело к снижению $-2LL$ до 72,6. Таким образом, снижение, или «качество приближения» составило 47,5; $p<0,001$.

Далее, используя методы, предложенные Коксом и Снеллом либо Найджелкерком, рассчитывали коэффициент детерминации (R^2). Этот показатель демонстрирует то, насколько изменение результативной переменной Y объясняется изменением совокупности независимых переменных уравнения. Для построенной нами модели R^2 Найджелкерка составил 0,553, R^2 Кокса и Снелла – 0,403.

Для проверки согласованности модели с исходными данными применяли критерий согласия Хосмера–Лемешова. Тест показывает уровень значимости, при котором не отвергается гипотеза о допустимо незначительных расхождениях между фактической и модельной классификацией «пациенты с ПФ-ИЛБ» – «пациенты с не-ПФ-ИЛБ» (таблица 5).

Для сконструированной модели уровень значимости для этого критерия составил $p>0,05$, то есть принимается нулевая гипотеза о согласии модели и реальных данных.

Таблица 5 – Оценка модели Y по критерию Хосмера–Лемешова

Классификация	Тест на соответствие
Хи-квадрат	8,1
Число степеней свободы	8
Уровень значимости	0,42

Для оценки эффективности созданной модели прогнозирования прогрессирования фиброза легких у пациентов с ИЛБ был проведен ROC-анализ (таблица 6) с построением кривой (рисунок 1).

Площадь под ROC-кривой для модели Y составила 0,899, что соответствует «очень хорошему» качеству созданной модели согласно экспертной шкале.

Таблица 6 – Характеристики ROC-кривой для логистической регрессионной модели Y

Площадь под ROC-кривой	0,899
Стандартная ошибка	0,0318
95% ДИ	0,819–0,952
p (vs AUC=0,5)	<0,001

Примечание: p (vs AUC=0,5) – уровень значимости, при котором оцениваемая площадь под ROC-кривой статистически значимо отличается от неинформативного значения 0,5.

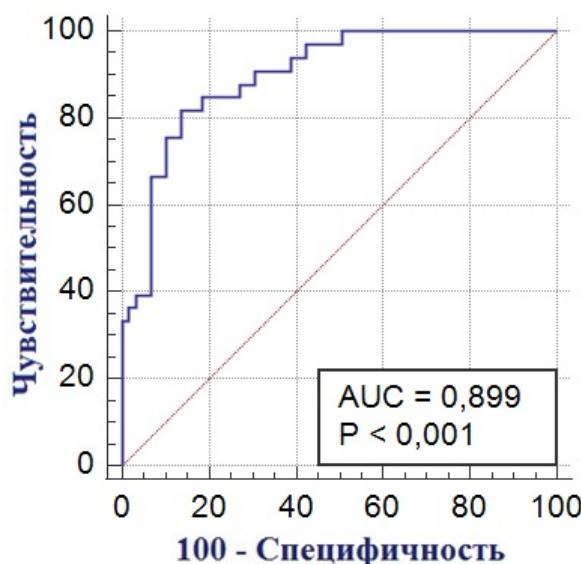


Рисунок 1 – График ROC-кривой для оценки эффективности модели логистической регрессии Y

Далее мы провели апробацию математической модели на экзаменационной группе пациентов с ИЛБ ($n=32$). У 12 пациентов с ИЛБ значения показателя, предсказывающего прогрессирование фиброза легких (Y), были выше граничного значения ($>0,331$), то есть вероятность прогрессирования фиброза легких у них высокая. У 20 пациентов значения показателя Y были $\leq 0,331$, то есть вероятность прогрессирования фиброза легких у них низкая (таблица 7).

Таблица 7 – Классификационная таблица проверки логистической регрессионной модели Y на экзаменационной выборке пациентов с интерстициальными легочными болезнями

Количество пациентов с интерстициальными легочными болезнями		
Фактически	Прогноз на основе формулы 1	
	Прогрессирование фиброза легких	Нет прогрессирования фиброза легких
Прогрессирование фиброза легких ($n=11$)	9	2
Нет прогрессирования фиброза легких ($n=21$)	3	18

Сопоставление результатов расчета регрессионного уравнения Y с прогрессированием фиброза легких по данным двухлетнего наблюдения показало, что 9 пациентов из 11 (81,8 %) правильно отнесены к группе с прогрессированием фиброза легких, 18 из 21 (85,7 %) пациентов правильно отнесены к группе с благоприятным течением ИЛБ (таблица 7). Таким образом, чувствительность метода составила 81,8 %, специфичность – 85,7 %, ПЦПР – 75,0 %, ПЦОР – 90,0 %.

Общий процент правильно классифицированных случаев течения фиброза легких (эффективность) на основе результатов применения данного уравнения составил 84,4 %.

В совокупности результаты аprobации математической модели Y на экзаменационной выборке пациентов с ИЛБ показали, что построенная модель работает надежно.

Заключение. В результате проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Тесты на определение в крови ОНЛ, пОНЛ, ОТЛ, ОЛМ, ИСВО, СИСВ, концентрации СРБ, фибриногена, превышающие пороговые значения, являются диагностически значимыми при прогнозировании прогрессирования фиброза легких у пациентов с ИЛБ.

Эффективность этих тестов составляет от 60,9 до 80,4 %.

2. Разработана математическая модель прогнозирования прогрессирования фиброза легких у пациентов с ИЛБ, которая включает результаты определения в крови ОНЛ и концентрации СРБ. Она обладает чувствительностью 81,8 %, специфичностью – 86,4 %, эффективностью – 84,8 %, ПЦПР – 77,1 %, ПЦОР – 89,5 %, площадью под ROC-кривой – 0,899.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках НИР по договору с БРФФИ № М23КИТГ-002 (№ ГР 20230882).

Список цитированных источников

1. Early Diagnosis and Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Narrative Review / H. Alsomali [et al.] // Pulm. Ther. – 2023. – Vol. 9, N 2. – P. 177–193.
2. Progressive pulmonary fibrosis: an expert group consensus statement / S. K. Rajan [et al.] // Eur. Respir J. – 2023. – Vol. 61, N 3 (2103187). – P. 1–19.
3. The natural history of progressive fibrosing interstitial lung diseases / K. K. Brown [et al.] // Eur. Respir. J. – 2020. – Vol. 55, N 6 (2000085). – P. 1–10.
4. Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases / K. R. Flaherty [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2019. – Vol. 381, N 18. – P. 1718–1727.
5. Multi-center evaluation of baseline neutrophil-to-lymphocyte (NLR) ratio as an independent predictor of mortality and clinical risk stratifier in idiopathic pulmonary fibrosis / T. A. Mikolasch [et al.] // EClinicalMedicine. – 2022. – Vol. 55 (101758). – P. 1–14.
6. Blood Cell Count Derived Inflammation Indexes in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis / A. Zinelli [et al.] // Lung. – 2020. – Vol. 198, N 5. – P. 821–827.
7. Serum C-reactive protein is associated with earlier mortality across different interstitial lung diseases / C. J. W. Stock [et al.] // Respirology. – 2024. – Vol. 29, N 3. – P. 228–234.



Use of cellular and biochemical blood tests to predict the progression of pulmonary fibrosis in patients with interstitial lung diseases

Lukashevich A. A.¹, Yudina O. A.^{1,2}, Davidovskaya E. I.³, Permyakova A. O.¹,
Sakovich M. V.¹, Rudenkov D. S.¹, Dyadichkina O. V.¹, Kadushkin A. G.¹

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

² Republican Clinical Medical Center of the Administration of the President of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus;

³ Republican Scientific and Practical Center of Pulmonology and Phthisiology, Minsk, Republic of Belarus

Approaches to the treatment of patients with a progressive fibrosing phenotype of interstitial lung diseases (PF-ILD) and without a progressive fibrosing phenotype (non-PF-ILD) differ significantly. This demonstrates the need for the early, timely identification of a group of patients with PF-ILD. The aim of this study was to determine the value of the cellular and biochemical blood tests in patients with ILD for predicting the progression of pulmonary fibrosis. Patients with ILD included in the study (based on the results of a two-year follow-up) were divided into two subgroups - with PF-ILD (n=33) and non-PF-ILD (n=59). PF-ILD patients had higher neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), platelet to lymphocyte ratio (PLR), systemic inflammation response index (SIRI), aggregate index of systemic inflammation (AISI), derived neutrophil to lymphocyte ratio (dNLR), concentration of C-reactive protein (CRP) and fibrinogen, and a significantly lower lymphocyte to monocyte ratio (LMR) compared with non-PF-ILD patients. The diagnostic accuracy of these tests for predicting progression of pulmonary fibrosis in patients with ILD ranged from 60.9 to 80.4 %. A mathematical model has been developed for predicting the progression of pulmonary fibrosis in patients with ILD, which includes the values of NLR and CRP level. It has a sensitivity of 81.8 %, a specificity of 86.4 %, an efficiency of 84.8 %, and an area under the ROC curve of 0.899

Keywords: interstitial lung diseases, progression of pulmonary fibrosis, neutrophil to lymphocyte ratio, C-reactive protein.

Поступила 05.06.2024

УДК 616.72-022-089.843-076:579.861.2

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ «МОНОАЗИДОМ ПРОПИДИЯ – ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПЕРИПРОТЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ СУСТАВОВ

Лямцева А. К., Костюк С. А., Полуян О. С.

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

Реферат. Моноазид пропидия представляет собой интеркалирующий ДНК краситель, который обладает способностью проникать только в нежизнеспособные бактериальные клетки с поврежденными мембранами и используется в сочетании с полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в реальном времени для дифференциации жизнеспособных и нежизнеспособных бактериальных клеток. В данном исследовании 25 образцов из полости эндопротезированных суставов, взятых у

пациентов с признаками перипротезной инфекции, обрабатывали моноазидом пропидия или оставляли необработанными перед экстракцией ДНК для дальнейшей детекции *Staphylococcus aureus* методом ПЦР в реальном времени. Результаты исследования показали, что моноазид пропидия ингибирует обнаружение нежизнеспособных бактериальных клеток. Разработанная авторская методика «Моноазидом пропидия–полимеразная цепная реакция в режиме реального времени» может ограничить ложноположительные результаты при проведении молекулярной диагностики для установления этиологической структуры перипротезной инфекции, что требует дальнейшей апробации на клинических образцах.

Ключевые слова: моноазид пропидия, РМА, ПЦР, перипротезная инфекция, эндопротезирование, *Staphylococcus aureus*.

Введение. Эндопротезирование тазобедренного и коленного суставов является одним из самых эффективных хирургических вмешательств в современной ортопедии, позволяющим значительно улучшить качество жизни пациентов с заболеваниями суставов различной этиологии. В связи с этим количество выполняемых эндопротезирований как в мире, так и в Республике Беларусь ежегодно увеличивается. Соответственно, растет и количество осложнений, требующих ревизионных вмешательств. Перипротезная инфекция (ППИ) является серьезным осложнением после эндопротезирования, а ее лечение связано с высокими затратами и сопровождается значительным влиянием на физическое и психоэмоциональное состояние пациента [1].

Успешное ведение пациентов с ППИ зависит от ранней и точной диагностики. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) представляет собой быструю и простую процедуру обнаружения и количественного определения патогенных бактерий [2]. Тем не менее, ПЦР не различает жизнеспособные и нежизнеспособные бактериальные клетки из-за персистенции ДНК даже после потери жизнеспособности клеток.

Интеркалирующий ДНК краситель, моноазид пропидия (МАП, англ. PMA –Propidium Monoazide), можно использовать в сочетании с ПЦР в режиме реального времени, чтобы преодолеть это ограничение. Попав внутрь клетки с поврежденной мембраной МАП, связывается с бактериальной ДНК после фотоактивации и ингибирует ее амплификацию во время ПЦР. На рисунке 1 показан принцип модификации МАП: непроницаемый для клеточной мембрany краситель МАП (фиолетовые точки) избирательно проникает в нежизнеспособные клетки с поврежденными мембранами (красные) и после воздействия светом ковалентно модифицирует ДНК. Последующая ПЦР-амплификация матриц ДНК, модифицированных МАП, ингибируется, что позволяет селективный количественный анализ ДНК из жизнеспособных клеток (зеленый) [3].

Преимущество обработки МАП перед ПЦР заключается в возможности избирательного обнаружения и количественного определения жизнеспособных форм микроорганизмов. Кроме того, способность метода отличать жизнеспособные бактерии от нежизнеспособных может помочь более точно оценить различные протоколы лечения с использованием противомикробных препаратов или без них [4].

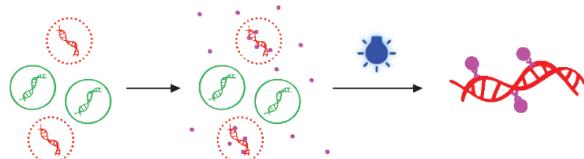


Рисунок 1 – Принцип модификации МАП

Данная методика применялась в области стоматологии для оптимизации микробиологического анализа клинических образцов до и после пародонтологического лечения. Авторы обнаружили, что при предварительной обработке образцов МАП обнаруженная микробная нагрузка была последовательно меньше, поскольку были обнаружены только жизнеспособные бактерии, тогда как при использовании только метода ПЦР в режиме реально времени были обнаружены все бактерии как жизнеспособные, так и нежизнеспособные, присутствующие в образцах зубного налета [5].

Для успешного применения МАП перед ПЦР необходима оптимизация экспериментальных условий, поскольку на результаты могут влиять многие факторы, в том числе концентрация красителя и эндогенные характеристики микроорганизмов.

Цель работы – разработать методику «Моноазидом пропидия – полимеразная цепная реакция» для обнаружения ДНК *Staphylococcus aureus* и аprobировать на биологическом материале пациентов с перипротезной инфекцией после

эндопротезирования крупных суставов (коленный и тазобедренный).

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе группы ПЦР-диагностики Научно-исследовательской лаборатории (НИЛ) Научно-исследовательского института экспериментальной и клинической медицины учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (НИИЭиКМ БГМУ).

Были исследованы 25 образцов из полости коленного или тазобедренного сустава, взятых у пациентов, которым было проведено первичное эндопротезирование тазобедренного/коленного сустава в учреждении здравоохранения «Минская областная клиническая больница» за период с 2022 по 2024 гг. Возраст пациентов (медиана (Me) и размах (min...max)), включенных в исследование на момент обследования составил 54 (41...62) года. В обследуемой группе пациентов удельный вес мужчин составил $56,00 \pm 6,94\%$ ($n=14$), женщин – $44,00 \pm 6,26\%$ ($n=11$). У пациентов ППИ коленного сустава $n=10$ случаев, ППИ тазобедренного – $n=15$ случаев.

В качестве биологического материала у пациентов проводили взятие синовиальной жидкости и фрагментов синовиальной оболочки. Забор биологического материала осуществлялся врачами-ортопедами по разработанной ими методике артроскопической синовиальной биопсии, трепан-биопсии коленного/тазобедренного сустава из минимально-инвазивных доступов под контролем электронно-оптического преобразователя (ЭОП) навигации. Синовиальную жидкость помещали в пробирку типа эпендорф объемом 1,5 мл, фрагменты синовиальной оболочки в пробирку типа эпендорф объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл транспортной среды с муколитиком («АртБиоТех», Республика Беларусь). Пробирки с биологическим материалом отправляли в НИИЭиКМ БГМУ, где их замораживали и оставляли для хранения при температуре -20°C для дальнейшего исследования. Обработку биологических образцов из полости эндопротезированных суставов проводили по специальной разработанной схеме (рисунок 2). В качестве положительного контроля был использован референс-штамм *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 6538. Для проведения молекулярно-биологических исследований забирали материал с поверхности плотной питательной среды, используя одноразовые зонды. Полученный материал помещали в пробирку типа эпендорф объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл транспортной среды («АртБиоТех», Республика Беларусь). Пробирки замораживали и оставляли для хранения при температуре -18°C.

Оптимизация концентрации МАП. Для оптимизации концентрации МАП (Biotium, США; исходная концентрация 20 мМ в 100 мкл воды) были протестированы четыре различные концентрации на референс-штамме *S. aureus* ATCC 6538: 10, 20, 50 и 100 мкМ. Образцы были разделены на две группы: группа 1 – микроорганизмы с подтвержденной и сохраненной жизнеспособностью, группа 2 – микроорганизмы, аттенуированные, утратившие жизнеспособность, путем нагревания в термо-шайкере (Biosan, Латвия) при 95 °C в течение 10 минут. После добавляли МАП в пробирки и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 5 минут, периодически перемешивая, тем самым позволяя МАП проникнуть в нежизнеспособные клетки и интеркалировать с ДНК. Затем образцы подвергали воздействию света с помощью 600 Вт галогенной лампы в течение 10 минут. Во время фотоактивации образцы помещали на лед на расстоянии 20 см от источника света и укладывали горизонтально, чтобы избежать чрезмерного нагрева. Образцы встраивали каждые 30 с для обеспечения однородности светового воздействия. Перед экстракцией ДНК образцы осаждали при 12 000 об/мин в течение 5 минут и дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS).



Рисунок 2 – Схема обработки образцов биологического материала из полости эндопротезированных суставов

Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «АртДНК легкий» («АртБиоТех», Республика Беларусь). Для амплификации гена 16S *S. aureus* использовали: *S. aureus-forward* – 5'-GCGTGCCTAATACATGCAAGTC-3'; *S. aureus-reverse* – 5'-CCGCCGCTAACATCAGAGAAG-3'; *S. aureus-probe* – 5'-FAM-ACGGACGAG-AAGCTTG-BHQ1-3' [6]. Амплификацию ДНК проводили с использованием готовой смеси для ПЦР-РВ «2Х премикс для ПЦР-РВ» («Праймтех», Республика Беларусь) на приборе Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия). В состав амплификационной смеси при использовании праймеров *S. aureus* были включены: 15,0 мкл «2Х премикс для ПЦР-РВ»; 1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров (прямого и обратного) и зонда; 4,2 мкл воды и 5 мкл ДНК. Программа амплификации: 1 цикл: 95 °C – 10 минут; 40 циклов: 95 °C – 15 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 15 с.

Для каждой из жизнеспособной и нежизнеспособной бактериальной суспензии рассчитывали разницу в пороге цикла Ct (ΔCt), где ΔCt жизнеспособных – разница между значением Ct жизнеспособных бактерий при обработке МАП и без нее, а ΔCt нежизнеспособных – разница между значением Ct нежизнеспособных бактерий при обработке МАП и без нее. Оптимальные условия обработки МАП должны иметь самый высокий ΔCt нежизнеспособных и самый низкий ΔCt жизнеспособных.

Апробация МАП на образцах биологического материала из полости исследуемых суставов. Образцы биологического материала из полости исследуемых суставов были разделены на две группы: группа 1 – обрабатывали МАП, группа 2 – оставляли необработанной.

Перед выделением ДНК образцы синовиальной жидкости предварительно центрифугировали при 2500g в течение 10 минут, в полученный осадок добавляли 100 мкл транспортной среды с муколитиком («АртБиоТех», Республика Беларусь) и использовали для дальнейших исследований. Перед выделением ДНК из фрагментов синовиальной оболочки образцы гомогенизировали с помощью гомогенизатора *TissueLyser II* (Qiagen) в течение 3 минут с частотой 10/c. В пробирки с биологическим материалом группы 1 добавляли МАП, инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 5 минут, периодически перемешивая. Затем образцы подвергали воздействию света с помощью 600 Вт галогенной лампы в течение 10 минут. Во время фотоактивации образцы помещали на лед на расстоянии 20 см от источника света и укладывали

горизонтально, встряхивали каждые 30 с. Перед экстракцией ДНК образцы осаждали при 12 000 об/мин в течение 5 минут и дважды промывали PBS.

Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «АртСпин» («АртБиоТех», Республика Беларусь). Определение концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводили спектрофотометрически (NanoDrop 1000, Thermo scientific) при длинах волн 280 и 260 нм. Для чистого препарата ДНК с отсутствием примесей белка и других ингибиторов значение $A_{260/280}$ составляет 1,8.

Для амплификации гена 16S *S. aureus* использовали: *S. aureus-forward* – 5'-GCGTGCCTAATACATGCAAGTC-3'; *S. aureus-reverse* – 5'-CCGCCGCTAACATCAGAGAAG-3'; *S. aureus-probe* – 5'-FAM-ACGGACGAGAAGCTTG-BHQ1-3' [6]. Амплификацию ДНК проводили с использованием готовой смеси для ПЦР-РВ «2Х премикс для ПЦР-РВ» («Праймтех», Республика Беларусь) на приборе Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия). В состав амплификационной смеси при использовании праймеров *S. aureus* были включены: 15,0 мкл «2Х премикс для ПЦР-РВ»; 1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров (прямого и обратного) и зонда; 4,2 мкл воды и 5 мкл ДНК. Программа амплификации: 1 цикл: 95 °C – 10 минут; 40 циклов: 95 °C – 15 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 15 с.

Амплификацию гена β -глобина человека использовали для подтверждения факта выделения исключительно микробной ДНК. В состав реакционной смеси были включены: β Glo-forward – 5'-CAACTTCATCCACGTTCAC-3', β Glo-reverse – 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGT-AC-3'. Состав смеси: 12,5 мкл «2Х премикс для ПЦР-РВ» (Праймтех, Республика 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 минут; 35 циклов: 94 °C – 30 с, 55 °C – 30 с, 72 °C – 30 с; 1 цикл: 72 °C – 10 минут (Rotor-Gene 6000, Corbett Research, Австралия).

Положительный образец ПЦР определялся как эффективная избирательная амплификация с использованием кривой диссоциации со значением Ct выше порога обнаружения.

Определение положительного результата ПЦР в режиме реального времени – это результат с двумя или более положительными образцами фрагментов синовиальной оболочки и/или

положительной синовиальной жидкости в одном и том же анализе.

Для сопоставления эффективности различных методов диагностики использовали общепринятые подходы, представляющие собой различные варианты приложения теоремы Байеса. При этом рассчитывали: диагностическую чувствительность метода = истинно положительный (ИП) результат / ИП результат + должно отрицательный (ЛО) результат $\times 100\%$; диагностическую специфичность метода = истинно отрицательный (ИО) результат / ИО результат + должно положительный (ЛП) результат $\times 100\%$; прогностическое значение положительного результата = ИП / ИП + ЛП $\times 100\%$ и прогностическое значение отрицательного результата = ИО / ИО + ЛО $\times 100\%$.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 8.0. Для тестирования данных на подчинение закону нормального распределения использовались показатели асимметрии и эксцесса, W-критерий Шапиро-Уилка, критерий Колмогорова-Смирнова, а также осуществлялось построение графиков распределения. Данные не подчинялись закону нормального распределения, что позволило применить для статистической обработки непараметрические методы. Парные сравнения независимых выборок по количественным характеристикам проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Для представления полученных данных использовали показатели медианы (Me) и процентиелей (Q_{25}/Q_{75}). Анализ категориальных признаков проводили с помощью критерия χ^2 -Пирсона (χ^2) в таблице сопряженности 2×2 . Различия считались статистически значимыми при уровне значимости (p) менее 0,05.

Для построения графика использовался GraphPad Prism 8. Для описания частот выявления признака приводили абсолютные (n) и относительные (%) значения.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследования нами были оптимизированы концентрации МАП на референс-штамме *S. aureus* ATCC 6538.

Значения ΔCt жизнеспособной бактериальной суспензии увеличивались с увеличением концентрации МАП от 20 до 100 мкМ. Значения ΔCt нежизнеспособной бактериальной суспензии увеличивались с увеличением концентрации МАП от 10 до 50 мкМ.

Разница в значениях ΔCt нежизнеспособной бактериальной суспензии между концентрациями 20 и 50 мкМ была статистически не

значимой ($p=0,35$). Однако ΔCt жизнеспособной бактериальной суспензии имела статистически значимые различия между данными концентрациями ($p=0,005$).

Таким образом, была выбрана концентрация МАП – 20 мкМ, так как это самая низкая концентрация, обеспечивающая хорошую дискриминацию жизнеспособных и нежизнеспособных бактериальных клеток (рисунок 3).

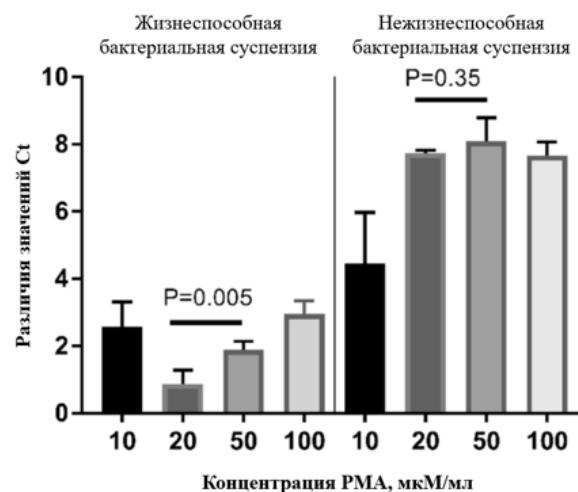


Рисунок 3 – Оптимизация концентраций МАП на референс-штамме *S. aureus* ATCC 6538

Полученные результаты по определению концентрации и степени чистоты выделенной ДНК из образцов биологического материала исследуемых суставов с использованием набора реагентов «АртСпин» с предварительной обработкой образцов МАП (группа 1) и стандартной методикой без обработки МАП (группа 1) при длинах волн 280 и 260 нм представлены в таблице.

Таблица 1 – Значения $A_{260/280}$, полученные после экстракции ДНК, (Me (Q_{25}/Q_{75}))

Методика обработки ДНК	$A_{260/280}$
Группа 1	1,76 (1,69/1,91)
Группа 2	1,72 (1,65/1,85)

Таким образом, отношение $A_{260/280}$ для группы 1 и группы 2, близкое к 1,8 и указывает на то, что препараты ДНК, выделенные данными методиками, можно рассматривать как свободные от примесей белка. Достоверных отличий с использованием методов статистического анализа выявлено не было ($p>0,05$).

При проведении ПЦР в режиме реального времени с предварительной обработкой мономоазидом пропидия зарегистрировано отсутствие пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией при оценке гена β -глобина, что свидетельствовало об отсутствии ДНК клеток человека в исследуемом биологическом материале.

Частота выявления *S. aureus* в группе 1 (с предварительной обработкой МАП) составила 52 % (n=13) случаев, в группе 2 (без предварительной обработки МАП) – 60 % (n=15) случаев. В ходе анализа результатов достоверных отличий ($\chi^2=0,33$, $p=0,57$) по частоте выявления *S. aureus* между группами исследования установлено не было.

Диагностическая чувствительность разработанной авторской методики с предварительной обработкой образцов МАП с последующей ПЦР в режиме реального времени составила 86,67 %, диагностическая специфичность – 100 %, прогностическая ценность положительного и отрицательного результата составила 100 и 83,33 % соответственно, что демонстрирует высокую диагностическую эффективность.

По литературным данным, *S. aureus* является важным патогеном в силу своей вирулентности и частоты встречаемости. В научной публикации Wisplinghoff H. и соавт. [7] указано, что основная причина ППИ – *S. aureus*, который также является одной из частых причин серьезных инвазивных инфекций, включая нозокомиальные и внутрибольничные инфекции кровотока, что впоследствии могут привести к ППИ. Получение гемодиализа, ревматоидный артрит, диабет и колонизация носа *S. aureus* связаны с повышенным риском инвазивной инфекции, соответственно, пациенты с ППИ, вызванным *S. aureus*, часто

имеют множественные сопутствующие заболевания. Первичная симптоматика у данной группы пациентов определяется острой инфекцией, однако сообщается о симптомах, сохраняющихся до нескольких лет, что, вероятно, является следствием предыдущих попыток лечения, что позволяет утверждать, что *S. aureus* – вариабельный микроорганизм, склонный к образованию биопленок, поэтому может вызывать более вялотекущую форму после предыдущих попыток лечения.

Заключение. Классический метод ПЦР в режиме реального времени, основанный на выявлении ДНК искомого возбудителя, не позволяет исследователям убедиться в жизнеспособности выявляемого микроорганизма, поскольку ДНК – это долгоживущая макромолекула биологической клетки. При установлении этиологии пери-протезной инфекции для выбора тактики ведения пациента врачу важно иметь убедительную информацию о присутствии или отсутствии жизнеспособных форм микроорганизмов в полости инфицированного сустава после эндопротезирования.

Данное исследование показывает возможность преодоления неизбирательного обнаружения бактериальной ДНК в ПЦР в режиме реального времени путем предварительной обработки образцов мономоазидом пропидия и различать жизнеспособные и нежизнеспособные бактериальные клетки.

Таким образом, обработка мономоазидом пропидия с последующей ПЦР в режиме реально времени может ингибировать амплификацию ДНК из нежизнеспособных клеток, не затрагивая ДНК из жизнеспособных клеток, тем самым предоставляя более точную информацию о наличии жизнеспособной бактериальной нагрузки.

Список цитированных источников

1. Перипротезная инфекция в ортопедии: легко ли установить данный диагноз? / А. Н. Бенько [и др.] // Медицинские новости. – 2023. – № 10. – С. 23–28.
2. Костюк, С. А. Молекулярно-биологические методы в медицине: монография / С. А. Костюк. – Минск : БелМАПО, 2013. – 327 с.
3. PMA (Propidium Monoazide). Product Information [Electronic resource]: Biotium. – Mode of access: <https://biotium.com>. – Date of access: 20.04.2024.
4. Modern approaches to differentiation of live and dead bacteria using selective amplification of nucleic acids / A. K. Baymiev [et al.] // Microbiology. – 2020. – Vol. 89. – P. 13–27.
5. Microbiological testing of clinical samples before and after periodontal treatment. A comparative methodological study between real-time PCR and real-time-PCR associated to propidium monoazide / M. Sereti [et al.] // Clin. Exp. Dent. Res. – 2021. – Vol. 7, N 6. – P. 1069–1079.
6. Rak, M. Comparison of molecular and culture method in diagnosis of prosthetic joint infection / M. Rak // FEMS Microbiol. Lett. – 2013. – Vol. 343, N 1. – P. 42–48.
7. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study / H. Wisplinghoff [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 39. – P. 309–317.



Development of the «propidium monoazide – real-time polymerase chain reaction» method for the detection *Staphylococcus aureus* in the etiologic diagnosis of periprosthetic joint infection

Lyamtseva A. K., Kostiuk S. A., Poluyan O. S., Benko A. N.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Propidium monoazide is a DNA intercalating dye that has the ability to penetrate only non-viable bacterial cells with damaged membranes and is used in conjunction with real-time polymerase chain reaction (PCR) to differentiate between viable and non-viable bacterial cells. In this study, 25 samples from the cavity of endoprostheses joints, from patients with signs of periprosthetic infection, were treated with propidium monoazide or left untreated before DNA extraction for further detection of *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. The results showed that propidium monoazide inhibited the detection of non-viable bacterial cells. The developed author's method «Propidium monoazide – real-time polymerase chain reaction» can limit false-positive results in molecular diagnostics to establish the etiologic structure of periprosthetic infections, which requires further validation on clinical samples.

Keywords: propidium monoazide, PMA, PCR, periprosthetic joint infection, endoprostheses replacement, *Staphylococcus aureus*.

Поступила 05.06.2024

УДК 61:001.891

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ – ЛАБОРАТОРНО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ДЛЯ РЕШЕНИЯ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

Манаева Н. А.

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

Реферат. Статья посвящена описанию деятельности научно-исследовательской лаборатории, ее структуре, организации, важнейшим результатам научной деятельности за пятилетний период, показана ее роль в решении актуальных проблем для практического здравоохранения, подготовке научных работников высшей квалификации.

Ключевые слова: научно-исследовательская лаборатория, медицинская наука, подготовка научных кадров высшей квалификации.

Введение. Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет» (БГМУ) является одним из ведущих научных и образовательных учреждений Беларуси. В результате реорганизации БГМУ в 2023 г. путем присоединения государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (БелМАПО) организован Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины

(НИИ ЭиКМ) в состав которого вошла Научно-исследовательская лаборатория (НИЛ).

Приоритетным направлением деятельности НИЛ является развитие медицинских и биологических технологий, подготовка научных работников высшей квалификации по биологической и медицинской отраслям науки.

В НИЛ проводятся комплексные фундаментальные исследования различного уровня сложности, посвященные изучению механизмов возникновения и развития социально-значимых

заболеваний, разработке новых методов их профилактики, диагностики и лечения, а также разработка и валидация экспериментальных моделей различных заболеваний *in vivo*, доклинические исследования лекарственных средств, медицинских изделий, медицинских технологий и биомедицинских клеточных продуктов, проведение экспериментальных исследований по оценке безопасности и эффективности.

НИЛ является преемницей Центральной научно-исследовательской лаборатории Белорусского государственного института усовершенствования врачей, которая была создана в соответствии с постановлением Совета Министров СССР от 12.08.1961 № 735 и приказом Министерства здравоохранения СССР от 10.11.1961 № 496. История НИЛ началась в 1957 г., когда была создана группа из трех человек, имевшая в своем распоряжении экспериментальный блок и морфологическую лабораторию. В 1959 г. организуется виварий, и экспериментальная группа преобразуется в экспериментально-производственную лабораторию. С 1987 г. пятиэтажное здание НИЛ и двухэтажное здание вивария образуют единый территориальный и методический комплекс, расположенный в а/г Лесной.

Виварий является уникальным и единственным в Республике Беларусь, позволяющим содержать, кроме мелких животных (крыс, мышей, кроликов, морских свинок), до 20 крупных животных, и обладающим операционным блоком и всем необходимым оборудованием для выполнения хирургических вмешательств. Так, на базе вивария были проведены экспериментальные испытания на свиньях синтетических и биологических сосудистых протезов, имплантатов PTFE при регенерации спинного мозга. В основу структурной организации НИЛ был положен методологический принцип, в соответствии с которым были сформированы следующие научные подразделения: по экспериментальному моделированию патологических процессов, морфологическим, биохимическим, гормональным, иммuno-логическим методам исследования. В основном, этот принцип организации работы НИЛ сохранен и сейчас.

В настоящее время организационная структура НИЛ включает: отдел метаболической диагностики, отдел общей патологии, отдел иммунологии и биомедицинских технологий, группу ПЦР-диагностики.

Результаты и их обсуждение. Основными направлениями научной деятельности отдела общей патологии, возглавляемым ведущим научным сотрудником, кандидатом биологических наук Владимирской Т. Э. являются:

1. Разработки, направленные на создание адресной системы доставки, которая повысит эффективность тромболизиса за счет значительного увеличения участков связывания тромболитика с тромбом и уменьшит число геморрагических осложнений. В эксперименте показано, что использование иммунолипосомальной формы тромболитика на животных с острым инфарктом миокарда приводит к увеличению свободного просвета инфаркт-связанной артерии на 26 % по сравнению с группой липосомальной формы тромболитика и на 46 % по сравнению с группой нативного препарата. При этом объем ишемизированного миокарда у крыс на фоне тромболитической терапии с применением иммунолипосом уменьшается на 16 % по сравнению с группой липосомальных препаратов и на 26 % по сравнению с группой нативного лекарственного средства. Адресная доставка лекарств позволяет повысить эффективность лекарственных веществ, снизить дозы лекарственных препаратов, минимизировать побочное влияние лекарств на организм, нацелить препарат на орган-мишень, улучшить фармакокинетику и фармакодинамику уже существующих лекарств. Результатом выполнения данного проекта является создание новой лекарственной молекулы для лечения острого венозного тромбоза, не имеющей аналогов в мире.

2. Исследования по разработке методов прижизненной диагностики смертельных осложнений операций стентирования при ИБС и атеросклерозе коронарных артерий. Успешное применение эндоваскулярных вмешательств для лечения ИБС в ряде случаев сопровождается развитием осложнений: тромбы, повторное сужение стенки сосудов, развитие новой атеросклеротической бляшки в месте постановки стента. Особенно опасны вновь развившиеся атеросклеротические повреждения в коронарных артериях, которые могут появиться спустя годы после операции. Такие бляшки называются нестабильными и могут осложняться тромбозами, развитием инфаркта миокарда. Прижизненная диагностика таких изменений в сосудах, часто протекающих бессимптомно, поможет избежать фатальных сердечно-сосудистых осложнений. Для этого проводятся исследования, направленные на выявление связи между результатами патогистологических процессов в стенке стентированных сосудов, биохимическими изменениями в крови пациентов со стентами, данными клинических и УЗИ наблюдений. Реализация научного изыскания позволит определить простой, недорогостоящий и эффективный алгоритм лабораторной диагностики осложнений стентирования.

3. Исследования патогенетических механизмов развития и лечения легочной артериальной гипертензии. В эксперименте *in vivo* установлены молекулярно-клеточные механизмы развития необратимого ремоделирования легочных сосудов при легочной артериальной гипертензии (ЛАГ), определены маркеры оксидативного стресса у пациентов с ЛАГ, разработан алгоритм диагностики легочной артериальной гипертензии.

Ведутся исследования по изучению механизмов противовоспалительного действия тимохинона в процессе развития ЛАГ в эксперименте, разработке метода прогнозирования развития ЛАГ у пациентов с тромбоэмбolicеской болезнью легких, а также изучения эффективности использования локальных систем доставки антипролиферативных средств для лечения ЛАГ в эксперименте.

В отделе иммунологии и биомедицинских технологий с 2006 г. сформирована и функционирует по настоящее время научная школа «Иммунобиология стволовой клетки» (руководитель – Зафранская М. М., д-р мед. наук, профессор). Основными направлениями научной деятельности являются:

– фундаментальные исследования регенеративных, иммуномодулирующих, миграционных, дифференцировочных свойств мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК);

– разработка протоколов выделения, получения, направленной дифференцировки стволовых клеток человека в клетки разных типов тканей при культивировании *in vitro* и криоконсервирование культур ММСК для последующего использования в клеточной терапии;

– оценка влияния клеточных культур на процессы воспаления и фиброгенеза;

– разработка методических подходов к оценке иммуномодулирующих свойств мезенхимальных стволовых клеток (МСК) *in vitro*;

– разработка *in vitro* и *in vivo* экспериментальных моделей патологии человека для оценки эффективности клеточной терапии.

Коллективом научной школы изучены иммуномодулирующие свойства ММСК костного мозга пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, адаптирована и оценена валидность экспериментальной модели язвенного колита и болезни Крона для оценки эффективности клеточной терапии; разработаны методы клеточной терапии болезни Паркинсона, определения вероятности быстрого прогрессирования болезни Паркинсона, tandemной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в лечении

пациентов с рассеянным склерозом, лечения острой почечной недостаточности; разработаны лабораторные регламенты на производство культуры клеток нервной ткани и биомедицинского клеточного продукта (БМКП) ММСК костного мозга; разработаны технические условия на производство и зарегистрирован БМКП «Культура аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека».

Отдел метаболической диагностики с 2017 года возглавляет старший научный сотрудник Юрага Т. М. Основными научными направлениями в отделе метаболической диагностики являются:

– изучение особенностей формирования нарушений метаболизма при мочекаменной болезни на основе структурного анализа макромолекулярных (белки, липиды) и низкомолекулярных (ионы металлов) метаболитов;

– разработка и внедрение в практическое здравоохранение новых методов диагностики мужского бесплодия для восстановления репродуктивной функции мужчин и формирование перспективных направлений сохранения мужского здоровья;

– формирование интеллектуальных информационных технологий: автоматическая оценка результатов лабораторных исследований с целью принятия клинического решения;

– разработка модели метаболического паспорта пациента при развитии хронической неинфекционной патологии человека (мочекаменная болезнь, доброкачественная гиперплазия предстательной железы и др.);

– количественный анализ концентрации лекарственных средств и их метаболитов в биологических образцах методом высокожидкостной хроматографии;

– валидация аналитических методик.

Под руководством доктора медицинских наук Ниткина Д. М. разработаны алгоритмы обследования с использованием компьютерной технологии *in silico* (экспертная система), позволяющей врачу-клиницисту проводить интегральную оценку лабораторных показателей у пациентов с мочекаменной болезнью (МКБ), метод определения метаболических нарушений, развивающихся при МКБ и дисфункции почечных канальцев у детей, которые позволяют повысить эффективность консервативной терапии нефролитиаза у взрослых и детей, уменьшить число рецидивов МКБ, собрана «библиотека микрофотографий мочевых камней», ведутся научные исследования по разработке клинико-лабораторного алгоритма диагностики синдрома возрастных андрогенных и метаболических нарушений у мужчин,

способствующих развитию гиперпластических процессов предстательной железы.

Основными направлениями научной деятельности группы ПЦР-диагностики являются:

- изучение молекулярно-генетических факторов развития различных патологических состояний инфекционного и неинфекционного генеза;
- разработка молекулярно-генетических методов диагностики мультифакторных заболеваний человека и развитие предиктивной медицины.

Куратором данного научного направления является доктор медицинских наук, профессор Костюк С. А. В 2019 г. Костюк С. А. успешно выполнила грант Президента Республики Беларусь на тему «Изучить механизмы реализации патогенного потенциала *Mycoplasma pneumoniae* на основе анализа взаимодействий возбудителя с клетками бронхиального эпителия человека и определения генетических особенностей микроорганизма, влияющих на формирование факторов патогенности».

Научным коллективом группы ПЦР-диагностики за прошедший пятилетний период разработан ряд методов по выделению ДНК бактерий и вирусов из клеток отделяемого дыхательных путей, выявлению РНК *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* в синовиальной жидкости, диагностике инфекций, обусловленных *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*, резистентных форм атопических дерматитов, резистентных форм экземы, определения вероятности развития болезней периодонта, выявления вариантов генов, кодирующих белок-переносчик серотонина (*SLC6A4*), дофамин-бета-гидроксилазу (*DBH*) и препротахикинин (*TAC1*), оценки вероятности развития токсических осложнений 3–4-й степени при лечении острого лимфобластного лейкоза у детей. Разработаны способы определения уровней нормализованной экспрессии генов компонентов внеклеточного матрикса *MMP-2* и *MMP-9*, *COL2A1* и *COL6A1*, генов *PhoQ*, *PhoP*, *PmrK* *Klebsiella pneumoniae*. Разработаны биологические модели взаимодействия *M. pneumoniae* с клетками респираторного эпителия человека, позволяющие изучать активирующее действие *M. pneumoniae* и выделяемого ею CARDs-токсина на клетки респираторного эпителия.

В 2019–2023 гг. на базе НИЛ совместно с кафедрами выполнялась 91 научная тематика в рамках государственных программ по приоритетным направлениям развития медицинской науки: инновационных проектов, ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», ГПНИ «Трансляционная медицина», ГПНИ

«Конвергенция», ГПНИ «Химические технологии и материалы», ГПНИ «Биотехнологии», ГНТП «Новые методы оказания медицинской помощи», ОНТП «Экспертиза, реабилитация, качество оказания медицинской помощи», ОНТП «Здоровье матери и ребенка – основа здоровья нации», ГП «Наукоемкие технологии и техника», НТП Союзного государства «ДНК-идентификация», ОНТП «Гигиеническая безопасность», Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований, ГПНИ «Общество и гуманистическая безопасность», ГНТП «Радиоэлектроника-3», отдельные проекты фундаментальных и прикладных исследований.

За пятилетний период подано 3 заявки на изобретение, получено 4 патента на изобретение, 29 рационализаторских предложений, 23 инструкции по применению, зарегистрировано 9 информационных ресурсов, разработан 1 лабораторный регламент, 1 технические условия и получено 1 регистрационное удостоверение на производство биомедицинского клеточного продукта, опубликовано 3 монографии, 386 статей, тезисов и учебно-методических пособий, в том числе 65 публикаций за рубежом, результаты научных исследований доложены на 71-й республиканской и международной конференции.

Активно проводится внедрение результатов научных исследований в практику здравоохранения – 74 акта внедрения в практическое здравоохранение, в образовательный и научный процесс.

Приоритетным направлением НИЛ остается создание условий для подготовки научных кадров высшей квалификации, включающих научно-методическую помощь аспирантам и докторантам кафедр БГМУ, организацию рабочего места, обучение методикам, консультации, техническую помощь, участие в планировании экспериментов и контроль за их проведением. За период 2019–2023 гг. на базе НИЛ провели свои научные исследования, получили научно-консультативную и техническую помощь 41 аспирант, докторант и соискатель БелМАПО.

В НИЛ проводится работа по профессиональному росту сотрудников, подготовке научных кадров высшей квалификации для лаборатории. Так 2023 г. ученое звание профессора по специальности «Медицинская биология» присвоено главному научному сотруднику НИЛ Зафранской М. М., ученое звание доцента по специальности «Медицинская биология» присвоено ведущим научным сотрудникам НИЛ Владимирской Т. Э., Руденковой Т. В. и Полуян О. С. Под руководством д.м.н. Костюк С. А. успешно защищили кандидатские диссертации Полуян О. С.

(2019 г.) и Глинкина Т. В. (2023 г.) В настоящее время научный сотрудник Кулинич С. С. (научный руководитель – профессор Ю. М. Гайн), младший научный сотрудник Адамович А. Ю. (научный руководитель – доцент Зафранская М. М.), старший научный сотрудник Юрага Т. М. (научный руководитель – профессор Камышников В. С.) являются соискателями ученоей степени кандидата биологических наук.

В научную работу лаборатории вовлекаются студенты и магистранты, которые овладевают методиками и методологией научного поиска, технологией проведения научных исследований. В рамках соглашения о сотрудничестве, заключенного с учреждением образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, в отделе иммунологии и биомедицинских технологий выполнялось 99 курсовых, дипломных студенческих работ и магистерских диссертаций.

Привлечение к совместной работе с ведущими учеными НИЛ студентов во время преддипломной практики, аспирантов и магистрантов будет способствовать становлению их как будущих ученых.

Международной практикой подтверждения соответствия лаборатории считается ее аккредитация, то есть официальное признание того, что лаборатория является технически компетентной для выполнения испытаний [1, 2]. Аккредитация подтверждается кроме наличия помещений, оборудования, аттестованных (валидированных) методик и квалифицированного персонала еще и применением лаборатории риск-ориентированного подхода в системах менеджмента качества [3].

Техническая компетентность НИЛ и ее конкурентоспособность на рынке услуг в сфере оценки соответствия подтверждена аттестатом аккредитации № BY/112 2.5129 от 12.07.2019. В настоящее время с целью восстановления статуса аккредитованной лаборатории ведется работа по разработке мероприятий по внедрению и функционированию системы менеджмента в соответствии с требованиями ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 «Общие требования к испытательным и калибровочным лабораториям».

Перспективные направления развития НИЛ:

– разработка и внедрение в медицинскую практику новых, более эффективных лабораторных тестов на основании оценки индивидуального генетического профиля пациента и анализа

молекулярно-генетических характеристик микробиома человека;

– разработка и внедрение новых экспериментальных моделей *in vitro* и *in vivo* патологических состояний для оценки эффективности клеточной терапии;

– изучение фундаментальных аспектов возникновения мукозального иммунитета в патогенез иммунообусловленной патологии;

– совершенствование клеточных технологий для создания эффективной альтернативы клеточной терапии стволовыми клетками социально значимых заболеваний человека на основе получения клеточного секретома;

– совершенствование аналитических технологий и повышение качества лабораторной диагностики на базе внедрения новых диагностически значимых методик;

– разработка новых методов в терапии сердечно-сосудистых заболеваний на основе биодеградируемых наноконтейнеров, содержащих лекарственные средства и визуализирующие метки;

– расширение спектра доклинических исследований безопасности и эффективности лекарственных средств: оценка тератотоксичности и мутагенности, оценка специфической активности фармакологических субстанций, в первую очередь, действующих на систему кровообращения;

– формирование интеллектуальных информационных технологий: автоматическая оценка результатов лабораторных исследований с целью принятия клинического решения; автоматическое ведение протоколов экспериментальных исследований и контроля их выполнения;

– создание Центра доклинических исследований – исследовательской и образовательной базы для проведения доклинических испытаний лекарственных средств и изделий медицинского назначения и учебно-практических образовательных курсов на биологических моделях в условиях, максимально приближенных к клиническим.

Заключение. Функционирование НИЛ в составе НИИ ЭиКМ обеспечивает согласованное развитие науки и образования, создание целостной системы подготовки высококвалифицированных научных работников всех уровней и по всем направлениям научной деятельности; проведение полноценных фундаментальных и прикладных научных исследований, доклинических исследований импортно-замещающих лекарственных средств, изделий медицинской техники и медицинского назначения.

Список цитированных источников

1. Меньшиков В. В. Стандартизация в лабораторной медицине: потребности, пути, ограничения / В. В. Меньшиков // Проблемы стандартизации в здравоохранении. – 2012. – № 1–2. – С. 10–17.
2. Бадыгина Н. А. Проблемы стандартизации медицинских лабораторий в Республике Беларусь / Н. А. Бадыгина // Лабораторная диагностика Восточная Европа. – 2015. – № 3–4 (15–16). – С. 19–25.
3. Лавриненко, Д. В. Управление рисками в системе менеджмента качества испытательной лаборатории / Д. В. Лавриненко, И. А. Манакова, С. И. Штыховская // Журнал исследований по управлению. – 2021. – Т. 7, № 1.

The research laboratory is a laboratory and experimental platform for solving current problems of practical healthcare

Manayeva N. A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The article is dedicated to the description of the Laboratory's activities, its structure, organization, most important scientific results over a five-year period, its role in solving current problems for practical healthcare, training highly qualified scientific personnel is shown

Keywords: research laboratory, medical science, training of highly qualified scientific personnels.

Поступила 05.06.2024

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

РОЛЬ БЕЛКОВ РИБОНУКЛЕАЗ В ИММУННОМ ОТВЕТЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ РЕСПИРАТОРНОМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМЕ

Матлакова М. А., Павлов К. И., Канашкова Т. А., Черношей Д. А., Метелица Т. Г., Чегодаева Е. В., Макаревич Ж. А., Лагода О. Ю., Красовская В. С.

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

Реферат. Острый респираторный дистресс-синдром – острое, диффузное, воспалительное поражение легких, ведущее к повышению проницаемости сосудов легких, повышению массы легких и уменьшению аэрации легочной ткани. Новые знания о течении патологического процесса ОРДС позволяют усовершенствовать методы терапии и уменьшить риски осложнений. В данном исследовании на экспериментальной модели ОРДС у лабораторных крыс Wistar были изучены свойства белков группы рибонуклеаз А и их роль в иммунном ответе. Анализ показателей гемостаза, а также результаты серологических и молекулярно-генетических исследований показали,

что рибонуклеазы обладают иммуномодулирующими свойствами, вступая во взаимодействие с цитокинами, и оказывают влияние на механизмы коагуляции при данной патологии.

Ключевые слова: ОРДС, рибонуклеазы, ДВС-синдром, гемостаз, цитокины.

Введение. Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС; J80 в соответствии с МКБ-10; CB00 в соответствии с МКБ-11) – это

острое диффузное поражение легких, развивающееся как неспецифическая иммуновоспалительная реакция на патологический процесс в

паренхиме органа различной этиологии [1]. Актуальность такой проблемы, как ОРДС, сложно переоценить. Данное состояние может быть следствием пневмонии, сепсиса, травмы грудной клетки, инсульта, ингаляции токсических веществ, утопления, передозировки лекарственными или наркотическими веществами и др. Согласно данным The National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Clinical Trials Network, частота возникновения ОРДС достигает 79 на 100 000 населения в год [2]. Летальность, вызванная ОРДС, среди всех пациентов, достигает 46 %, в то время как летальность при ОРДС, ассоциированном с SARS-Covid 19, может варьироваться от 26 до 61,5 % [3].

Исследования показывают, что бактериальный липополисахарид (ЛПС) прямо или косвенно участвует во всех патогенетических звеньях ОРДС, ухудшая течение воспалительных заболеваний легких [3], и это одна из причин, по которым экспериментальные модели ОРДС у лабораторных животных часто включают в себя использование ЛПС. В данном исследовании с применением ЛПС *E. coli* и ЛПС *Ps. aeruginosa* рассматривается активность белков рибонуклеаз А у крыс Wistar.

Представители группы ферментов-эндонуклеаз – рибонуклеазы А (RNase-A) – представляют большое семейство дивергентных протеинов, молекулы которых содержат специфические элементы гомологичных последовательностей аминокислот с уникальной дисульфидной третичной структурой [4]. Рибонуклеазы, катализирующие расщепление РНК, участвуют в регуляции жизнедеятельности организма. Система деградации РНК также является первым этапом защиты против РНК-содержащих вирусов. Также члены семейства РНКазы А контролируют количество иммунных реакций, таких как антибактериальная и противогрибковая активность врожденного иммунитета. Рибонуклеазу эозинофильного происхождения (RNASE2) классифицируют в качестве ассоциированных с повреждением молекулярных структур. Таким образом, данные ферменты осуществляют сигнальную функцию в процессе инфекции, связанную с активацией иммунного ответа по Th2 пути [5]. Рибонуклеаза 7 (RNASE7) человека, экспрессируемая нейтрофилами и эпителиальными клетками, регулирует биосинтез цитокинов кожи, осуществляющих контроль нормальной микрофлоры и противодействие инфекциям [6]. Анализ актуальных исследований показал, что эктопическое введение внеклеточных РНКаз уменьшает воспаление в мышиных моделях черепно-мозговой травмы [7] и

инфаркта миокарда [8]. RNase1 играет роль в адаптивной иммунной системе путем усиления активации Т-клеток для устранения роста опухоли [9].

Материалы и методы. При моделировании ОРДС с использованием липополисахарида кишечной палочки (Модель 1) все манипуляции выполнялись у животных, фиксированных эластичным зондом и подвергнутых анестезии тиопенталом натрия из расчета 45 мг/кг массы животного. Моделирование ОРДС осуществлялось с использованием бактериального липополисахарида *E. coli* O111:B4 (производства Sigma-Aldrich, страна производства – Израиль). Непосредственно перед применением ЛПС растворяли во флаконе с использованием 0,9%-ного раствора хлорида натрия из расчета 100 мг на 4 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия (25 мг/мл). С целью внутрилегочного введения ЛПС у наркотизированных животных в 6–8 межреберье треугольника между лопаткой и грудным отделом позвоночника инсулиновым шприцем объемом 1 мл выполнялась инъекция 50 мкл приготовленного раствора липополисахарида *E. coli* O111:B4 (1,25 мг/животное) без непосредственного наблюдения (разреза). Контрольным животным аналогичным образом вводили 0,9 % раствора хлорида натрия в том же объеме.

Моделирование ОРДС с использованием липополисахарида *Pseudomonas aeruginosa* (производства Sigma-Aldrich, страна производства – Швеция) и внутривенного введения тромбопластина-кальциевой смеси (Модели 2 и 3) производилось аналогичным образом, за исключением дополнительного введения тромбопластина-кальциевой смеси. Лиофилизированную тромбопластина-кальциевую смесь (производства ООО «Технология-Стандарт», Российская Федерация) растворяли в 5 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия. Сначала лабораторным животным в боковую вену хвоста была введена тромбопластина-кальциевая смесь в дозе 20 мг/кг. Далее с целью внутрилегочного введения ЛПС у наркотизированных животных справа в 6–8 межреберье треугольника между лопаткой и грудным отделом позвоночника инсулиновым шприцем объемом 1 мл выполнялась инъекция 50 мкл приготовленного раствора липополисахарида *Pseudomonas aeruginosa* (1,25 мг/животное).

В качестве оптимального времени для выведения животных из эксперимента был выбран срок в 5 часов после инъекции (Модели 1 и 2). Данный выбор был обусловлен клиническими наблюдениями за лабораторными животными и информацией о пике активности цитокинов.

Для внутрилегочного введения пептида рибонуклеазы 2 (Модель 2 и пептид RNASE2) использовался фрагмент рекомбинантного белка RNASE2 человека с N-концевой меткой слияния (Prestige Antigens™, APREST83346-100UL, Sigma-Aldrich Co. LLC, страна происхождения – Швеция) в растворенном виде во флаконе в концентрации 3,9 мг/мл в объеме 100 мкл. Антигенная последовательность пептида: QFTWAQWFETQHINMTSQCTNAMQV. С целью внутрилегочного введения ЛПС и рекомбинантного белка RNASE2 человека у наркотизированных животных в 6–8 межреберье треугольника между лопаткой и грудным отделом позвоночника инсулиновым шприцем объемом 1 мл выполнялась инъекция 60 мкл (50 мкл приготовленного раствора липополисахарида (1,25 мг/животное) и 10 мкл раствора пептида рибонуклеазы в дозе 0,3 мг/кг). Для инъекции ЛПС и рибонуклеазы использовано правое легкое животного.

Исследования показателей гемостаза были выполнены с использованием наборов производства ООО «Технология-Стандарт» (Российская Федерация) и ООО «АнализМедПром» (Республика Беларусь) в соответствии с инструкциями изготовителей. Перед применением все реагенты тестировались с использованием референтной нормальной пулированной плазмы (РНП-плазмы, производства ООО «Технология-Стандарт» (Российская Федерация), стандартизированной по уровню четырех исследуемых показателей гемостаза: фибриноген (ФБ), тромбиновое время (ТВ), протромбиновое время (ПВ).

Для исследований методом иммуноферментного анализа (ИФА) использовалась сыворотка крови. Применявшиеся в исследовании наборы для исследований методом иммуноферментного анализа концентрации IL-6, TNF- α , D-димера в сыворотке крови крыс были предоставлены производителем Wuhan Fine Biotech Co., Ltd. (КНР). Исследование производилось в соответствии с инструкцией изготовителя.

Для молекулярно-генетического исследования после извлечения легких в месте введения от каждого органа отрезали фрагмент 5 мм по длине, ширине и высоте. Выделение РНК выполняли с использованием колоночного метода наборами производства ООО «АртБиоТех» (Республика Беларусь) в соответствии с инструкцией изготовителя. После инкубации полученных образцов РНК с ДНК-зой (НПК «Синтол», Российская Федерация) выполняли синтез кДНК с использованием набора «Реверта», производства ООО «АртБиоТех» (Республика Беларусь). Далее выполняли относительную количественную ПЦР в

реальном времени на аппарате ДТ-2 (Российская Федерация) с использованием праймеров производства ООО «АртБиоТех» (Республика Беларусь). При получении кривых экспрессии исключались показатели, флуоресценция которых многократно превышала среднее значение в группе и кривая флуоресценции не характеризовалась стандартным видом. Нормализацию результатов экспрессии проводили путем получения относительных данных после деления показателя флуоресценции при экспрессии гена рибонуклеазы на показатель флуоресценции гена актина β (для крыс: вариант 1, таблица 5).

Количественные значения исследуемых параметров определяли посредством теста описательной статистики: средние значения (Me) и их стандартные ошибки (Se), медианы (Me), нижний и верхний процентили (25 и 75 %) и их размах, 95% доверительный интервал (ДИ), максимальное и минимальное значение показателя. При изучении иммунологических признаков было использовано «правило 3 σ »: показатели, выходившие за пределы диапазона $M \pm 3\sigma$ исключались из выборки. Сравнительный анализ независимых выборок по количественным признакам проводили с использованием статистического критерия Стьюдента. Для принятия решений о различии между выборками использовали p -уровень значимости. Анализ наличия взаимосвязей изучаемых показателей проведен с использованием расчета коэффициента корреляции Пирсона (r) и его статистической значимости наличия связи при $p < 0,05$.

Отрицательный коэффициент показывает направление обратной связи между анализируемыми характеристиками, положительный – прямой связи. Величина коэффициента r указывает на силу имеющейся связи. При значении коэффициента r до 0,29 связь считали слабой, при $r=0,3-0,69$ – связь средней силы, при $r=0,7$ и более – сильная связь изучаемых показателей.

Статистическую обработку и анализ результатов исследования осуществляют с использованием табличного редактора Microsoft Office Excel и пакета программного обеспечения Statistica for Windows version 10 (StatSoft, Российская Федерация, серийный номер BXXR207F383402FA-V).

Результаты и их обсуждение. Однократное внутрилегочное введение ЛПС *E. coli* O111:B4 и ЛПС *Ps. aeruginosa* приводило к острому локальному воспалительному процессу. Лабораторные животные контрольной и опытной экспериментальной группы в первые 2 часа после манипуляции по внутрилегочному введению

находились под воздействием раствора тиопентала натрия. После пробуждения анестезированных крыс непрерывные клинические наблюдения продолжались в течение последующих 3 часов. Как после внутрileгочного введения двух видов бактериального липополисахарида, так и 0,9%-ного раствора хлорида натрия у лабораторных животных наблюдалась одышка, пилоэрекция, трепет, переворачивание. Введение ЛПС сингнойной палочки с тромбопластин-кальциевой смесью приводило к сходной клинической

картины. Лабораторные животные после пробуждения следующие 3 часа преимущественно сохраняли боковое положение.

Данный способ моделирования ОРДС характеризуется значениями относительной массы легких, показателей цитокинов, гемостаза, биохимических и гематологических показателей [11].

Полученные в результате лабораторных исследований данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнение показателей гемостаза, концентрации цитокинов и рибонуклеаз в сыворотке, а также относительных показателей экспрессии генов интерлейкина 6 и рибонуклеаз у крыс контрольной и опытных экспериментальных групп при моделировании ОРДС

Показатель	Отрицательный контроль (0,9%-ный раствор NaCl, 5 часов), n=25	Модель 1 (1,25 мг ЛПС E. Coli O111:B4, 5 часов), n=16	Модель 2 (1,25 мг ЛПС Pseudomonas aeruginosa, 20 мг/кг тромбопластин-кальциевой смеси, 5 часов), n=20	Модель 2 и пептид RNASE2 внутрилегочно (1,25 мг ЛПС Pseudomonas aeruginosa, 20 мг/кг тромбопластин-кальциевой смеси, 5 часов), n=15
TB, с	43,9 ± 4,4 (n=17)	26,5 ± 4,7 (n=16, p=0,0107)	54,8 ± 3,3 (n=20, p=0,0486)	50,5 ± 7,3 (n=15, p=0,4313; *p=0,5624)
PВ, с	26,6 ± 0,8 (n=17)	17,6 ± 2,4 (n=16, p=0,0008)	27,1 ± 0,6 (n=20, p=0,6197)	26,6 ± 5,3 (n=14, p=0,9957; *p=0,9031)
ФБ, г/л	1,94 ± 0,21 (n=10)	2,48 ± 0,12 (n=14, p=0,0257)	1,53 ± 0,13 (n=19, p=0,0902)	2,11 ± 0,31 (n=10, p=0,6398; *p=0,0487)
D-димер, нг/мл	211,8 ± 22,7 (n=15)	415,6 ± 21,2 (n=9, p=0,0000)	364,7 ± 15,6 (n=20, p=0,0000)	573,1 ± 40,3 (n=15, p=0,0000; *p=0,0000)
IL-6, пг/мл	128,8 ± 0,6 (n=15)	428,2 ± 118,3 (n=9, p=0,0031)	845,2 ± 237,8 (n=20, p=0,0139)	724,0 ± 195,7 (n=14, p=0,0039; *p=0,7147)
TNF-α, пг/мл	15,6 ± 2,0 (n=25)	32,4 ± 5,5 (n=16, p=0,0019)	17,2 ± 2,7 (n=19, p=0,6429)	35,9 ± 22,0 (n=5, p=0,0554; *p=0,1285)
RNASE2, нг/мл	0,48 ± 0,01 (n=10)	0,50 ± 0,02 (n=9, p=0,4193)	0,49 ± 0,01 (n=19, p=0,7786)	0,60 ± 0,01 (n=15, p=0,0000; *p=0,0000)
RNASE3, пг/мл	2454,3 ± 350,0 (n=10)	5268,5 ± 67,0 (n=9, p=0,0000)	5224,6 ± 47,4 (n=19, p=0,0000)	5445,6 ± 71,1 (n=15, p=0,0000; *p=0,0117)
IL6 ***	14,5±0,8 (n=8)	27,2±0,7 (n=5, p=0,0027)	10,3±0,4 (n=18, p=0,1906)	37,8±3,2 (n=14, p=0,1622, *p=0,0151)
RNASE5 ***	2,8±0,2 (n=7)	4,3± 0,2 (n=5, p=0,0372)	3,8±0,2 (n=18, p=0,4213)	8,4±1,5 (n=15, p=0,5336, *p=0,4028)
RNASE6 ***	0,1±0,0 (n=8)	0,1±0,0 (n=5, p=0,1129)	0,1±0,0 (n=18, p=0,1869)	1,2±0,2 (n=14, p=0,1949, *p=0,0621)
RNASE7 ***	0,2±0,0 (n=8)	2,1±0,7 (n=5, p=0,1458)	0,2±0,0 (n=18, p=0,4392)	3,7±0,5 (n=13, p=0,1665, *p=0,0350)

Примечание: В таблице в скобках указаны: n – количество исследованных животных, p – уровень статистической значимости изменения показателей животных по результатам использования статистического критерия Стьюдента по сравнению с отрицательным контролем; *p – по сравнению с моделью 2.

*** Нормализация экспрессии данного показателя выполнена относительно экспрессии гена актина-β крысы.

В сравнении с контрольной моделью, Модель 1 (1,25 мг ЛПС *Escherichia coli* O111:B4) характеризуется значимым снижением показателей ТВ и ПВ, а также повышением ФБ и D-димера; это указывает на активацию системы гемостаза у лабораторных животных, что соответствует патофизиологии I гиперкоагуляционной фазы ДВС синдрома. Повышение концентрации IL-6 и TNF- α в сыворотке крови является признаком системного воспаления, вызванного введением липополисахарида; также корреляционный анализ выявил сильную обратную связь между концентрацией TNF- α и длиной ПВ ($r=-0,900$; $p=0,037$), что является аргументом в пользу подтверждения явления иммунотромбоза в данной модели ОРДС.

Характеристика Модели 2 (1,25 мг ЛПС *Pseudomonas aeruginosa*, 20 мг/кг тромбопластин-кальциевой смеси) сходна с Моделью 1 в показателях фибринолиза и провоспалительных цитокинов, однако ТВ у животных данной модели удлиняется по сравнению с контрольной моделью, кроме того, корреляционный анализ выявил значимую прямую зависимость концентрации IL-6 в сыворотке крови и длиной ТВ ($r=0,498$; $p=0,025$) в Модели 2. Это является следствием введения тромбопластина и, тем самым, ускорением активации коагуляционных механизмов; к 5 часам наблюдения патологический процесс переходит из I фазы ДВС в его II гипокоагуляционную fazу. В Модели 2 ОРДС прослеживается значимая прямая зависимость между концентрацией RNASE2 и RNASE3 в сыворотке крови крыс ($r=0,673$; $p=0,002$), эта корреляционная связь указывает на то, что нарастание концентрации RNASE3 влечет за собой также продукцию RNASE2, даже если концентрация последней нарастает незначительно по сравнению с контрольной моделью.

В Модели 2 с введением пептида RNASE2 внутрилегочно (1,25 мг ЛПС *Pseudomonas aeruginosa*, 20 мг/кг тромбопластин-кальциевой смеси) в сравнении с контрольными показателями отмечено повышение концентрации ФБ, D-димера и IL-6, как и в других опытных моделях, однако значения ТВ и ПВ остались неизменными, что указывает на участие экзогенной рибонуклеазы в процессе гемостаза. Это же подтверждает наличие отрицательной корреляционной связи между ПВ и D-димером в данной модели ($r=0,715$; $p=0,004$) и положительной связи между IL-6 и D-димером ($r=0,749$; $p=0,002$).

Молекулярно-генетическое исследование паренхимы легких крыс контрольных и опытных экспериментальных групп продемонстрировало проявление рибонуклеазной энзиматической активности при экспериментальном ОРДС.

Экспрессия гена RNASE1 в Модели 2 имеет обратную корреляционную связь с уровнем D-димера в сыворотке крови крыс ($r=-0,506$; $p=0,038$), что указывает на противовоспалительные свойства. Однако, следует отметить, что при внутрилегочном введении пептида RNASE2 повышение уровня экспрессии RNASE1 ассоциировано с укорочением ТВ ($r=-0,703$; $p=0,007$).

Эозинофильный нейротоксин (RNASE2) также оказывал влияние на показатели гемостаза. В Модели 2 корреляция уровня его экспрессии и концентрации D-димера носила обратный характер ($r=-0,495$; $p=0,037$), как и в случае с уровнем экспрессии гена RNASE1. Кроме того, при введении экзогенной рибонуклеазы в последней модели уровень экспрессии RNASE2 в паренхиме легких имел обратную связь с системной концентрацией IL-6 ($r=-0,855$; $p=0,002$) и RNASE2 ($r=-0,745$; $p=0,008$): в то время, как системно концентрация нейротоксина в Модели 2 с пептидом возрастила, при этом локально его экспрессия подавлялась.

Активность другой рибонуклеазы эозинофилов (RNASE3) была тесно ассоциирована с воспалением, поскольку концентрация его значимо возрастала в каждой опытной модели по сравнению с контрольной. В то же время, введение пептида рибонуклеазы оказало влияние на дальнейшую его экспрессию (присутствует значимое различие между Моделью 2 и Моделью 2 и пептидом RNASE2 внутрилегочно). Корреляционная связь была обнаружена между системным уровнем RNASE3 и местным уровнем экспрессии RNASE5 ($r=0,664$; $p=0,007$). Это указывает на разнонаправленное действие белков рибонуклеаз в иммунитете, поскольку, будучи ангиогенином, пятая рибонуклеаза оказывает противовоспалительное действие, прямо противоположное действию третьей рибонуклеазы; данная система регуляции позволяет поддерживать баланс между активацией и подавлением иммунного ответа.

Кроме RNASE5, также защитную функцию имеет белок RNASE7. Исходя из корреляционного анализа, повышение уровня экспрессии гена, кодирующего данный белковый продукт в паренхиме легких, связано со снижением концентрации TNF- α ($r=-0,900$; $p=0,037$), кроме того, это еще одна рибонуклеаза, активно экспрессируемая в ответ на введение пептида RNASE2.

Заключение. Острый респираторный дистресс-синдром представляет собой острое воспалительное поражение легких, которое приводит к увеличению проницаемости сосудов и объема легочной ткани, а также к уменьшению аэрации легких. Новые научные открытия о ходе

патологического процесса ОРДС позволяют совершенствовать методы лечения и снижать риски осложнений. В данном исследовании на экспериментальной модели ОРДС у лабораторных крыс Wistar были изучены особенности активности энзиматических механизмов группы рибонуклеаз А и их роль в иммунном ответе. Белки рибонуклеазы А, кроме прямых противомикробных свойств, выполняют также иммунорегуляторную роль в патологическом процессе ОРДС. Их экспрессия тесно связана с различными показателями гемостаза и иммунного ответа от начала его развития и до разрешения. Пептид рибонуклеазы 2, вводимый лабораторным крысам с экспериментальным ОРДС внутривенно, являлся триггером как для высвобождения рибонуклеаз, оказывающих противовоспалительное действие (RNASE5 и RNASE7), так и для нейротоксических продуктов эозинофилов (RNASE2 и

RNASE3). При введении RNASE2 проявилась активность RNASE1 индуцировать процесс свертывания.

Пятая и седьмая рибонуклеазы проявляли защитные функции в отношении поврежденной ткани легких. Различие в динамике поддержания концентрации RNASE2 на местном и системном уровнях подтверждает наличие протективной функции в отношении генерализации воспалительного процесса при экспериментальном ОРДС. На основе совокупности проведенных исследований можно сделать вывод о том, что ферменты рибонуклеазы являются неотъемлемым звеном иммунопатогенеза ОРДС. Иммунорегуляторные эффекты рибонуклеарных энзиматических механизмов проявляются как местно – в паренхиме легких, так и системно – в сыворотке крови.

Список цитированных источников

1. Диагностика и интенсивная терапия острого респираторного дистресс-синдрома (Клинические рекомендации Общероссийской общественной организации «Федерация анестезиологов и реаниматологов») / А. И. Ярошецкий // Анестезиология и реаниматология. – 2020, – № 2. – С. 5–39.
2. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland / O. R. Luhr // Am J Respir Crit Care Med. American Lung Association – 1999. – Vol. 159, N 6. – P. 1849–1861.
3. Яцков, И. А. Липополисахарид и ОРДС, вызванный новой коронавирусной инфекцией: гипотезы и факты / И. А. Яцков, В. А. Белоглазов, Э. И. Ряпова // Медицинская иммунология. – 2022. – Т. 24, № 1. – С. 7–18.
4. Абатуров, А. Е. Рибонуклеазы а - древнейшие компоненты неспецифической защиты респираторного тракта / А. Е. Абатуров // Здоровье ребенка. – 2011. – № 5. – С. 136–142.
5. Рибонуклеазы с антипролиферативной активностью: молекулярно-биологические и биохимические свойства / В. С. Покровский [и др.] // Клиническая онкогематология. – 2016. – Т. 9, № 2. – С. 130–137.
6. The Antimicrobial and Immunomodulatory Function of RNase 7 in Skin / Franziska Rademacher [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2019. – Vol. 10. – P. 1–11.
7. Ribonuclease-1 treatment after traumatic brain injury preserves blood–brain barrier integrity and delays secondary brain damage in mice / T. J. Krämer [et al.] // Scientific reports. – 2022. – Vol. 12, N 1. – P. 5731.
8. RNase1 prevents the damaging interplay between extracellular RNA and tumour necrosis factor- α in cardiac ischaemia/reperfusion injury / H. A. Cabrera-Fuentes [et al.] // Thromb Haemost. – 2014. – Vol. 112. – P. 1110–1119.
9. Ribonuclease 1 Enhances Antitumor Immunity against Breast Cancer by Boosting T cell Activation / Y. N. Wang [et al.] // International Journal of Biological Sciences. – 2023. – Vol. 19, N 10. – P. 2957–2973.
10. Моделирование острого респираторного дистресс-синдрома у лабораторных животных / М. А. Матлакова [и др.] // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: сборник научных трудов / редкол. С. П. Рубникович, В. А. Филонюк; М-во здравоохранения Респ. Беларусь. – Минск: БГМУ, 2022. – 50-57 с.

Role of ribonuclease proteins in the immune response in experimental acute respiratory distress syndrome

*Matlakova M. A., Pavlov K. I., Kanashkova T. A., Chernoshey D. A., Metelitsa T. G.,
Lagoda O. Yu., Chegodaeva E. V., Makarevich Zh. A., Krasovskaya V. S.
Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

Acute respiratory distress syndrome is an acute, diffuse, inflammatory lesion of the lungs, leading to increased vascular permeability of the lungs, increased lung weight and decreased aeration of the lung tissue. New knowledge about the course of the pathological process of ARDS allows us to improve treatment methods and reduce the risks of complications. In this study, using an experimental model of ARDS in Wistar laboratory rats, the properties of ribonuclease A group proteins and their role in the immune response were studied. Analysis of hemostasis indicators, as well as the results of serological and molecular genetic studies have shown that ribonucleases have immunomodulatory properties, interacting with cytokines, and influence the mechanisms of coagulation in this pathology

Keywords: ARDS, ribonucleases, DIC syndrome, hemostasis, cytokines.

Поступила 05.06.2024

УДК 612.112.94:576.3/.7

ПРОДУКЦИЯ ГРАНЗИМА В ЛИМФОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ В КО-КУЛЬТУРЕ С КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИЕЙ K562

*Назаренко Е. М.^{1,2}, Нижегородова Д. Б^{2,1}, Морозова Н. А.³, Иванчик Г. И.²,
Колядич Ж. В.³, Зафранская М. М.^{1,2}*

¹*Учреждение образования «Международный государственный экологический институт
имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета,
г. Минск, Республика Беларусь;*

²*НИИ экспериментальной и клинической медицины Белорусского государственного
медицинского университета, Минский р-н, аг. Лесной, Республика Беларусь;*

³*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии
и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова»,
Минский р-н, аг. Лесной, Республика Беларусь*

Реферат. Одним из перспективных направлений оценки степени и динамики развития новообразований является характеристика молекулярных маркеров, связанных с противоопухолевой активностью иммунной системы. В статье представлены результаты анализа уровня внеклеточной продукции гранзима В лимфоидными клетками пациентов с доброкачественными и злокачественными синоназальными новообразованиями, полипозным риносинуситом в совместных культурах с опухолевой клеточной линией K562. Выявлено снижение содержание внеклеточного гранзима В в ко-культурах лимфоидных клеток пациентов со злокачественными новообразованиями относительно других исследуемых групп, что может свидетельствовать о нарушении механизмов цитотоксичности и быть использовано в качестве прогностического маркера малигнизации опухолевого процесса.

Ключевые слова: клеточная цитотоксичность, лимфоидные клетки, гранзим В, новообразования, клеточная линия K562.

Введение. Доброкачественные и злокачественные синоназальные новообразования

представляют собой гетерогенную группу опухолей, возникающих из поверхностей слизистых

оболочек полости носа и рта, ротоглотки и горлами. В начале своего развития заболевания носят бессимптомный характер или проявляются незначительными неспецифическими признаками, что затрудняет своевременную диагностику патологии.

Среди доброкачественных синоназальных новообразований большая часть приходится на инвертированную папиллому (ИП), которая преимущественно возникает у людей старше 50 лет и обычно диагностируется на поздней стадии, через 1–4 года после первого появления синоназальных симптомов. Отмечают следующие характеристики, отличающие ИП от других опухолей придаточных пазух носа: относительно высокий потенциал местной деструкции костей черепа, высокая частота рецидивов и риск злокачественной трансформации, который колеблется в пределах от 5 до 15 % [1].

Плоскоклеточный рак головы и шеи представляет собой наиболее частое злокачественное новообразование, возникающее в области верхних дыхательных путей, и является шестым по распространенности раком в мире. Заболевание оказывает серьезное влияние на качество жизни пациентов, что обусловлено, главным образом, относительно низкой реакцией на лечение и выраженной лекарственной устойчивостью. Выживаемость по-прежнему остается очень низкой, поскольку у 25 % пациентов наблюдается метастазирование в течение первых 5 лет после постановки диагноза [2].

Этиология злокачественных и доброкачественных синоназальных новообразований остается малоизученной, хотя определенные факторы, такие как курение, употребление алкоголя, аллергии или определенные профессиональные воздействия могут влиять на развитие и течение заболевания. В 40 % случаев сообщается о связи заболеваний с вирусом папилломы человека (ВПЧ), что предполагает причастность вируса к патогенезу. При этом серотипы ВПЧ 6 и 11 чаще обнаруживаются при доброкачественной ИП, а серотипы 16 и 18 (с высоким онкогенным риском) – при ИП с ассоциированной дисплазией или карциномой высокой степени [1, 2]. Несмотря на значительные достижения в области биотехнологии, разработки лекарств, роботизированной хирургии и подходов лучевой терапии, результаты терапии синоназальных новообразований остаются в основном неизменными в течение последних нескольких десятилетий [2].

Клеточная цитотоксичность является важным эффекторным механизмом лимфоидных клеток в борьбе с инфицированными и

трансформированными клетками организма. Уничтожение клеток-мишеней осуществляют преимущественно цитотоксические Т-лимфоциты и естественные киллеры (NK-клетки). Цитотоксические лимфоидные клетки могут вызывать цитолиз опухолевых клеток посредством направленного высвобождения лизических гранул (содержащих перфорин, гранзимы, гранулизин, кателицидин и др.) или путем индукции апоптоза, опосредованного рецепторами смерти, путем экспрессии FasL (CD95L) и лиганда, индуцирующий апоптоз, связанный с TNF (TRAIL). Взаимодействие этих лигандов с Fas (CD95) и TRAIL-R1/-R2 соответственно на клетках-мишених могут запускать сходный проапоптотический каскад сигналов. Считается, что грануло-макрофагальный киллинг является основным механизмом цитотоксичности лимфоидных клеток, поскольку для его реализации требуется меньше времени по сравнению с апоптозом, опосредованным рецепторами смерти. Лизические гранулы представляют собой специализированную подгруппу лизосом, которая содержит как лизосомальные, так и секреторные белки, включая перфорин и гранзимы, являющиеся сериновыми протеазами. Считается, что перфорин встраивается в мембрану трансформированных или инфицированных клеток и работает как канал, обеспечивающий проникновение гранзимов в цитоплазму клеток-мишеней.

Показано, что из всех гранзимов, охарактеризованных на сегодняшний день, только гранзим B в сочетании с перфорином одновременно необходим и достаточен для индукции апоптоза в опухолевых клетках [3].

Цель работы – оценка продукции внеклеточного гранзима B лимфоидными клетками периферической крови у пациентов с полипозным риносинуситом, инвертированной папилломой и злокачественными новообразованиями полости носа и околоносовых пазух в ко-культуре с опухолевой линией клеток K562.

Материалы и методы. В качестве клеток-эффекторов использовали мононуклеары периферической крови (МПК), полученные из венозной крови 20 пациентов (10 мужчин и 10 женщин, средний возраст – 61,5 (48,5 – 73,8) лет), среди которых 8 пациентов со злокачественными синоназальными новообразованиями, 6 пациентов с ИП, 6 пациентов с полипозным риносинуситом и 6 здоровых лиц, сопоставимых по возрасту и полу. Забор биологического материала осуществлялся после получения информированного согласия на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен локальными этическими

комитетами учреждений здравоохранения. МПК выделяли с помощью центрифугирования разведенной в физиологическом растворе периферической крови на градиенте плотности Roti®Sep 1077 (Carl Roth, Германия). В качестве клеток-мишени использовали суспензионную клеточную линию K562 в логарифмической фазе роста.

Совместное культивирование МПК и клеточной линии K562 (1×10^4 клеток на лунку) проводили в соотношении эфектор : мишень (E : T) 6,25 : 1 в культуральной среде RPMI-1640 (Sigma, Германия) с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки, 1%-ного антибиотика-антибиотика (Gibco, США) и 1%-ного L-глютамина (Gibco, Великобритания) в течение 3 дней при 37 °C с 5%-ным CO₂. В качестве контролей использовали монокультуры K562 (1×10^4 клеток на лунку) и МПК ($6,25 \times 10^4$ клеток на лунку).

Для оценки жизнеспособности клеток-мишени культуры K562 перед культивированием окрашивали флуоресцентным красителем карбоксифлуоресцеином (CFSE, Sigma, Германия) в концентрации 7 mM, а по окончании культивирования в пробы добавляли пропидий йодид (Elabscience Biotechnology, Китай). Регистрацию результатов выполняли на 10000 клеток K562 в пробе с использованием проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, США). В качестве положительного контроля клеточной гибели использовали K562, преинкубированные с этанолом (96 %) в течение 20 минут.

Концентрацию гранзима B в супернатантах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа согласно инструкции производителя с использованием коммерческого набора Human GzmB (Granzyme B) ELISA Kit (Elabscience Biotechnology, Китай). Чувствительность набора составила 9,38 пг/мл. Результаты регистрировали на микропланшетном фотометре «Sunrise» (Tecan, Австрия) при $\lambda=450$ нм.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8.0. Использовались показатели медианы, нижнего и верхнего процентилей (25-й процентиль \div 75-й процентиль). Сравнение групп и определение статистической значимости различий осуществлялось непараметрическим W-критерием Вилкоксона для зависимых и U-критерием Манна–Уитни для независимых переменных. Корреляционный анализ выполняли по Спирмену. Результаты считались статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования установлено, что совместное культивирование МПК как здоровых доноров, так и

пациентов исследуемых групп с опухоловой клеточной линией K562 приводило к статистически значимому увеличению содержания в супернатантах гранзима B по сравнению с монокультурами. При этом уровень внеклеточного гранзима B при спонтанной цитотоксичности у пациентов со злокачественными синоназальными новообразованиями ($0 (0 \div 1,6)$ пг/мл, рисунок 1, *a*) был снижен относительно пациентов с ИП ($4,6 (0 \div 66,1)$ пг/мл, $p=0,05$, рисунок 1, *б*) и контрольной группой ($52,2 (2,3 \div 140,1)$ пг/мл, $p=0,01$, рисунок 1, *в*), пациентов с полипозным риносинуситом ($4,5 (0 \div 10,7)$ пг/мл, $p=0,08$, рисунок 1, *в*). В совместных культурах лимфоидных клеток пациентов со злокачественными опухолями с K562 также наблюдалась сниженная концентрация внеклеточного гранзима B ($56,8 (1,5 \div 278,1)$ пг/мл, рисунок 1, *а*) по отношению к ко-культурам группы ИП ($395,8 (130 \div 422,4)$ пг/мл, $p=0,02$, рисунок 1, *б*), пациентов с полипозным риносинуситом ($189,5 (6,3 \div 405,5)$ пг/мл, рисунок 1, *в*) и доноров ($320,3 (45,4 \div 658,6)$ пг/мл, $p=0,03$, рисунок 1, *в*). Соответственно, стимуляция продукции гранзима B в совместных культурах с K562 по сравнению со спонтанной цитотоксичностью осуществлялась во всех исследуемых группах, однако у пациентов со злокачественными новообразованиями уровни гранзима B были значительно снижены по сравнению с пациентами с ИП и здоровыми донорами.

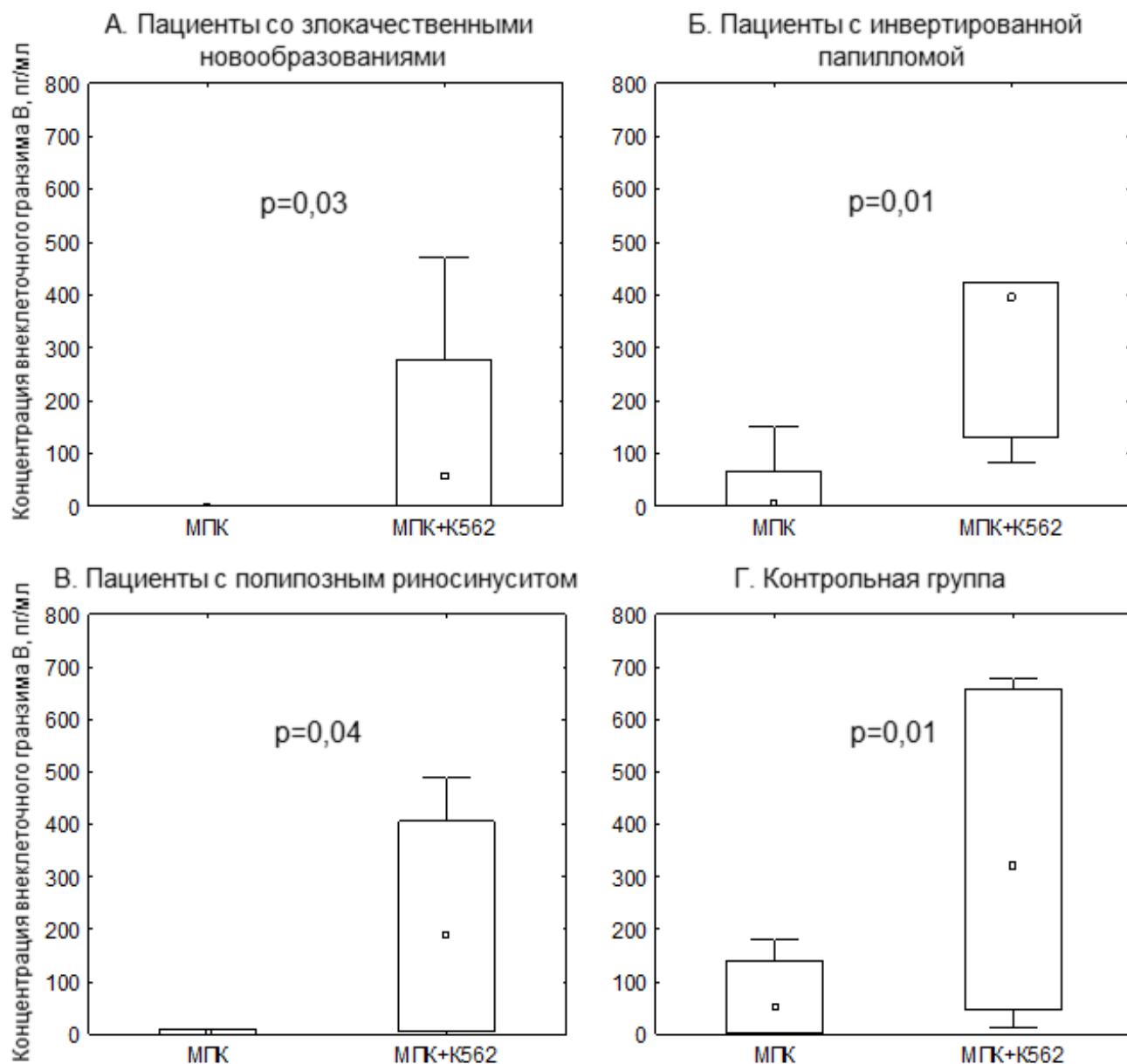
Выявлена связь между степенью злокачественности заболевания и содержанием в контрольных ($R=-0,4$; $p=0,01$) и совместных с K562 ($R=-0,3$; $p=0,05$) культурах внеклеточного гранзима B.

В дополнение к этому, показана связь между установленным диагнозом и значениями клеточной гибели культуры K562 при совместном культивировании с эфекторными клетками ($R=-0,6$; $p=0,04$). Однако статистически значимой корреляции между уровнями внеклеточной продукции гранзима B и гибелю клеток-мишней не установлено.

Такой результат может подтверждать недавние данные о том, что экспрессия гранзима B не всегда положительно коррелирует с противоопухоловой эффективностью. Некоторые исследователи установили, что мыши с дефицитом гранзима B продемонстрировали лучшую способность к уничтожению как аллогенных, так и сиингенных опухоловых клеток, чем мыши дикого типа [4]. Согласно литературным данным повышенная экспрессия гранзима B в опухолевом микроокружении связана с благоприятным

прогнозом при цервикальной интраэпителиальной неоплазии, кожном плоскоклеточном раке, колоректальном раке и меланоме. С другой стороны, высокая экспрессия коррелирует с плохим клиническим исходом у пациентов с карциномами шейки матки и носоглотки, что

свидетельствует о неоднозначности имеющихся данных относительно роли гранзима В при злокачественных новообразованиях, которая может зависеть от локального микроокружения опухоли [5].



Примечание: МПК – мононуклеары периферической крови,
 □ Медиана, □ 25%-75%, └ Диапазон без выбросов

Рисунок 1 – Уровни внеклеточного гранзима В (pg/мл) в монокультуре МПК и ко-культуре с K562 исследуемых групп:
А – пациенты со злокачественными новообразованиями;
Б – пациенты с инвертированной папилломой;
В – пациенты с полипозным риносинуситом;
Г – контрольная группа

Гранзим В представляет собой сериновую протеазу, обладающую широкой субстратной специфичностью с преимущественным расщеплением остатков аспарагиновой кислоты. Белок экспрессируется в виде зимогена, который содержит ингибирующий дипептид и N-концевой сигнальный пептид, направляющий его в эндоплазматический ретикулум, а затем отщепляется. Для попадания в лизические гранулы неактивный профермент модифицируется путем присоединения фрагмента маннозо-6-фосфата (M6P) в цистернах комплекса Гольджи, что обеспечивает дальнейшее перемещение белка к гранулам за счет рецептора M6P. Внутри секреторных гранул остаток M6P может как удаляться благодаря кислой среде (рН-5,5), так и сохраняться. Переход в активную форму сопровождается отщеплением ингибирующего дипептида цистеиновыми протеазами катепсином С или катепсином Н. Активность гранзима В внутри лизических гранул впоследствии ингибируется низким рН и связыванием с хондроитинсульфатным протеогликаном серглицином, предотвращая расщепление собственных белков клетки [3].

Исследования *in vitro* показали, что гранзим В индуцирует гибель клеток-мишеней двумя основными механизмами. Первый включает протеолитическую активацию каспазы-3 и каспазы-7 в клетке-мишени, что вызывает каспазозависимую гибель клеток путем расщепления различных клеточных субстратов, включая ряд структурных и регуляторных белков в ядре, цитозоле и цитоскелете. Другой механизм связан с пермабилизацией внешней мембранны митохондрий посредством расщепления проапоптотического белка Bid. В дополнение к этому гранзим В также способен усиливать провоспалительные реакции

за счет расщепления про-интерлейкина-18 и интерлейкина-1 α . Хотя гранзим В селективен в отношении консервативных аминокислотных последовательностей своих субстратов, его цитотоксичность неспецифична для опухолевых клеток, что позволяет предположить, что гранзим В в активной форме, особенно той, которая высвобождается во внеклеточное пространство, может нанести вред обеим сторонам иммунного ответа в микроокружении опухоли [4]. На данный момент обнаружено, что, хотя цитотоксические Т- и НК-клетки являются преобладающими типами клеток, вырабатывающих гранзим В, многие другие неиммунные и иммунные клетки, включая Т-регуляторные (Tregs), В-регуляторные (Bregs) и плазмоцитоидные дендритные клетки (pDC) могут продуцировать и секретировать этот фермент для иммуносупрессивных целей. Поэтому установление особенностей сетей регуляции экспрессии и секреции гранзима В является перспективным направлением для дальнейшего углубления понимания взаимодействия иммунной системы с опухолевыми клетками.

Заключение. Таким образом, лимфоидные клетки пациентов всех исследуемых групп реагируют увеличением внеклеточной продукции гранзима В при совместном культивировании с опухолевой клеточной линией K562, однако уровень синтеза у пациентов со злокачественными синоназальными новообразованиями статистически значимо снижен как относительно пациентов с ИП, так и здоровых лиц, что может свидетельствовать о нарушении механизмов контактной цитотоксичности в противоопухолевой защите в патогенезе плоскоклеточного рака слизистых оболочек.

Список цитированных источников

1. Lisan, Q. Sinonasal inverted papilloma: From diagnosis to treatment / Q. Lisan, O. Laccourreye, P. Bonfils // European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases. – 2016. – Vol. 133, N 5. – P. 337–341.
2. Peltanova, B. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review / B. Peltanova, M. Raudenska, M. Masarik // Mol Cancer. – 2019. – Vol. 18, N 1. – 24 p.
3. Prager, I. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity / I. Prager, C. Watzl // Journal of Leukocyte Biology. – 2019. – Vol. 105, N 6. – P. 1319–1329.
4. Interaction Networks Converging on Immunosuppressive Roles of Granzyme B: Special Niches Within the Tumor Microenvironment / W. Wang [et al.] // Front. Immunol. – 2021. – Vol. 12 – 14 p.
5. The clinicopathological significance of the expression of Granzyme B in oral squamous cell carcinoma / N. L. Costa [et al.] // Oral Oncology. – 2010. – Vol. 46, N 3. – P. 185–189.



Granzyme B production in co-culture of lymphoid cells and K562 cell line

Nazaranka E. M.^{1,2}, Nizheharodava D. B.^{1,2}, Marozava N. A.³, Ivanchyk H. I.²,
Kolyadich J. V.³, Zafranskaya M. M.^{1,2}

¹International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University,
Minsk, Republic of Belarus;

²Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, of Belarusian State Medical University,
Minsk District, Lesnoy, Republic of Belarus;

³N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus,
Minsk District, Lesnoy, Republic of Belarus

One of the promising directions for assessing the levels and dynamics of tumor development is the characterization of molecular markers associated with the antitumor activity of the immune system. The article presents the results of granzyme B extracellular production by lymphoid cells of patients with benign and malignant sinonasal neoplasms, polypous rhinosinusitis in co-cultures with the K562 tumor cell line. A reduced content of extracellular granzyme B in co-cultures of lymphoid cells of patients with malignant neoplasms relative to other study groups was revealed which may reflect the disturbance of cytotoxicity mechanisms and can be used as a prognostic marker of tumor process malignisation.

Keywords: cell-mediated cytotoxicity, lymphoid cells, granzyme B, neoplasms, K562 cell line.

Поступила 05.06.2024

УДК 616-091.8:616-076.4:616.1

СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ РЕОРГАНИЗАЦИИ МИОКАРДА НА РАННИХ ЭТАПАХ ИЗОПРОТЕРЕНОЛ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ИШЕМИИ СЕРДЦА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Новаковская С. А., Федорова Е. В., Мунтянова М. В., Басалай А. А.

Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларусь», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Получены морфологические данные, иллюстрирующие динамику развития структурных изменений в сердечной мышце, сосудах микроциркуляторного русла, коронарных сосудах при моделировании изопротеренол-индукции ишемии сердца у крыс. Через сутки после введения препарата отмечаются признаки острой ишемии миокарда, характеризующейся деформацией и контрактурными повреждениями мышечных волокон, отеком интерстициальных пространств, формированием многочисленных очагов миоцитолиза и некроза кардиомиоцитов. Увеличение сроков ишемии миокарда сопровождается формированием очагов интерстициального и заместительного фиброза, прогрессированием микроангиопатий.

Ключевые слова: миокард, кардиомиоциты, микроциркуляторное русло, ишемия, некроз, фиброз.

Введение. Ишемическая болезнь сердца (ИБС) – это заболевание, которое характеризуется нарушением кровоснабжения миокарда вследствие поражения коронарных артерий. Данная патология сердца сопровождается

расстройством коронарного кровообращения, в результате которого отмечается недостаточное обеспечение сердечной мышцы кислородом и питательными веществами. Нарушение кровоснабжения миокарда способствует развитию ишемии

сердца, а также является причиной возникновения ишемического некроза. Согласно статистическим исследованиям, ежегодно во всем мире от ишемической болезни и синдрома внезапной сердечной смерти умирает около 3 млн человек, из них в Европе – 350 тыс. человек, а в США – 450 тыс. человек [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения смертность от ИБС в мире в 2019 году составила 8,9 млн человек.

В основе патогенеза ИБС лежит органическое сужение коронарных артерий вследствие их атеросклеротического поражения, коронаропарализма, коронаротромбоза. Факторами риска, способствующими прогрессированию ИБС, являются артериальная гипертензия, сахарный диабет, ожирение, повышение уровня холестерина в крови, стресс, наследственная предрасположенность. В крови пациентов при данной патологии отмечается повышение содержания липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), которые проникают в стенку сосудов и накапливаются в гладкомышечных клетках, усиливая их гиперплазию. ЛПНП под воздействием эндотелиальных факторов окисляются и становятся атерогенными, оказывают цитостатическое действие на эндотелиоциты, вызывая их разрушение и обнажение субэндотелиальных участков в зоне формирующейся атероматозной бляшки. У большинства пациентов спазм коронарных артерий происходит на фоне атеросклероза, при котором величина коронарной обструкции достигает 75 %, что приводит к возникновению клинических проявлений ИБС. Заболевание сопровождается острым коронарным синдромом и клинически проявляется формированием нестабильной стенокардии и острого инфаркта миокарда (ИМ). Иногда первым (и последним) проявлением болезни является внезапная сердечная смерть.

ИМ является острой клинической формой ИБС и сопровождается развитием некроза сердечной мышцы из-за внезапно возникшей недостаточности кровотока. Одним из механизмов развития ИМ является атероскллеротическое повреждение венечных сосудов и формирование «молодых» бляшек, имеющих крупное липидное ядро и тонкую фиброзную покрышку, которая при наличии определенных факторов может повреждаться и способствовать развитию тромбоза. При ИМ наблюдается растяжение и истончение пораженной зоны миокарда вследствие некроза поврежденной части сердечной мышцы. Отмечается увеличение площади несокращающегося участка миокарда, сопровождающееся повышением конечно-диастолического давления в левом желудочке (ЛЖ) сердца, увеличением его объема

с последующим развитием постинфарктного ремоделирования, которое сначала имеет адаптационный характер, а затем переходит в патологическую fazу. Усиливаются процессы апоптоза, образования и разрастания соединительной ткани не только в поврежденных участках сердечной мышцы, но и вне зоны инфаркта. Усиление систолической и диастолической дисфункции ЛЖ приводит к его дальнейшей дилатации и развитию застойной сердечной недостаточности (СН).

В настоящее время актуальным является изучение течения ИМ у пациентов молодого возраста, имеющих предрасполагающие факторы к раннему развитию и прогрессированию атеросклероза коронарных артерий. Фактором риска возникновения ИМ в молодом возрасте является генетическая предрасположенность, а также влияние наследственных механизмов на раннее развитие атеросклероза [2]. Выделяют наследственные формы гиперлипидемии, на фоне которых ИБС протекает с выраженным клиническими особенностями – раннее начало, «злокачественное» течение, несмотря на проведение традиционной терапии, что приводит к ранней инвалидизации и смерти [3]. Доказано, что на раннее развитие атеросклероза коронарных артерий влияет полиморфизм генов системы матриксных металлопротеиназ, эндотелиальной NO-синтазы, а также гены липопротеиновых рецепторов [4]. ИМ у пациентов молодого возраста часто возникает на фоне сахарного диабета и характеризуется менее благоприятным течением – более глубоким и обширным некрозом миокарда с развитием постинфарктных аневризм, тромбоэмболических осложнений, развитием СН и повторных инфарктов. Часто отмечается нетипичная картина ИМ с отсутствием или слабо выраженным болевым синдромом. Причинами возникновения ИМ у данных пациентов являются ранние атероскллеротические изменения венечных артерий, а также вазорегуляторные нарушения кровотока в коронарных артериях, приводящие к их спазму, нарушения свертывающей системы крови, сопровождающиеся тромбозами и тромбоэмболиями, идиопатическое расслоение коронарных артерий. Наличие сахарного диабета у пациентов, перенесших ИМ, является прогностическим фактором внезапной смерти, которая может быть вызвана развитием аритмий. Высокая смертность данной категории пациентов связана с развитием застойной СН и повторного инфаркта с расширением зоны некроза миокарда [5].

В основе процесса ишемического ремоделирования миокарда лежит гипертрофия и гибель кардиомиоцитов (КМЦ). Основным процессом,

определяющим потерю клеточной массы сердца, является некроз КМЦ, приводящий к возникновению воспалительной реакции, пролиферации сосудистых клеток, макрофагальной инфильтрации, активации фибробластов, формированию рубца. Апоптоз КМЦ сопровождается образованием апоптотических тел без активации воспалительной реакции. Гипоксия при ишемии миокарда сопровождается выраженным энергетическим дефицитом, при котором метаболизм переключается на анаэробный гликолиз, следствием которого является накопление молочной кислоты.

Исследование клеточных механизмов патогенеза сердечно-сосудистой недостаточности при острой ишемии миокарда является актуальным для выяснения характера и последовательности развития патоморфологических процессов в сердечной мышце на ранних этапах ее ишемического повреждения. Целью настоящих исследований явилось изучение структурно-функциональных изменений миокарда и коронарных сосудов при формировании острой сердечно-сосудистой недостаточности в эксперименте.

Материалы и методы. Исследования проведены на 30 половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с национальными и международными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных [6].

На данное исследование получено разрешение комитета по биоэтике Института физиологии НАН Беларусь (протокол № 10 от 05.02.2023 года). Для создания модели ишемического поражения миокарда и развития сердечной недостаточности ишемического генеза экспериментальным животным вводился β -адреномиметик изопротеренол подкожно в дозе 80 мг/кг двукратно с интервалом 24 ч [7].

Экспериментальные животные были разделены на группы: 1 группа – интактные крысы; 2 группа – крысы с моделированной 1-суточной ишемией миокарда; 3 группа – крысы с моделированной 7-суточной ишемией миокарда.

В работе использованы гистологические и иммуногистохимический методы исследования. Биоптаты сердца подвергались парафиновой заливке. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм готовились с помощью ротационного микротома CUT 5062 (SLEE Medical, Германия), наносились на стекла и окрашивались гематоксилином и эозином. Часть парафиновых срезов подвергалась окраске по ГОФП (гематоксилин Гарриса, основной фуксин, пикриновая кислота), позволяющей

выявлять ранние ишемические повреждения миокарда.

Иммуногистохимическое исследование проводили с применением первичных антител к α -гладкомышечному актину (α -SMA) (1 : 200) производства Zeta Corporation (США). Все этапы исследования выполнены согласно предложенному протоколу фирмы-производителя. Для детекции использовалась система 2-step plus Poly-HRP Anti Rabbit IgG Detection System (Elabscience, Китай). В роли хромогена выступал 1%-ный раствор 3,3-диаминобензидина тетрахлорида. Количественную оценку плотности α -SMA-положительных клеток (количество клеток в 1 мм^2) проводили в 10 полях зрения при увеличении $\times 200$, степень экспрессии маркера оценивали при увеличении $\times 400$. Результат иммуногистохимической экспрессии α -SMA в мышечных клетках коронарных сосудов крыс получали с помощью компьютерной программы обработки данных Image J (1.49k, США), результаты оценивались в условных единицах (у. е.) оптической плотности. Статистическая обработка материала проводилась с использованием пакета статистических программ Statistica 6 (Statsoft Inc., США). Исследование материала гистологических и иммуногистохимического исследований проводилось на световых микроскопах Optec BK 5000 (Китай) и Altami LUM-1 (Россия), оснащенных цифровыми камерами.

Результаты и их обсуждение. Гистологическое исследование миокарда ЛЖ сердца экспериментальных крыс через 1 сутки после моделирования изопротеренол-индукционной ишемии миокарда показало изменение архитектоники сердечной мышцы. Мышечные волокна деформированы, КМЦ имеют контрактурные изменения с чередованием участков пересокращения и растяжения миофибрилл. Миокард приобретает пористую структуру вследствие отека и расширения интерстициальных пространств, формирования очагов разволокнения мышечных волокон. На некоторых участках сердечной мышцы отмечаются отечные КМЦ с околоядерной вакуолизацией цитоплазмы. Выявляются многочисленные очаги лейкоцитарной инфильтрации миокарда с четкими границами. Большая часть сердечных миоцитов в зоне воспаления представлена набухшими бесструктурными клетками с отечными просветленными ядрами, находящимися в стадии лизического распада. Среди них определяются КМЦ с признаками некроза, имеющие сморщеные ядра (кариопикноз) и тонкий ободок светлой неравномерно окрашенной цитоплазмы. На поврежденных участках миокарда КМЦ

подвергаются полному распаду с формированием очагов миоцитолиза (рисунок 1, а). Характерно выявление в данных областях сердечной мышцы крупных мононуклеарных клеток, выполняющих роль резидентных макрофагов, фибробластов, плазматических клеток.

Исследование миокарда ЛЖ сердца экспериментальных крыс через 7 суток после моделирования изопротеренол-индуцированной ишемии миокарда показало прогрессирование структурных изменений, нарастание отека стромы и периваскулярных пространств. На значительных участках сердечной мышцы наблюдается беспорядочный разнонаправленный ход волокон мышечной ткани. Большая часть мышечных волокон имеет волнообразную направленность, а миокард приобретает неоднородную структуру вследствие отека интерстициальных пространств и разобщения сердечных миоцитов. Многочисленные очаги пересокращения, разволокнения и истончения мышечных волокон чередуются с участками их фрагментации и разрыва. На большем протяжении миокарда выявляются обширные очаги ишемического повреждения – очаги некроза КМЦ, окруженные лейкоцитарными скоплениями, формирующие четкую границу (рисунок 1, б). В центральных отделах очагов определяются рассеянные лейкоциты, фибробlastы, продуцирующие элементы соединительной ткани. В КМЦ вне зоны некроза отмечается конденсация и глыбчатость саркоплазмы, деформация ядер, их неравномерное увеличение и отечность, диффузное просветление хроматина, расплывчатость их контуров. В некоторых КМЦ наблюдаются некротические изменения, сопровождающиеся кариорексисом с последующим распадом ядер и лизисом саркоплазмы.

Исследование сосудов микроциркуляторного русла миокарда через 1 сутки после моделирования ишемии показало формирование микроangiопатий на фоне развившейся эндотелиальной дисфункции. Капилляры артериального и венозного типов находятся в спазмированном состоянии. Просветы мелких артериол умеренно сужены. Их стенки отечны вследствие плазматического пропитывания, базальная мембрана утолщена, эндотелиальная выстилка повреждена из-за некроза эндотелиоцитов и слущивания их в просвет сосудов. Выражен периваскулярный отек и лейкоцитарная инфильтрация околососудистого пространства. На участках поврежденного миокарда, в очагах лейкоцитарной инфильтрации, выявляются мелкие капилляры, заполненные эритроцитарными массами (рисунок 2, а). Отмечается сладж-феномен, приводящий к тромбозу капилляров микроциркуляторного русла и нарушению

кровоснабжения миокарда. Диапедез эритроцитов в окружающее пространство способствует образованию мелких интракардиальных тромбов. В коронарных артериях наряду с вышеописанными изменениями эндотелиальной выстилки наблюдается очаговая гиперплазия intimы и субэндотелиальный отек. Выявлены признаки дистрофических изменений и гиперплазии гладкомышечных клеток меди, неравномерное утолщение и извитой ход внутренней эластической мембранны (рисунок 3, а). Гладкомышечные клетки имеют вакуолизированную окси菲尔ную цитоплазму и пикнотичные гиперхромные ядра. В ряде коронарных сосудов визуализируются перинуклеарные просветления цитоплазмы клеток мышечного слоя с отеком и разрыхлением стенки сосудов. В адвенции наблюдается отек и разволокнение соединительной ткани. В данной области выявляются фибробласты, вокруг которых формируется нежная сеть соединительнотканых волокон. Отек интерстициальных пространств сопровождается появлением в миокарде многочисленных очагов лейкоцитарной инфильтрации, сосредоточенных в зонах некроза КМЦ. На 7-е сутки экспериментальной ишемии миокарда наблюдается прогрессирование микроangiопатий. Мелкие капилляры и венулы находятся в спазмированном состоянии. В просветах более крупных сосудов капиллярной сети отмечается сладж-феномен. Наблюдаются утолщение и фрагментация базальной мембранны, альтерация эндотелиальной выстилки, некроз большей части эндотелиоцитов, их выбухание и слущивание в просвет сосудов (рисунок 2, б).

Стаз эритроцитов и скопления слущенных эндотелиальных клеток в сосудистых просветах, адгезия форменных элементов крови к эндотелию способствуют формированию микротромбов, нарушающих проходимость артериол. Отмечается расширение периваскулярных пространств за счет отека интерстиция миокарда, повышение пролиферативной активности фибробластов с последующей их дифференцировкой в миофибробласты, продуцирующих белки межклеточного пространства. Коллагенизация околососудистых пространств микроциркуляторного русла миокарда способствует прогрессированию эндотелиальной дисфункции. В коронарных артериях выражена гиперплазия эндотелиоцитов, которые располагаются частоколом и выбухают в просвет сосудов (рисунок 3, б). Выявляются обширные участки дезендотелизации и десквамации эндотелиоцитов. Мышечный слой артерий утолщен вследствие пролиферации гладкомышечных клеток. Выражен кариопикноз ядер миоцитов и вакуолизация цитоплазмы.

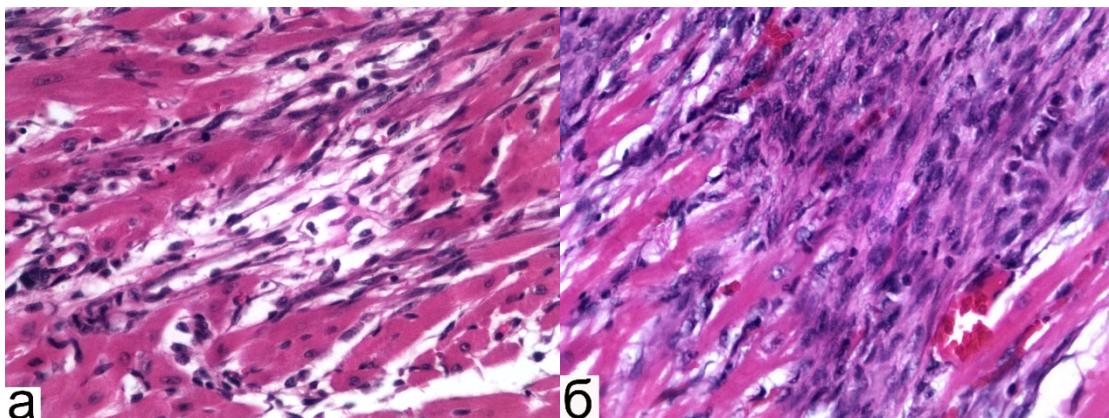


Рисунок 1 – Структурная организация миокарда крыс через 1 сутки (а) и через 7 суток (б) после моделирования изопротеренол-индуцированной ишемии сердца:
а – некроз КМЦ, очаги миоцитолиза; б – очаг некроза КМЦ (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$)

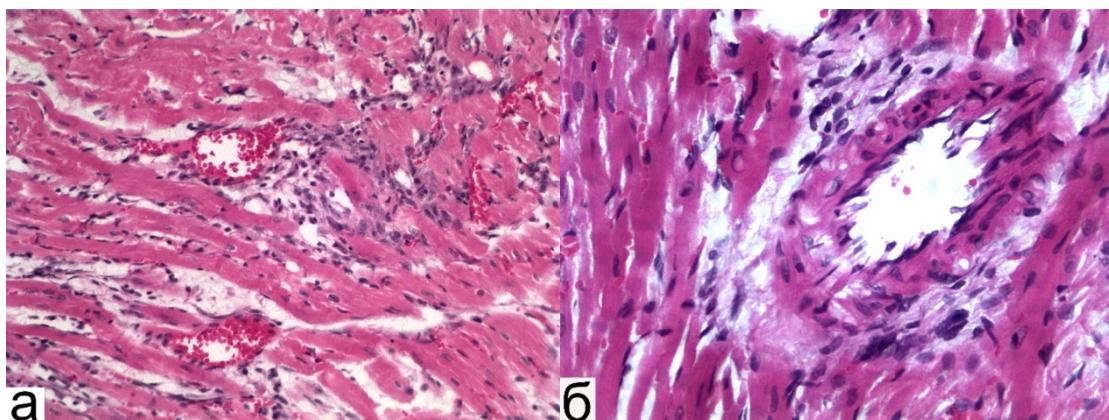


Рисунок 2 – Структурная организация сосудов микроциркуляторного русла миокарда крыс через 1 сутки (а) и через 7 суток (б) после моделирования изопротеренол-индуцированной ишемии сердца:
а – мелкие капилляры, сладж-феномен; б – альтерация эндотелиальной выстилки, некроз эндотелиоцитов, их выбухание и слущивание в просвет сосуда (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$ (а), $\times 400$ (б))

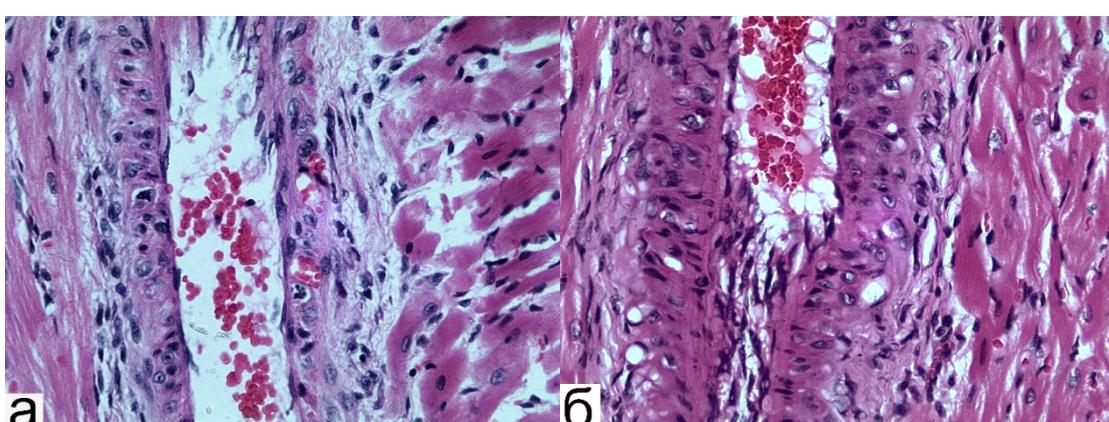


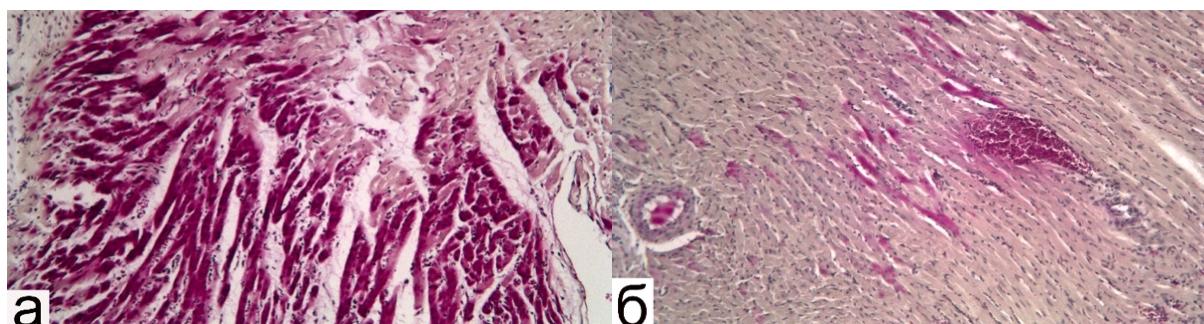
Рисунок 3 – Структурная организация коронарных сосудов крыс через 1 сутки (а) и через 7 суток (б) после моделирования изопротеренол-индуцированной ишемии сердца:
а – выбухание эндотелиоцитов в просвет сосуда; б – участки деэндотелизации и десквамация эндотелиоцитов в просвет сосуда (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$)

Визуализация очагов ишемического поражения сердечной мышцы при помощи окраски срезов миокарда ГОФП-методом выявила через 1 сутки после моделирования ишемии миокарда крупные очаги выраженной фуксинофилии цитоплазмы КМЦ в виде красного окрашивания. На 7-е сутки эксперимента участки ишемизированного миокарда имели вид мелких очагов с умеренной фуксинофилией цитоплазмы КМЦ, а прилежащие участки миокарда с пролиферирующими волокнами соединительной ткани принимали серо-сереневый оттенок (рисунок 4).

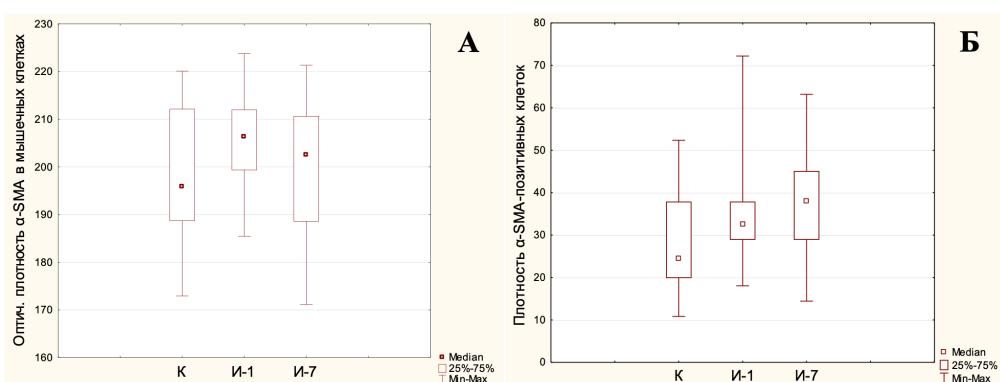
Площадь КМЦ с признаками ишемии через 1 сутки после моделирования ишемического поражения сердечной мышцы составляет 41,9 % [23,8; 58,2]. На 7-е сутки после моделирования ишемического повреждения миокарда площадь мышечных клеток в состоянии ишемии составила 11,5 % [6,6; 13,4]. Анализ экспрессии маркера гладкомышечного актина в структурных компонентах стромы миокарда на ранних этапах развития ишемии сердечной мышцы проводили путем определения оптической плотности α -SMA в гладкомышечных клетках кровеносных сосудов

миокарда. Исследование интенсивности реакции с актином гладкомышечных клеток показало, что достоверное повышение средней оптической плотности α -гладкомышечного актина ($p<0,05$) в мышечных клетках артериол относительно контрольных значений наблюдается при 1-й суточной ишемии миокарда. При 7-суточной ишемии миокарда сохраняется тенденция к повышению оптической плотности гладкомышечного актина.

Положительная экспрессия к маркеру α -SMA различной степени интенсивности обнаруживалась преимущественно в мышечном слое стенки сосудов и в клетках фибробластического ряда миокарда крыс всех групп исследования. Определение плотности α -SMA-позитивных клеток выявило через 1 сутки после моделирования ишемии миокарда достоверное ее увеличение ($p=0,01$) в сравнении с интактной группой. При прогрессировании ишемического поражения миокарда тенденция к возрастанию количества иммунопозитивных клеток с выраженной реакцией на антитела к α -SMA сохранялась ($p=0,01$) (рисунок 5).



**Рисунок 4 – Ишемическое повреждение миокарда крыс после моделирования изопротеренол-индуцированной ишемии миокарда (окраска ГОФП-методом, увеличение $\times 100$):
а – ишемия миокарда 1 сутки; б – ишемия миокарда 7 суток**



**Рисунок 5 – Оптическая плотность α -SMA в мышечных клетках кровеносных сосудов микроциркуляторного русла миокарда крыс (А), плотность α -SMA-позитивных клеток миокарда крыс на ранних этапах моделирования изопротеренол-индуцированной ишемии миокарда (Б).
К – контроль, И-1 – ишемия миокарда 1 сутки, И-7 – ишемия миокарда 7 суток**



Заключение. Моделирование 1 суточной изопротеренол-индуцированной ишемии миокарда приводит к развитию в сердечной мышце структурных изменений, характерных для острой ишемии миокарда – волнообразная деформация мышечных волокон, контрактурные повреждения КМЦ, истончение и разволокнение миофibrилл, отек интерстициальных пространств, очаги лейкоцитарной инфильтрации миокарда с четкими границами и некротически поврежденными КМЦ, миоцитолиз. Ремоделирование миокарда сопровождается активацией процессов коллагенообразования, формированием микроангиопатий, мелких интракардиальных тромбов. По мере увеличения срока ишемии миокарда отмечается прогрессирование структурных изменений сердечной мышцы. Беспорядочный разнонаправленный ход мышечных волокон, очаги пересокращения, истончения и разрыва миофibrилл, миоцитолиз, увеличение очагов некроза сердечной мышцы, замещение поврежденных КМЦ волокнами соединительной ткани являются характерными признаками продолжающейся структурной перестройки миокарда. Фиброз периваскулярных пространств микроциркуляторного русла миокарда, стаз эритроцитов в просветах сосудов способствуют прогрессированию эндотелиальной дисфункции и микроангиопатий. Повреждение

стенок коронарных артерий, очаговая деэндотелизация и десквамация эндотелиоцитов, субэндотелиальный отек, нарушение целостности наружной и внутренней эластических мембран, дистрофия гладкомышечных клеток, фиброз, отек периваскулярных пространств являются причиной стенозирования сосудов, развития коронарного тромбоза и гемодинамических нарушений сердца.

Увеличение площади ишемизированного миокарда в первые сутки после моделирования ишемии сердца свидетельствует о гибели большей части КМЦ на ранних этапах ишемии, а сокращение площади ишемизированных участков сердечной мышцы в более отдаленные периоды эксперимента и расширение полей коллагенизации миокарда указывает на развитие заместительного фиброза.

Увеличение в миокарде плотности α -SMA-позитивных клеток при прогрессировании ишемического поражения сердечной мышцы свидетельствует о трансформации популяции клеток стromы в миофибробластоподобные клетки, которые активно экспрессируют актин гладкомышечных клеток. Избыточная экспрессия α -актина гладкомышечными клетками имеет решающее значение в развитии фиброза, стимулирует синтез и накопление коллагеновых волокон.

Список цитированных источников

1. Markwerth, P. Sudden cardiac death-update / P. Markwerth, T. Bajanowski, I. Tzimas // Int. J. Legal Med. – 2021. – Vol. 135, N 2. – P. 483–495.
2. Krittawong, C. Acute Myocardial Infarction: Etiologies and Mimickers in Young Patients / C. Krittawong, M. Khawaja, J.-E. Tamis-Holland / J. Am. Heart Assoc. – 2023. – Vol. 12 (18, 029971).
3. Мешков, А. Н. Молекулярно-генетическая диагностика предрасположенности к развитию ишемической болезни сердца: современное состояние проблемы / А. Н. Мешков, Н. В. Щербакова // Consilium Medicum. – 2016. – № 12. – С. 22–26.
4. Matrix metalloproteinase-3 (MMP3) and MMP9 genes and risk of myocardial infarction, ischemic stroke, and hemorrhagic stroke / R. C. Kaplan [et al.] // Atherosclerosis. – 2008. – Vol. 201, N 1. – P. 130–137.
5. Khalid, S. H. Impact of diabetes mellitus on clinico-laboratory characteristics and in-hospital clinical outcomes among patients with myocardial infarction / S. H. Khalid, I. Liaqat, T. H. Mallhi.// J. Pak. Med. Assoc. – 2020. – Vol. 70, N 12(B). – P. 2376–2382.
6. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes, N 123 of 18 March 1986; Protocol of Amendment to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, Strasbourg, 22 June 1998.
7. Казаченко, А. А. Экспериментальное моделирование хронической сердечной недостаточности / А. А. Казаченко, С. В. Оковитый, А. Н. Куликов // Биомедицина. – 2013. – № 3. – С. 41–48.

Structural basis of myocardial reorganization in the early stages of isoproterenol-induced cardiac ischemia in experiment

Novakovskaya S. A., Fedorova E. V., Muntsianava M. V., Basalai A. A.

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

Morphological data were obtained illustrating the dynamics of the development of structural changes in the heart muscle, microvasculature and coronary vessels when modeling isoproterenol-induced cardiac ischemia in rats. One day after administration of the drug, signs of acute myocardial ischemia are observed, characterized by deformation and contracture damage to muscle fibers, swelling of the interstitial spaces, the formation of numerous foci of myocytolysis and necrosis of cardiomyocytes. An increase in the duration of myocardial ischemia is accompanied by the formation of foci of interstitial and replacement fibrosis and the progression of microangiopathies.

Keywords: myocardium, cardiomyocytes, microvasculature, ischemia, necrosis, fibrosis.

Поступила 05.06.2024

УДК 616.1

ВЛИЯНИЕ РОЗУВАСТАТИНА НА РАЗВИТИЕ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*Семенкова Г. Н.¹, Адзерихо И. Э.¹, Владимирская Т. Э.¹, Амаэгбери Н. В.²,
Жилкевич А. В.¹, Устемчук А. М.¹*

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

²*Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Изучено влияние розувастатина на развитие воспаления при легочной артериальной гипертензии (ЛАГ) у крыс в эксперименте. Для создания ЛАГ использовали 8-недельную монокроталиновую модель. Установлено, что применение розувастатина для терапии ЛАГ приводит к подавлению оксидативного стресса у крыс через 8 недель, после инъекции монокроталина. Это выражается в снижении кислородактивирующей способности нейтрофилов, уменьшении активности внеклеточной миелопероксидазы, увеличении концентрации общих тиолов и восстановленного глутатиона в крови. Уменьшение противовоспалительного цитокина интерлейкина-10 в легочной ткани и крови крыс с ЛАГ и увеличение провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 β и интерлейкина-6 свидетельствует о провоспалительной направленности цитокинового профиля крыс после проведения терапии.

Ключевые слова: легочная артериальная гипертензия, розувастатин, оксидативный стресс, воспаление.

Введение. Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) представляет собой гетерогенную группу заболеваний, которые характеризуются специфическим поражением легочных артериальных сосудов по типу плексогенной легочной артериопатии. ЛАГ является тяжелой, быстро-прогрессирующей патологией, при которой

пациенты, как правило, погибают от острой правожелудочковой недостаточности, возникающей вследствие неконтролируемого увеличения давления в легочной артерии и повышения легочного сосудистого сопротивления. Течение этого заболевания осложняется воспалением, сопряженным с последовательным усилением

оксидативного стресса, что приводит к дисфункции эндотелия [1, 2].

Несмотря на заметный прогресс в медикаментозном лечении пациентов с ЛАГ, это состояние, по-прежнему, является одним из самых жизнеугрожающих. В связи с этим необходим поиск новых молекулярных мишеньей для терапии данного заболевания, в том числе и с целью снижения риска деструктивных эффектов, обусловленных оксидативным стрессом.

В предыдущих исследованиях нами показано, что индуктором оксидативного стресса при индуцированной монокроталином экспериментальной ЛАГ могут быть нейтрофилы [3]. Эти клетки праймированы уже на ранних стадиях заболевания (через 2 недели). Причем, предактивация клеток динамично усиливается на всех этапах эксперимента (4, 6 и 8 недель). Это выражается в повышении генерации активных форм кислорода и хлора (АФКХ), увеличении способности клеток к формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек, а также усилении секреторной дегрануляции. В результате этого миелопероксидаза (МПО) высвобождается во внеклеточное пространство и продуцирует сильный окислитель, а также источник свободных радикалов – хлорноватистую кислоту [3, 4].

Среди перспективных лекарственных средств для терапии ЛАГ рассматриваются ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы, которые, помимо липидкоррегирующего действия, проявляют ряд плейотропных эффектов. Наиболее важными из них являются улучшение функции эндотелия, антиоксидантное, противовоспалительное, а также антитромботическое действие. Кроме того, ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы оказывают влияние на модификацию клеток, вызывая тем самым антипролиферативное воздействие на гладкомышечные клетки и уменьшение их миграции. Эффективным ингибитором ГМГ-КоА-редуктазы является розувастатин. Он продемонстрировал цитопротекторные и вакуолепротекторные свойства в дополнение к его способности снижать оксидативный стресс и воспаление при сердечно-сосудистых заболеваниях, в том числе и при ЛАГ в эксперименте [5].

Цель работы – изучение молекулярно-клеточных механизмов влияния розувастатина на развитие воспаления в динамике экспериментальной ЛАГ, что необходимо для установления терапевтического окна в случае медикаментозного применения этого статина.

Материалы и методы. В работе использовали розувастатин (Лекфарм, Беларусь), дексстран, гистопак-1077, люминол, питательную

среду RPMI-1640, пероксид водорода, монокроталин (МКТ), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (Hepes), 5,5-дигидроисобис-2-нитробензойную кислоту (DTNB), моноклоробиман (MCB) (Sigma, США), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Carl Roth+Co KG, Германия); антитела к ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-1 β (Thermo Fisher Scientific, США), коммерческие наборы реагентов для определения интерлейкинов (ИЛ) ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-1 β в сыворотке крови (FineTest, Китай); компоненты для приготовления фосфатного буферного раствора (ФБР) и сбалансированного буферного солевого раствора Эрла (СБСРЭ) (Анализ Х, Беларусь).

Исследования проводили на 60 взрослых белых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г в соответствии с принципами биоэтики с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (<https://bioethics.belmapo.by/research-ethics.html>). Для создания модели ЛАГ использовали 8-недельную МКТ-модель [3]. Крысы были разделены на контрольную (К) (n=20) и экспериментальную (n=40) группы. Экспериментальной группе вводили 1,0 мл раствора МКТ в дозе 60 мг/кг массы тела утром натощак подкожно в область холки. Группа К получала эквивалентное количество физиологического раствора. Животных, которым ввели раствор МКТ, дополнительно разделяли на четыре группы в соответствии с длительностью наблюдения и терапией розувастатином: I и Ia (продолжительность наблюдения – 4 недели, I – без применения, Ia – с применением терапии); II и IIa (продолжительность наблюдения – 8 недель, II – без терапии и IIa с применением терапии розувастатином), в каждой из этих групп n=10. Через 2 недели эксперимента ежедневно перорально через желудочный зонд крысам в течение 6 нед. вводили препарат розувастатин в дозе 20 мг\кг (группы Ia и IIa). По истечении срока эксперимента всех животных выводили из опыта, используя смесь 1 мл 0,005%-ного раствора фентанила и 2 мл 0,25%-ного раствора дроперидола (в соответствии со стандартами GLP). Развитие ЛАГ подтверждало гистопатологическими, морфометрическими, мультиспиральным компьютерным томографическим исследованиями.

Для гистопатологического исследования у крыс забирали ткань правого легкого. Из готовых парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином для обзорной микроскопии. Иммуногистохимическое окрашивание проводили в

соответствии с протоколами производителя, использовали антитела к ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-1 β . Количественную оценку экспрессии биомаркеров выполняли с применением алгоритма «positive pixel count» и программы для морфометрии Aperio Image Scope 12.3.3 (Leica, Германия).

В сыворотке крови крыс методом количественного твердофазного иммуноферментного анализа типа «сэндвич» определяли содержание уровней ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-1 β , как описано в инструкции к наборам. Измерения проводили на спектрофотометре Ф300 (Витязь, Беларусь).

Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной периферической крови крыс в градиенте плотности гистопак-1077 по стандартной методике. Клетки суспензировали в СБСРЭ (рН 7,2). Содержание нейтрофилов в суспензии составляло не менее 96 %.

Генерацию АФКХ нейтрофилами регистрировали методом люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) на биохемилюминометре БХЛ-1 (Минск, Беларусь). Оценивали суммарную интенсивность ХЛ ($I_{ХЛ}$), измеренной в течение 10 минут в системе, содержащей 1 мл СБСРЭ (рН 7,2), 1×10^5 клеток/мл, 25 мкМ люминола. Нейтрофилы стимулировали адгезией к поверхности стекла при 37 °C.

Пероксидазную активность МПО в плазме крови оценивали методом спектрофотометрии ($\lambda=650$ нм) на спектрофлуориметре СМ2203 (Солар, Беларусь) по скорости окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) пероксидом водорода в присутствии МПО. Реакцию инициировали внесением 0,3 ммоль/л раствора H_2O_2 . Пероксидазную активность фермента выражали в мкмоль/л ТМБ/(мин·мл), используя $\epsilon_{(650)} = 3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Уровень восстановленного глутатиона (GSH) в сыворотке здоровых и больных животных определяли с помощью флуоресцентного зонда МСВ, $\lambda_{ex}=390$ нм, $\lambda_{em}=480$ нм. Сыворотку разбавляли Нерес-буфером (рН 7,4) в соотношении 1 : 3. Полученные образцы инкубировали с 10 мкМ МСВ в течение 30 минут при 37 °C и регистрировали флуоресценцию в течение 5 минут. Результаты представлены как отношение уровня GSH в сыворотке больных животных к уровню GSH в контрольных образцах (сыворотка здоровых животных).

Общее содержание тиолов в плазме крови измеряли по методу Эллмана. В кювету вносили ФБР, добавляли 100 мкл плазмы крови здорового или больного животного. Затем к образцу добавляли 4 мкл реагента Эллмана и инкубировали в темноте при 37 °C в течение 5 мин. Оптическую

плотность ($\lambda=412$ нм) определяли с помощью спектрофлуориметра СМ2203 «Солар», Беларусь. Концентрацию тиольных соединений рассчитывали по формуле:

$$C_0 = \frac{A}{\varepsilon} \cdot F,$$

где C_0 – концентрация тиолов, моль/л; A – оптическая плотность при длине волны $\lambda=412$ нм; ε – коэффициента экстинкции, $\varepsilon=13980 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; F – фактор разбавления.

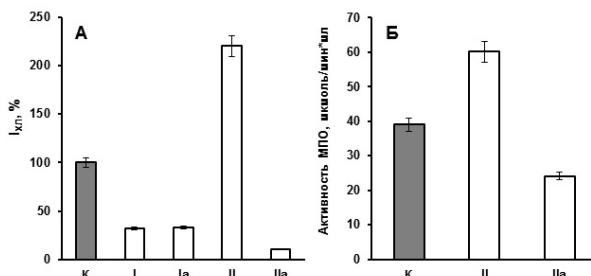
Статистический анализ данных проводился с помощью программы Origin, version 8.5.1 (OriginLab Corp.). Результаты исследования динамики уровня цитокинов в крови и в ткани легкого крыс представлены в виде Me (Q_1 , Q_3), где Me – медиана, Q_1 , Q_3 – нижний и верхний квартили соответственно. Для определения статистической значимости различий между группами использовали ранговый анализ вариаций Крускала-Уолиса. Остальные результаты представлены в виде $M \pm \sigma$, где M – среднее значение, σ – стандартное отклонение. Сравнение количественных показателей между группами проводилось с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) и теста Даннетта. Все различия считались значимыми при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Патогистологическая картина легких при ЛАГ, индуцированной МКТ, через 4 недели эксперимента (группа I) характеризуется изменениями в легочных артериолах, включающими мускуляризацию артериол, гипертрофию меди, гипертрофию интимы, выраженный периваскулярный отек и лимфоцитарную инфильтрацию. Через 8 недель эксперимента (группа II) изменяются легочные артерии и вены: наблюдается концентрический фиброз интимы, атрофия меди, плексiformная артериопатия. В легочной ткани обнаруживаются очаги фиброза, сохраняются участки массивных периваскулярных лимфоцитарных инфильтратов. В результате использования розувастатина в группе II отмечается уменьшение выраженности отека и воспаления, распространенности фиброза.

Ранее нами показано, что в динамике МКТ-ЛАГ для нейтрофилов животных характерно уменьшение на ранних стадиях (2 недели) и повышение на поздних стадиях заболевания (через 6 и 8 недель) генерации АФКХ и секреторной дегрануляции, что свидетельствует о предактивации клеток в циркулирующей крови [3, 4]. Мы проанализировали влияние розувастатина в концентрации 20 мг/кг на формирование

«респираторного взрыва» нейтрофилами крыс в динамике ЛАГ. Из рисунка 1А видно, что применение статина не влияет на продукцию АФКХ стимулированными клетками через 4 недели после индуцирования заболевания по сравнению с аналогичным параметром, полученным для клеток крыс с ЛАГ без терапии. Через 8 недель после инъекции МКТ выход АФКХ в нейтрофилах крыс с ЛАГ без терапии в 2,3 раза выше, чем в контроле (здоровые животные). Однако после применения розувастатина наблюдается снижение продукции этих активных интермедиатов более, чем в 6 раз по сравнению с контролем и в 15 раз по сравнению с клетками животных с ЛАГ без лечения.

Секреторная дегрануляция нейтрофилов сопровождается высвобождением из клеток гидролитических ферментов и МПО. Активация МПО приводит к образованию сильного окислителя и индуктора оксидативного стресса – хлорноватистой кислоты. Мы определили влияние розувастатина на пероксидазную активность МПО в плазме крови животных через 8 недель индукции ЛАГ. Как показано на рисунке 1Б, пероксидазная активность МПО в плазме крови крыс без лечения увеличивается в 1,5 раза по сравнению с контролем (здоровые животные). В то же время, у животных, получающих розувастатин, активность этого фермента через 8 недель эксперимента в 1,7 раза ниже, чем у крыс в отсутствие лечения, и в 2,5 раза ниже, чем у здоровых крыс. Эти данные свидетельствуют о способности розувастатина подавлять гиперпродукцию АФКХ нейтрофилами в динамике ЛАГ преимущественно за счет ингибирования МПО.



Важным показателем оксидативного стресса является превышение уровня оксидантов над антиоксидантами. Как следует из наших исследований, основной вклад в продукцию нейтрофилами АФКХ при ЛАГ вносит хлорноватистая кислота. Поскольку НОСи наиболее эффективно взаимодействует с сульфогидрильными группами, мы определили влияние розувастатина на концентрацию общих тиолов в плазме и уровень восстановленного глутатиона в сыворотке крови крыс через 8 недель после индуцирования ЛАГ. Из рисунка 2 видно, что на поздней стадии ЛАГ в крови значительно снижается по сравнению с контрольной группой содержание общих тиолов и GSH, что свидетельствует о развитии оксидативного стресса на этой стадии ЛАГ. Применение розувастатина для лечения ЛАГ приводит к увеличению концентрации общих тиолов и глутатиона в 2,0 и 1,5 раза соответственно по сравнению с контролем и в 3,3 и 2,0 по сравнению с группой животных с ЛАГ без терапии. Следовательно, розувастатин препятствует развитию оксидативного стресса у крыс с ЛАГ.

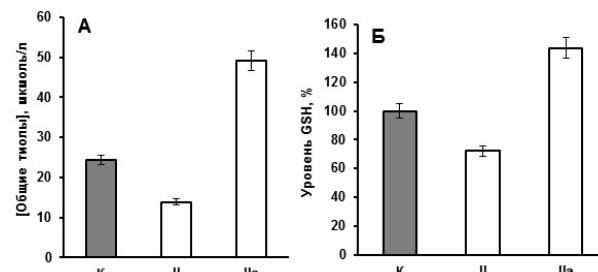


Рисунок 2 – Концентрация общих тиолов (А) и уровень GSH (Б) в сыворотке здоровых животных (К) и животных через 8 недель после введения МКТ в присутствии (Па) и отсутствие (П) розувастатина

Влияние розувастатина на динамику экспрессии про- и противовоспалительных цитокинов в ткани легкого крыс с ЛАГ представлено в таблице 1. Экспрессия ИЛ-1 β и ИЛ-6 практически не изменяется при ЛАГ, но возрастает в ткани животных, получавших розувастатин. В то же время экспрессия ИЛ-10 статистически значима, по сравнению со здоровыми животными, повышается через 8 недель после индуцирования ЛАГ и снижается до контрольного уровня в ткани крыс, получавших розувастатин. Анализ цитокинового профиля крови животных показал увеличение уровня ИЛ-1 β , ИЛ-6 и снижение уровня ИЛ-10 у крыс, получавших розувастатин по сравнению с нелеченными животными (таблица 2).

В крови и ткани легкого крыс, получавших розувастатин, отмечается значительное снижение противовоспалительного цитокина ИЛ-10 по сравнению с крысами без лечения. При этом, уровни ИЛ-1 β и ИЛ-6 этих животных ($p<0,05$) превышают аналогичные показатели у нелеченых крыс с ЛАГ. Эти данные показывают, что у крыс на фоне лечения розувастатином происходит сдвиг фенотипа иммунного ответа в сторону противовоспалительного варианта.

Таблица 1 – Влияние розувастатина на экспрессию цитокинов в ткани легкого крыс с индуцированной МКТ ЛАГ (Ме (25; 75))

Биомаркеры	Контроль	II	IIa	P
	1	2	3	
ИЛ-1 β , %	0,1 (0,04; 0,06)	0,08 (0,05; 0,11)	1,6 (0,93; 2,81)	P ₁₋₂ <0,05 P ₂₋₃ <0,05 P ₁₋₃ <0,01
ИЛ-6, %	4,25 (3,26; 6,64)	4,99 (3,93; 6,22)	7,72 (5,33; 10,6)	P ₁₋₂ <0,05 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,01
ИЛ-10, %	2,32 (1,48; 4,53)	9,68 (7,70; 12,39)	2,62 (0,99; 8,78)	P ₁₋₂ <0,05 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,01

Таблица 2 – Влияние розувастатина на уровень цитокинов в крови крыс с индуцированной МКТ ЛАГ (Ме (25; 75))

Биомаркеры	Контроль	II	IIa	P
	1	2	3	
ИЛ-1 β , пг/мл	1,64 (1,01; 8,5)	0,05 (0,0; 2,23)	2,08 (0,06; 6,14)	P ₁₋₂ <0,05 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,05
ИЛ-6, пг/мл	0,01 (0,01; 0,03)	5,3 (4,02; 5,72)	5,8 (3,94; 12,8)	P ₁₋₂ <0,05 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,05
ИЛ-10, пг/мл	44,91 (30,01; 52,4)	263,21 (90,34; 300,24)	91,29 (21,30; 144,62)	P ₁₋₂ <0,05 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,05

Заключение. На основании полученных результатов можно заключить, что использование розувастатина для терапии ЛАГ приводит к подавлению оксидативного стресса у крыс через 8 недель после инъекции МКТ, что выражается в снижении кислородактивирующей способности нейтрофилов, уменьшении активности внеклеточной МПО, увеличении концентрации общих

так как противовоспалительные макрофаги способствуют ремоделированию поврежденных тканей и ангиогенезу, можно предположить, что преобладание противовоспалительного фенотипа макрофагов будет способствовать процессам фиброза, что подтверждается выявленными микроскопическими изменениями в виде выраженных миофибробластических изменений через 8 недель эксперимента.

тиолов и восстановленного глутатиона в крови. Уменьшение противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в легочной ткани и крови крыс с ЛАГ и увеличение провоспалительных интерлейкинов (ИЛ-1 β и ИЛ-6) свидетельствует о провоспалительной направленности цитокинового профиля крыс после проведения терапии.

Список цитированных источников

1. New insights in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension / J. Bordenave [et al.] // Rev. Mal. Respir. – 2019. – Vol. 36 (4). – P. 433–437.
2. Морфологические изменения в динамике легочной артериальной гипертензии, индуцированной монокроталином в эксперименте *in vivo* / И. Э. Адзерихо [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2020. – № 64 (1). – С. 60–66.
3. Анализ роли нейтрофилов в развитии воспаления в монокроталининдуцированной легочной артериальной гипертензии / Г. Н. Семенкова [и др.] // Лабораторные животные для научных исследований. – 2023. – Т. 6, № 4. – С. 71–77.
4. Роль оксидативного стресса в развитии воспаления при легочной артериальной гипертензии / Г. Н. Семенкова [и др.] // Биохимия и молекулярная биология. – 2024. – Т. 3, № 1. – С. 67–73.
5. Effect of rosuvastatin as an anti-inflammatory agent in albino rats / V. S. Harish Kumar [et al.] // Asian J Pharmaceut Clin Res. – 2011. – Vol. 4 (2). – P. 74–76.

Rosuvastatin influence on the development of inflammation in pulmonary arterial hypertension in experiment

Semenkova G. N.¹, Adzerikhо I. E.¹, Vladimirskaia T. E.¹, Amaegberi N. V.²,
Zhilkevich A. V.¹, Ustemicchuk A. M.¹

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

²Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

The effect of rosuvastatin on the inflammation development in pulmonary arterial hypertension (PAH) in rats was experimentally studied. A 8-week monocrotaline model was used to create PAH. It was found that the application of rosuvastatin for PAH treatment leads to the oxidative stress suppression in rats 8 weeks after monocrotaline injection, which is expressed in a decrease in the oxygen-activating ability of neutrophils, a decline in the activity of extracellular myeloperoxidase, an increase in the concentration of total thiols and reduced glutathione in the blood. A decrease in the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the lung tissue and blood of rats with PAH and an increase in the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 indicate a pro-inflammatory orientation of the rats' cytokine profile after therapy.

Keywords: pulmonary arterial hypertension, rosuvastatin, oxidative stress, inflammation.

Поступила 05.06.2024

УДК 616.24–006.6–091.8–07:547.995.15

МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕЦИДИВА ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНОГО ЛЕЧЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ АДЕНОКАРЦИНОМОЙ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

¹Таганович А. Д., ¹Ковганко Н. Н., ¹Рутковская Ж. А., ¹Колб А. В., ¹Хотько Е. А.,
²Готько О. В., ²Прохорова В. И.

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;

²Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии
и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова,
Минский р-н, аг. Лесной, Республика Беларусь

Реферат. Изучалась возможность создания единого лабораторного критерия для определения вероятности развития рецидива опухоли у пациентов с I–ШВ стадиями adenокарциномы (АК) или плоскоклеточного рака легкого (ПКРЛ). В исследовании участвовало 222 пациента (140 мужчин и 82 женщины), поступивших в стационар государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова» (РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова) в период 2021–2022 гг., у которых впервые диагностирована АК (117) и ПКРЛ (105) I–ШВ стадии (согласно классификации TNM). Средний возраст составил $58,5 \pm 19,6$ лет. Созданы объединенные регрессионные уравнения, включающие абсолютные значения индивидуальных биомаркеров для пациентов с АК и ПКРЛ. На основе созданных объединенных уравнений построены nomограммы для оценки вероятности рецидива опухоли после проведенного лечения.

Ключевые слова: adenокарцинома, плоскоклеточный рак легкого, рецидив, эффективность лечения, биомаркер.

Введение. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) остается смертельно опасным заболеванием с плохим прогнозом. У пациентов с I стадией НМРЛ 5-летняя выживаемость составляет 60–70 %, при II стадии она уже снижается до 35–40 %, а при III стадии составляет около 15 % [1]. Основой лечения пациентов с диагностированными стадиями I–ШВ НМРЛ служит резекция опухоли в ходе хирургического вмешательства. Пациентам выполняется операция в объеме R0, что предполагает полное удаление опухолевой ткани, а у пациентов с IIIА, В стадиями заболевания хирургическое лечение сопряжено с химиотерапией. Несмотря на предпринимаемые усилия риск развития рецидива из-за микрометастазов после операции достаточно высок. Даже при I стадии рецидив опухоли диагностируется у 20 % пациентов, а при III стадии уже в первый год после проведенного лечения он развивается в 35–40 % случаев [1]. Он обусловлен наличием скрытых метастазов или оставшихся опухолевых клеток после резекции.

В соответствии с имеющимися протоколами каждые 3 месяца в течение первых двух лет после лечения все пациенты проходят врачебный осмотр [2].

В случае удовлетворительного самочувствия пациента компьютерная томография (КТ) проводится через 6 месяцев и через год после лечения. Однако рецидив может развиться раньше и протекать, по крайней мере, вначале бессимптомно.

Информативным средством дополнительной диагностики и прогнозирования исхода НМРЛ служат циркулирующие в крови участники метаболизма опухоли [3]. Их исследование имеет преимущества, связанные с доступностью и минимальной инвазивностью. К недостаткам следует отнести невысокие чувствительность и специфичность. Так, дискутируется возможность использования с этой целью концентрации в крови фрагмента 19 цитокератина (CYFRA 21–1), ракового эмбрионального антигена (СЕА), антигена плоскоклеточной карциномы (SCC), нейрон-

специфической енолазы (NSE), тканевого полипептидного антигена (TPA) и других [3].

В связи с этим актуальной задачей является разработка показателя (показателей), который(ые) бы позволил(и) предсказывать развитие рецидива у пациентов с тем, чтобы правильно построить стратегию и тактику их лечения. В настоящее время накоплено много информации о различиях между подтипами НМРЛ – аденокарцинома (АК) и плоскоклеточный рак легкого (ПКРЛ). Они касаются не только структурных особенностей, но мутаций генов. АК чаще встречается у некурящих женщин, в то время как ПКРЛ характерен для курящих мужчин. Течение заболевания при аденокарциноме менее агрессивно, характеризуется более благоприятным ответом на проводимое лечение. Вместе с тем, данные об уровне выживаемости пациентов с АК и ПКРЛ противоречивы. Согласно одним исследователям ПКРЛ характеризуется более высокой выживаемостью по сравнению с АК [1]. Другие пришли к выводу об отсутствии разницы в выживаемости между ними [3]. Наконец, согласно еще одной точке зрения, АК имеет более благоприятную 5-летнюю выживаемость пациентов по сравнению с ПКРЛ [4].

В поиске предикторов прогнозирования риска рецидива после проведенного лечения у пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого перспективны количественная оценка клеточного и белкового состава периферической крови. Нами по итогам проведенных ранее исследований были отобраны несколько биохимических маркеров, уровень которых до начала лечения имеет устойчивую связь с безрецидивной выживаемостью в раздельных группах пациентов с ранними (I–II стадии) и с IIIА, В стадиями АК и ПКРЛ [5, 6]. В их число вошли: концентрация SCC в сыворотке крови, доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, в общей популяции лимфоцитов крови, (CXCR2, %, лимфоциты) и доля моноцитов, снабженных CD44v6, в общей популяции лимфоцитов крови, (CD44v6, %, моноциты, уровень CYFRA 21–1, доля лимфоцитов, снабженных рецептором CXCR1 (CXCR1, %, лимфоциты), доля моноцитов, снабженных рецептором CXCR2 (CXCR2, %, моноциты), в общих популяциях этих клеток в крови. Было показано, что комбинированное их определение в составе сформированных регрессионных уравнений в каждом случае имеет преимущество в качестве прогностического фактора по сравнению с каждым из показателей в отдельности. Вместе с тем практическое здравоохранение нуждается как можно в более простом и в то же время

эффективном инструменте оценки состояния пациента. В стремлении упростить предложенные ранее регрессионные уравнения возникло предположение о возможности использования единых маркеров для оценки эффективности проводимого лечения у пациентов с АК и ПКРЛ.

Цель работы – создание единых регрессионных уравнений для пациентов с АК и ПКРЛ вне зависимости от стадии опухолевого процесса.

Материалы и методы. В исследовании участвовало 222 пациента (140 мужчин и 82 женщины), поступивших в стационар РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова в период 2021–2022 гг., у которых впервые диагностирована АК и ПКРЛ I–IIIБ стадии (согласно классификации TNM) [1]. Средний возраст составил $58,5 \pm 19,6$ лет. В группе пациентов с АК было 117 пациентов (79 мужчин и 38 женщин). В группе пациентов с ПКРЛ было 105 пациентов (61 мужчина и 44 женщины). У всех пациентов была проведена хирургическая резекция опухоли (объем оперативного вмешательства – R0). У пациентов с T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, T3N2M0 оперативного вмешательства дополнительно проводилось 4 курса адьювантной полихимиотерапии (АПХТ), включающих комбинацию винорельбина (В) – 25–30 мг/м² и цисплатина (Ц) – 80 мг/м². У пациентов с T4N0M0, T4N1M0, T4N2M0 до оперативного вмешательства проводилось 2 курса неоадьювантной полихимиотерапии, состоящих из комбинации В+Ц, затем выполнялась хирургическая резекция опухоли с последующим назначением 2 курсов адьювантной полихимиотерапии, состоящих из комбинации В+Ц.

Все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено решением Комитета по биомедицинской этике учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (протокол № 2 от 10.04.2021).

Уровень показателей измеряли до начала лечения и через 3 недели, 3 и 6 месяцев после окончания лечения соответственно. Сведения о развитии рецидива в течение 1 года после лечения у обследованных пациентов получены на основании данных Канцер-регистра Республики Беларусь (РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова). Рецидивы развились у 12 пациентов с I стадией (АК – 8, ПКРЛ – 4), у 19 – со II стадией (АК – 11, ПКРЛ – 8) и у 32 – с III стадией (АК – 16, ПКРЛ – 16). Кровь из локтевой вены собирали натощак в вакутайнер с ЭДТА-К2 в качестве антикоагулянта.

В образцах крови определяли концентрацию клеток на гематологическом анализаторе Sysmex XE-5000 (Sysmex Group, Япония). Для получения сыворотки кровь собирали в пробирку с тромбином и разделительным гелем. В сыворотке крови определяли концентрацию CYFRA 21–1 и антигена плоскоклеточной карциномы SCC на автоматическом анализаторе Cobas e411 (Rosche Diagnostics GmbH, Германия), используя принцип электрохемилюминесценции. Концентрацию рецепторов CXCR1 и CXCR2 в клетках лейкоцитарного ряда и плотность их расположения в мемbrane клетки определяли, используя проточный цитофлуориметр Navios (Beckman Coulter, США).

Результаты и их обсуждение. Для оценки вероятности рецидива у пациентов с АК исследовали количество эозинофильных лейкоцитов и моноцитов в крови, концентрацию антигена CYFRA 21–1 в сыворотке крови, интенсивность флуоресценции (MFI) рецептора CXCR1 в гранулоцитах, относительное количество рецепторов CXCR1 и CXCR2 в лимфоцитах через 3 недели, 3 месяца и 6 месяцев после окончания лечения.

Затем выполняли расчет величины интегрального показателя Y на каждом из сроков по формуле 1.

$$Y = \frac{exp(-12,735 + 0,527 \times X_1 + 0,312 \times X_2 + 0,237 \times X_3 + 0,217 \times X_4 + 0,311 \times X_5)}{1 + exp(-12,735 + 0,527 \times X_1 + 0,312 \times X_2 + 0,237 \times X_3 + 0,217 \times X_4 + 0,311 \times X_5)} \quad (1),$$

где X1 – результат определения концентрации антигена CYFRA 21–1 в сыворотке крови (нг/мл); X2 – относительное количество рецептора CXCR1 в лимфоцитах (%); X3 – интенсивность флуоресценции рецептора CXCR1 в гранулоцитах (безразмерная величина); X4 – относительное количество рецептора CXCR2 в лимфоцитах (%); X5 – результат определения отношения эозинофильные лейкоциты/моноциты в крови (безразмерная величина); exp – основание натурального логарифма ($\approx 2,718$); Y – результат соответствующего регрессионного уравнения.

Таблица 1 – Показатели диагностической информативности разницы значений регрессионного уравнения, вычисленного в разные сроки после проведенного лечения (для пациентов с АК)

Сроки забора крови	ПЗ	ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР	AUC	ДЭ
3 недели – 3 месяца	0,063	77,1	78,0	60,0	88,9	0,746	77,8
3–6 месяцев	0,127	88,6	89,0	77,5	94,8	0,858	88,9
3 недели – 6 месяцев	0,190	97,1	92,7	85,0	98,7	0,897	94,0

Определение вероятности рецидива опухоли в зависимости от разницы результатов регрессионного уравнения осуществляли в соответствии с пороговым значением по результатам проведенного ROC-анализа (таблица 1).

Для упрощения математической оценки в практической деятельности врача нами разработан графический метод (номограмма). После получения результата измерения каждого из 5 показателей, например, через 3 недели и 3 месяца, вычисляется разница их уровня в один из трех временных интервалов (3 недели – 3 месяца, 3–6 месяцев, 3 недели – 6 месяцев). Полученные значения разницы уровня каждого из показателей сравниваются с граничными значениями, находящимися на горизонтальной шкале для каждого индивидуального показателя (рисунок 1). Например, в период 3 недели – 3 месяца для CYFRA это первое число на соответствующей шкале данного показателя (индикатор $> 0,83$, направленный вверх).

Для периода 3–6 месяцев граничное значение для CYFRA будет $> 1,11$ (второй индикатор на горизонтальной шкале, направлен вниз). Для периода 3 недели – 6 месяцев граничное значение для CYFRA будет $> 1,94$ (третий индикатор на горизонтальной шкале, направлен вверх).

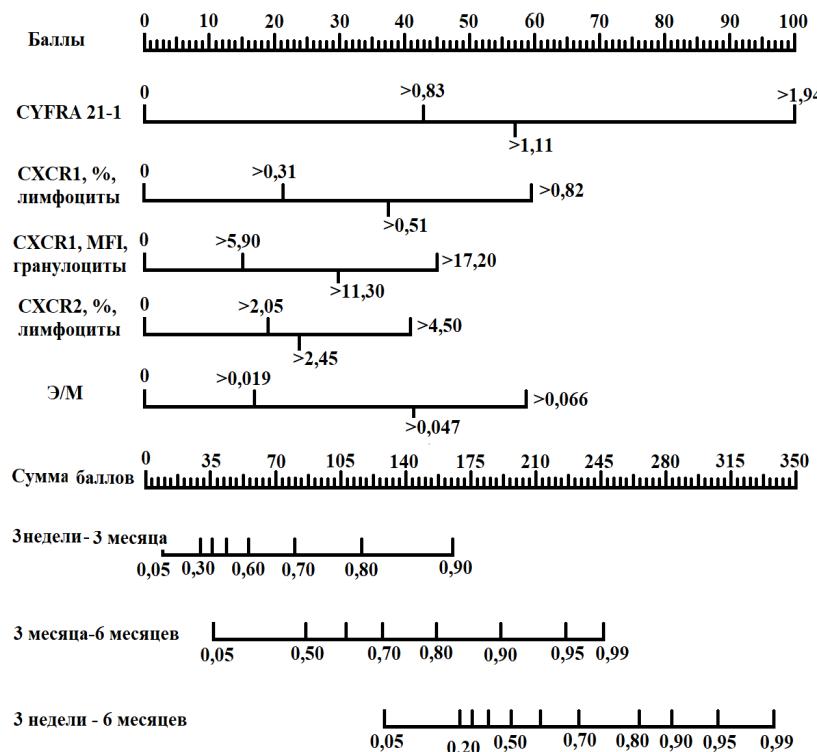


Рисунок 1 – Номограмма для определения вероятности рецидива у пациентов с АК по результатам разницы уровня показателей, измеренных через 3 недели, 3 и 6 месяцев после проведенного лечения

Если полученная разница в уровне показателя для данного временного интервала превышает соответствующее пороговое значение, то по верхней шкале «Баллы» определить вклад этого показателя в общую сумму баллов. Если меньше порогового значения для данного временного интервала – то вклад этого показателя считать равным «0».

Затем полученная сумма баллов по всем показателям проецируется на шкалу риска рецидива соответствующего временного периода наблюдения. Полученное значение, выраженное в доле от единицы, соответствует вероятности рецидива от 0 до 100 %.

В случае ПКРЛ в крови пациентов определяли концентрацию антигенов SCC и CYFRA 21-1 в сыворотке крови, относительное количество лимфоцитов, снабженных рецепторами CXCR1 и CXCR2, относительное количество моноцитов с рецепторами CXCR2 и CD44v6 в общей популяции этих клеток крови через 3 недели, 3 и 6 месяцев после проведенного лечения. Полученные данные вносили в формулу 2 и рассчитывали величину интегрального показателя Z для каждого из вышеуказанных интервалов времени.

Определение вероятности рецидива опухоли в зависимости от разницы результатов регрессионного уравнения осуществляли в соответствии с пороговым значением (таблица 2). Как и в случае с АК, для пациентов с ПКРЛ был разработан метод определения вероятности возникновения рецидива после проведенного лечения с помощью номограммы (рисунок 2).

Как уже упоминалось, все вышеперечисленные показатели крови, вовлеченные в исследование, были обоснованы нами ранее как перспективные для диагностики заболевания и прогнозирования безрецидивной выживаемости у пациентов с АК и ПКРЛ [5, 6]. В ходе отслеживания динамики изменения определяемых показателей в течение 1 года после проведенного лечения внимание привлекли несколько тенденций. Первая заключается в том, что в течение 3 недель после оперативной резекции опухоли значения всех показателей у всех пациентов снизились до величин, соизмеримых с ПЗ. Однако у части пациентов амплитуда снижения не достигла ПЗ, то есть осталась выше этой величины. У большинства таких пациентов (76,2 %) в дальнейшем, в течение года наблюдения, развивались рецидивы опухоли. Другие исследователи также наблюдали

снижение в крови концентрации CYFRA 21–1, карциноэмбрионального антигена (СЕА), которое, однако, было выражено в неодинаковой степени [3]. У части пациентов она снижалась по сравнению с уровнем до начала лечения, но не достигала пороговых значений. В этих исследованиях у пациентов были ранние стадии заболевания. Поэтому им проводилось только хирургическое лечение, и феномен резкого снижения уровня вышеизложенных показателей после операции по сравнению с и до операции обусловлен реекцией опухолевой ткани.

Следующая тенденция заключалась в нарастании (после снижения) уровня измеряемых показателей у части пациентов. У большинства из них (89,3 %) в дальнейшем развился рецидив. Другие исследователи ранее также отметили, что концентрация CYFRA 21–1 и СЕА в сыворотке крови пациентов с НМРЛ и удаленной опухолью часто после снижения в дальнейшем увеличивается. Причем, подобная динамика имела связь с развитием рецидива [3]. Опираясь на эти данные, исследователи пришли к выводу, что мониторинг концентрации СЕА в сыворотке крови пациентов с НМРЛ позволяет предсказывать рецидив с чувствительностью 74,7 % и специфичностью 69,8 % [3].

Сопоставимые результаты были получены для CYFRA 21–1, когда чувствительность и специфичность измерения уровня этого маркера в качестве ответа на лечение составили 79,1 и 60,6 % соответственно [4]. Причем, согласно результатам еще одного исследования, из пяти

сывороточных опухолевых маркеров (CYFRA 21–1, карциноэмбрионального антигена (СЕА), нейрон-специфической енолазы (NSE), углеводного антигена (СА) 125 и СА 19–9) только CYFRA 21–1 наиболее чувствителен для прогнозирования ответа на химиотерапию и подъем его уровня после первоначального снижения коррелирует с высокой вероятностью развития рецидива опухоли [3]. В другой работе сообщается о наблюдавшемся увеличении концентрации CYFRA 21–1 в сыворотке крови пациентов с АК, у которых в течение 1 года развился рецидив опухоли [7]. Исследование рецепторов цитокинов в клетках крови при АК до начала наших исследований не проводилось, но было известно о повышении их концентрации в микроокружении опухоли у пациентов с НМРЛ [1, 3]. Полученные нами данные были использованы для расчета разницы уровня определяемых показателей в фиксированных временных интервалах 3 недели – 3 месяца, 3–6 месяцев и 3 недели – 6 месяцев. Принципиально новых сведений этот прием не привнес, но он наглядно продемонстрировал прирост значений показателей, который увеличивался во времени наблюдения и был характерен только для пациентов с диагностированным рецидивом. Результаты анализа пропорциональных рисков Кокса показали существенную связь прироста уровня анализируемых показателей в каждом из временных интервалов с развитием рецидивов после проведенного лечения [6].

$$Z = \frac{\exp(-3,171 + 0,837 \times X_1 + 0,631 \times X_2 + 0,527 \times X_3 + 0,409 \times X_4 + 0,608 \times X_5 + 0,597 \times X_6)}{1 + \exp(-3,171 + 0,837 \times X_1 + 0,631 \times X_2 + 0,527 \times X_3 + 0,409 \times X_4 + 0,608 \times X_5 + 0,597 \times X_6)} \quad (2),$$

где X1 – результат определения концентрации антигена SCC в сыворотке крови (нг/мл); X2 – результат определения концентрации антигена CYFRA 21–1 в сыворотке крови (нг/мл); X3 – относительное количество лимфоцитов (%) с рецептором CXCR1; X4 – относительное количество лимфоцитов с рецептором CXCR2 в общей популяции этих клеток крови; X5 – относительное количество моноцитов с рецептором CXCR2 в %; X6 – относительное количество моноцитов с рецептором CD44v6 в %, exp – основание натурального логарифма ($\approx 2,718$); Z – результат соответствующего регрессионного уравнения.

Таблица 2 – Показатели диагностической информативности разницы значений регрессионного уравнения, вычисленного в разные сроки после проведенного лечения (для пациентов с ПКРЛ)

Сроки забора крови	ПЗ	ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР	AUC	ДЭ
3 недели – 3 месяца	0,088	89,7	76,3	59,1	95,1	0,752	80,0
3–6 месяцев	0,126	93,1	85,5	71,1	97,0	0,834	87,6
3 недели – 6 месяцев	0,214	96,6	92,1	82,4	98,6	0,891	93,3

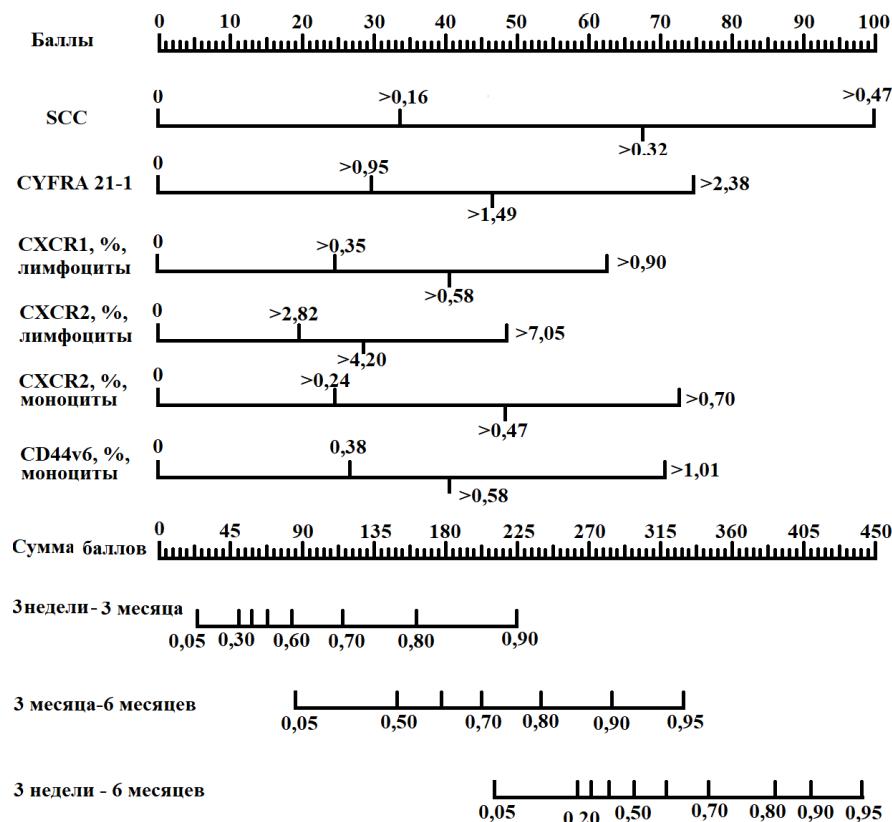


Рисунок 2 – Номограмма для определения вероятности рецидива у пациентов с ПКРЛ по результатам разницы уровня показателей, измеренных через 3 недели, 3 и 6 месяцев после проведенного лечения

Поэтому именно прирост во времени результатов расчета интегрального регрессионного уравнения был использован для определения вероятности развития рецидива у пациентов после лечения по поводу I-II и III стадий АК и ПКРЛ. Диагностическая ценность измерения прироста была гораздо выше значений чувствительности и специфичности определения абсолютных значений показателей, которые были получены не

только нами, в том числе на комбинированных моделях, но и другими исследователями [3, 7].

Заключение. Номограммы, построенные на базе разработанных объединенных регрессионных уравнений, позволяют определить вероятность развития рецидива для каждого пациента в отдельности.

Это делает предложенный метод удобным инструментом в работе врача-онколога.

Список цитированных источников

1. The comparison between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in lung cancer patients / B. Y. Wang [et al.] // J. Cancer Res. Clin. Oncol. – 2020. – Vol. 146, N 1. P. 43–52.
2. Сукачко, О. Г. Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований. Клинический протокол / О. Г. Сукачко, С. А. Красный. – Минск: Профессиональные издания, 2019. – 613 с.
3. Biomarkers along the continuum of care in lung cancer / S. Holdenrieder [et al.] // Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. – 2016. – Vol. 245. – P. 40–45.
4. Monitoring cytokeratin fragment 19 (CYFRA 21–1) serum levels for early prediction of recurrence of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in the lung after surgical resection / J. J. Yeh [et al.] // Lung. – 2002. – Vol. 180, N 5. P. 273–279.
5. Прогнозирование риска опухолевой прогрессии у пациентов с ранними стадиями adenокарциномы и плоскоклеточного рака лёгкого на основе лабораторных показателей / А. Д. Таганович [и др.] // Биомедицинская химия – 2021. – Т. 67, № 6. – С. 507–517.

6. Prognostic evaluation of relapse based on squamous cell carcinoma antigen, CXCR2, and CD44V6 blood levels in patients with Stage I-II squamous cell lung cancer / A. D. Tahanovich [et al.] // Global Transl. Med. – 2023. – Vol. 2, N 4. – P. 2209–307.

7. Prognostic factors in patients with pathologic T1–2N1M0 disease in non-small cell carcinoma of the lung / K. Matsuoka [et al.] // J. Thorac. Oncol. – 2007. – Vol. 2, N 12. – P. 1098–102.

Method for predicting recurrence after treatment in patients with adenocarcinoma and squamous cell lung cancer

Tahanovich A. D.¹, Kauhanka M. M.¹, Rutkovskaya Zh. A.¹, Kolb A. V.¹, Khotko E. A.¹, Gotko O. V.², Prokhorova V. I.²

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

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

The possibility of creating a single laboratory criterion to determine the likelihood of tumor recurrence in patients with stages I-IIIB adenocarcinoma (AC) or squamous cell lung cancer (SCLC) was studied. The study involved 222 patients (140 men and 82 women) admitted to the hospital of the Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology named after N.N. Aleksandrov (PCOMR named after N. N. Aleksandrov) in the period 2021–2022, in whom AC (117) and SCLC (105) stages I-IIIB (according to the TNM classification) were first diagnosed. The average age was $58,5 \pm 19,6$ years. Pooled regression equations were created that included absolute values of individual biomarkers for patients with AC and SCLC. Based on the created combined equations, nomograms were constructed to assess the probability of tumor recurrence after treatment.

Keywords: adenocarcinoma, squamous cell lung cancer, relapse, treatment effectiveness, biomarker.

Поступила 05.06.2024

УДК 616–006.6:615.838.2

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ ЛОКАЛЬНОЙ МАГНИТНОЙ ГИПЕРТЕРМИИ У ЖИВОТНЫХ С ДВУМЯ ОПУХОЛЕВЫМИ УЗЛАМИ

¹Терпинская Т. И., ²Кашевский С. Б.

¹Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларусь», г. Минск, Республика Беларусь;

²Государственное научное учреждение «Институт тепло-и массообмена им. А. В. Лыкова Национальной академии наук Беларусь», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. В эксперименте на мышах с двумя опухолевыми узлами локальная гипертермия одного из узлов приводила к торможению опухолевого роста, прежде всего за счет прогретого узла; полный регресс обоих узлов наблюдался в 13 % случаев. Внутрибрюшинное введение циклофосфана за неделю до локальной гипертермии или интрапатоморальное введение кетонала непосредственно перед процедурой гипертермии, а в еще большей степени – применение обоих этих лекарственных препаратов усиливало эффект гипертермии, способствуя уменьшению объема не только прогретого, но также непрогретого узла, и вызывая полный регресс опухоли у 33, 40 и 71 % животных соответственно.

Ключевые слова: рак, локальная гипертермия, магнитные наночастицы, опухоль.

Введение. окальная гипертермия в онкологии – это нагревание опухолевой ткани до температур выше физиологических с целью нарушения ее структуры, индукции гибели и подавления пролиферации опухолевых клеток, усиления противоопухолевых иммунных реакций. Терапевтический эффект гипертермии зависит от температуры и продолжительности нагревания. Используют режимы от мягкого или умеренного (42–47 °C) до более высокотемпературного кратковременного нагрева (50–80 °C), который также называют термальной абляцией.

Локальная гипертермия способствует повреждению опухолевой ткани и усилинию чувствительности опухолевых клеток к химиотерапии и облучению. Поэтому гипертермия чаще всего применяется в комбинации с другими методами терапии, что улучшает общий эффект лечения [1].

Одной из характерных черт злокачественной опухоли является метастазирование и развитие нескольких опухолевых узлов. Эффективность терапии таких больных посредством применения различных методик термоабляции является предметом экспериментальных и клинических исследований [2].

Цель работы – экспериментальное изучение противоопухолевого эффекта локальной гипертермии, комбинированной с медикаментозным воздействием, у животных с двумя опухолевыми узлами.

Материалы и методы. Мыши линии Af весом 23–25 г разведения вивария государственного научного учреждения «Институт физиологии Национальной академии наук Беларусь».

Опухоль. Асцитная карцинома Эрлиха (КЭ).

Препараты. Циклофосфан (ЦФ), РУП «Белмедпрепараты», Беларусь; кетонал, раствор для инъекций (активное вещество – кетопрофен), Lek Pharmaceuticals, Словения; золетил, Vibrac S.A., Франция.

Проведение эксперимента. Мышам прививали по 20 млн клеток АКЭ под кожу спины справа и слева. В опыт отбирали животных, у которых через 14–22 суток после прививки развились оба опухолевых узла. Группе животных вводили ЦФ внутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг. Через 7 суток после этого проводили у мышей, получивших и не получивших ЦФ, нагревание одного из опухолевых узлов методом локальной ферромагнитной гипертермии (ЛФГ). В каждой группе части животных интратуморально вводили кетонал в дозе 40 мг/кг веса тела непосредственно перед процедурой гипертермии. Также группы животных получали ЦФ, кетонал, магнитные наночастицы, комбинированную обработку указанными факторами без проведения

процедуры гипертермии. В контрольных сериях мыши-опухоленосители получали инъекции растворителя (дистиллированной воды внутрибрюшинно или изотонического раствора интратуморально) без действующего лекарственного вещества. Регистрировали общее состояние, продолжительность жизни животных и объем опухоли, рассчитывая объем каждого из опухолевых узлов по формуле:

$$V = (a \cdot b \cdot c \cdot \pi)/6,$$

где а, б, с – три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли, V – объем опухоли.

Локальная гипертермия. Для локального нагревания опухоли применяли процедуру ферромагнитной гипертермии (ЛФГ), основанную на разогреве введенных в опухоль ферромагнитных наночастиц в переменном магнитном поле. Суспензию магнитных наночастиц оксида железа (350 мг/мл), синтезированных согласно [3], вводили интратуморально шприцем для обеспечения содержания частиц в опухоли от 70 до 200 мг/см³ в зависимости от ее объема. Наркотизированное животное (золетил в дозе 30 мг/кг) помещали в магнитное поле с частотой 3,7 кГц и амплитудой до 60 кА/м.

Температура под нижним полюсом опухоли автоматически (по показаниям термопары) выводилась на уровень 44 ± 0,15 °C и поддерживалась на этом уровне 20 минут. Температура в центре опухоли поднималась до 48–50 °C. Лабораторных животных в процессе гипертермии непрерывно обдували воздухом при комнатной температуре для исключения общего нагрева.

Статистическая обработка. Полученный цифровой материал обрабатывали с помощью пакетов программ Excel и Statistica 7. На рисунках представлены медианы изучаемых показателей, Me (25–75 процентили). При характеристике групп животных без процедуры ЛФГ показаны медианные объемы правого и левого узлов, при этом узел слева представлен условно как контроль к прогретым опухолевым узлам, а узел справа – как контроль к непрогретым узлам.

Достоверность разницы между сериями по объему опухоли рассчитывали согласно методу ANOVA, по продолжительности жизни – согласно критерию Манна-Уитни, по выживаемости – согласно критерию Кокса. Разницу считали достоверной при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Наблюдение за животными показало, что все мыши-опухоленосители, которым вводили наночастицы, ЦФ и/или кетонал, но не подвергали локальной гипертермии, погибли вследствие роста опухоли. Медиана продолжительности жизни

опухоленосителей, не подвергшихся воздействию каких-либо препаратов, составила 63,5 (58,5 \div 66,0) суток после прививки опухоли. Введение животным – носителям КЭ кетонала, наночастиц, или обоих этих факторов не привело к изменению продолжительности жизни опухоленосителей – медиана этого показателя составила от 59 до 63,5 суток. Инъекция ЦФ в дозе 100 мг/кг, а также обработка этим препаратом мышей и интракардиальное введение наночастиц и/или кетонала способствовали подавлению опухолевого роста (рисунок 1), уменьшению объема опухоли (до 49 % общего объема двух узлов) и увеличению продолжительности жизни опухоленосителей на 13–15 %, до медианных значений – 71,5–73 суток ($p<0,05$ при сравнении с контролем), таблица 1. ЛФГ одного из узлов оказала противоопухолевый эффект, способствуя снижению объема прогретого узла – с 8 суток после ЛФГ наблюдалось уменьшение медианного объема прогретых узлов на 10–92 % по сравнению с контролем (при сравнительном анализе и на рисунках представлена динамика опухолевого

объема до 36 суток после ЛФГ, когда в контроле оставалось в живых более 50 % животных). Объем непрогретых узлов также был снижен по сравнению с контрольной серией, снижение составляло до 36 %. Медиана объема непрогретых узлов несколько уменьшалась с 11 по 15-е сутки, а затем вновь стала увеличиваться, хотя наблюдалась тенденция к более низким значениям этого показателя по сравнению с контрольной серией, рисунок 1. Совокупный объем двух опухолевых узлов через 11–36 суток после ЛФГ был на 47–68 % ниже, чем в контроле. Также зарегистрировано некоторое увеличение продолжительности жизни опухоленосителей. К 230-м суткам после прививки опухоли выжило 1 животное из 8 (наблюдался полный регресс обоих узлов) (таблица 1, рисунок 2).

Отметим, что у животного с полным регрессом опухоли объем прогретого узла в момент гипертермии в 10 раз превышал объем непрогретого, в то время как у остальных животных серии соотношение объемов прогретого и непрогретого узлов колебалось от 0,68 до 1,14.

Таблица 1 – Влияние комбинированного применения ЦФ, кетонала и ЛФГ на рост опухоли у мышей – носителей двух узлов карциномы Эрлиха

№ п/п	Серия	n	Животные с полным регрессом опухоли, оставшиеся в живых через 230 суток после прививки, %	Продолжительность жизни животных, погибших от опухоли, Me (25 \div 75), % от контроля
1.	ЦФ 100 мг/кг + кетонал 40 мг/кг + ЛФГ 44 °C 20 мин	7	71,4 \pm 17,1*, **	155,0 (130,8 \div 180,3), 244,9 %***
2.	ЦФ 100 мг/кг + ЛФГ 44 °C 20 мин	6	33,3 \pm 19,2	78,0 (74,5 \div 82,5), 122,8 %***
3.	Кетонал 40 мг/кг + ЛФГ 44 °C 20 мин	10	40,0 \pm 15,5*	71,5 (59,0 \div 75,0), 112,6 %
4.	ЛФГ 44 °C 20 мин	8	12,5 \pm 11,7	69,0 (68,5 \div 71,0), 108,7 %***
5.	ЦФ 100 мг/кг + кетонал 40 мг/кг + ферромагнитные наночастицы	10	0,0 \pm 7,7	71,5 (66,5 \div 76,0), 112,6 %***
6.	ЦФ 100 мг/кг + ферромагнитные наночастицы	10	0,0 \pm 7,7	72,0 (70,5 \div 73,0), 113,4 %***
7.	Кетонал 40 мг/кг + ферромагнитные наночастицы	10	0,0 \pm 7,7	63,5 (58,5 \div 66,8), 100,0 %
8.	Ферромагнитные наночастицы	10	0,0 \pm 7,7	59,0 (56,3 \div 60,0), 92,9 %
9.	ЦФ 100 мг/кг + кетонал 40 мг/кг	10	0,0 \pm 7,7	73,0 (70,8 \div 74,5), 115,0 %***
10.	ЦФ 100 мг/кг	10	0,0 \pm 7,7	72,0 (71,3 \div 75,0), 113,4 %***
11.	Кетонал 40 мг/кг	10	0,0 \pm 7,7	63,0 (56,0 \div 63,8), 99,2 %
12.	Контроль	10	0,0 \pm 7,7	63,5 (58,5 \div 66,0)

Примечания: * $p<0,05$ по частоте полных регрессов опухоли при сравнении с серией 12. ** $p<0,05$ по частоте полных регрессов опухоли при сравнении с серией 4. *** $p<0,05$ по продолжительности жизни при сравнении с серией 12 (критерий Манна–Уитни).

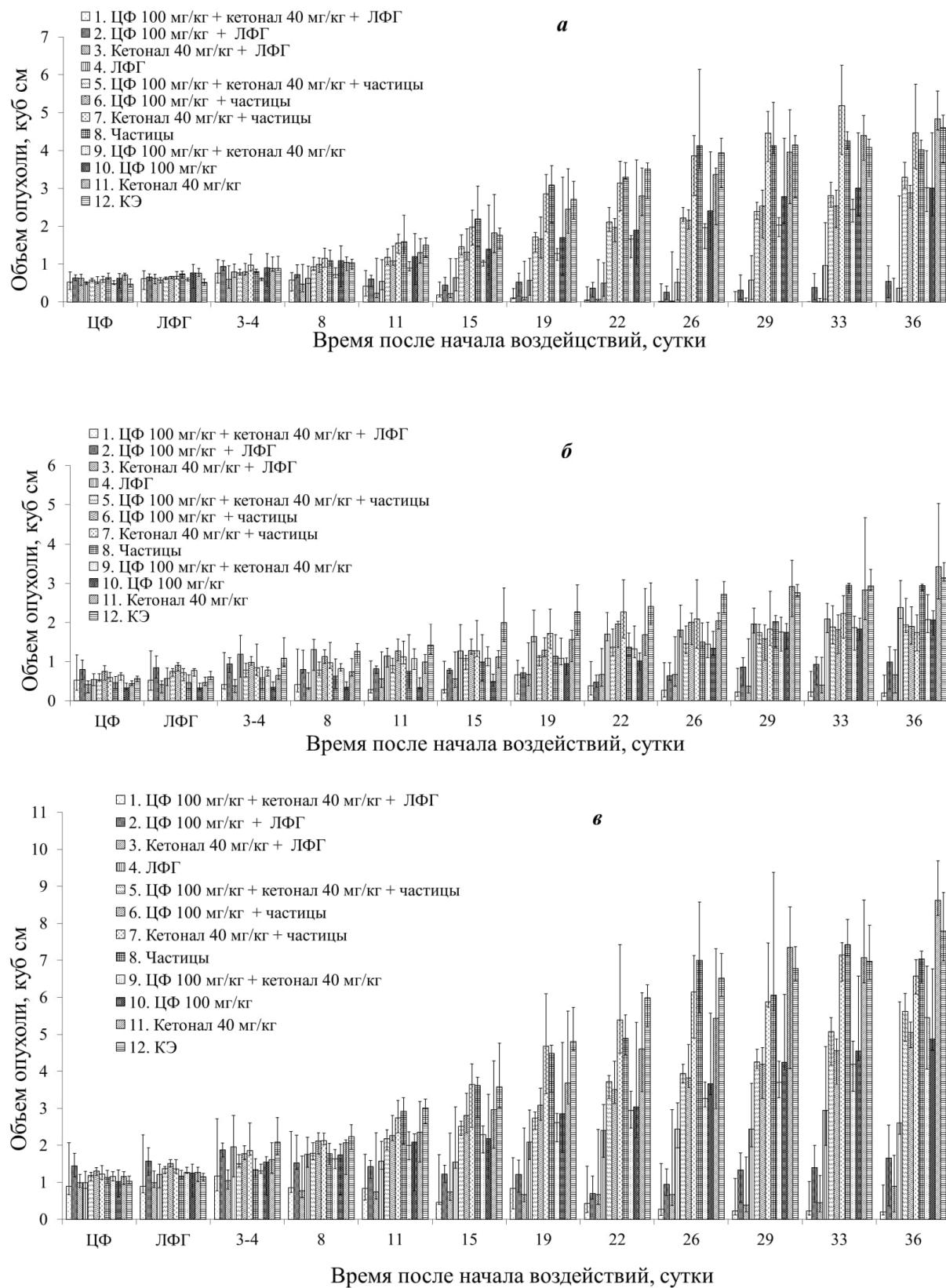


Рисунок 1 – Влияние циклофосфана (ЦФ), кетонала и локальной ферромагнитной гипертермии (ЛФГ) на объем опухоли у мышей – носителей двух узлов карциномы Эрлиха, Me (25–75):
а – объем прогретого узла, р (1–6, 9–12)<0,05;
б – объем непрогретого узла, р (1–7, 9–12)<0,05;
в – совокупный объем двух узлов, р (1–6, 9–12 <0,05 (всезда согласно ANOVA))

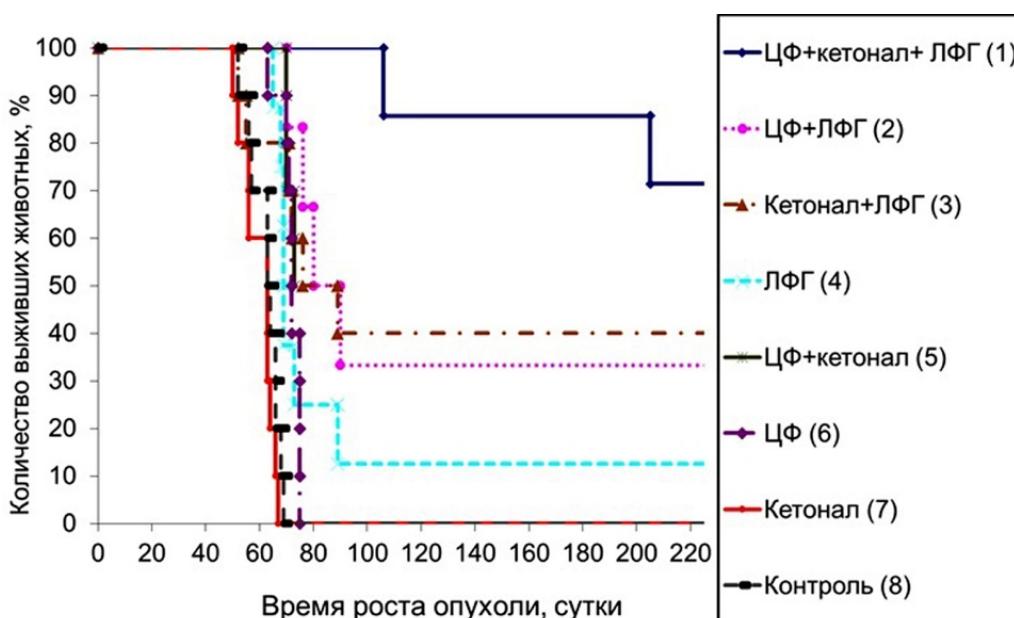


Рисунок 2 – Влияние циклофосфана (ЦФ, 100 мг/кг, в/б), кетонала (40 мг/кг, и/т) и локальной гипертермии (ЛФГ) на выживаемость мышей – носителей двух узлов карциномы Эрлиха; р (1–8)<0,05; р (1–4)<0,05; р (1–4)<0,05 (критерий Кокса)

Инъекция ЦФ за 7 суток до процедуры ЛФГ усиливала ее противоопухолевое действие. Медиана объема прогретого узла через 11–36 суток после ЛФГ была на 30–94 % меньше, чем медиана левого узла в контрольной серии, а медиана непрогретого узла – на 37–80 % меньше, чем медиана правого узла в контроле. Совокупный объем двух опухолевых узлов через 11–36 суток после ЛФГ был на 32–88 % ниже, чем в контроле, рисунок 1. Обработка мышей-опухоленосителей ЦФ в комбинации с ЛФГ способствовала полному регрессу опухоли у 33 % животных и увеличению продолжительности жизни остальных на 22,8 % (таблица 1, рисунок 2).

Интратуморальное введение кетонала непосредственно перед процедурой ЛФГ также способствовало усилиению противоопухолевого эффекта. К 36-м суткам после процедуры ЛФГ у 50 % животных этой серии (5 из 10) прогретый опухолевый узел полностью регрессировал, причем 96 %-ное снижение медианного объема наблюдали уже на 19-е сутки после гипертермии. Объем непрогретого узла также был снижен, его медиана составляла 61–87 % по отношению к контролю на 11–36 сутки после ЛФГ. Совокупный опухолевый объем снижался на 75–94 %, рисунок 1. Наблюдался полный регресс опухоли у 40 % животных и тенденция к увеличению продолжительности жизни для остальных мышей (на 12,6 %) (таблица 1, рисунок 2).

Комбинированное применение ЦФ, кетонала и ЛФГ оказалось наиболее выраженный противоопухолевый эффект в отношении карциномы Эрлиха. У всех животных, прошедших такую комбинированную обработку, наблюдался регресс как прогретого, так и непрогретого узла опухоли. У 6 из 7 животных (86 %) к 36-м суткам после ЛФГ прогретый узел не пальпировался, наблюдалось также выраженное снижение объема непрогретого узла (на 80–94 % по сравнению с контролем). Снижение медианы совокупного опухолевого объема составляло 72–98 % по отношению к контролю без воздействия. У 2 животных из 7 рост опухоли впоследствии возобновился, что привело к гибели, хотя продолжительность жизни значительно увеличилась (на 144,9 %); 71 % животных выжили при сроке наблюдения 230 суток без признаков рецидива опухоли.

Полученные результаты свидетельствуют, что гипертермическая обработка одного из опухолевых узлов может способствовать торможению его роста или даже регрессии, однако за счет роста второго, непрогретого узла, общий объем опухоли постепенно увеличивается и в подавляющем большинстве случаев ведет к гибели носителя. В целом, однако, наблюдается некоторое увеличение продолжительности жизни и выживаемости животных, прошедших ЛФГ. Противоопухолевый эффект гипертермии может обуславливаться как прямым цитотоксическим

действием высоких температур, вызывающих не-медленную и отсроченную гибель клеток [4] и подавление их пролиферации, так и опосредован-ным действием на иммунитет через индукцию иммуногенной клеточной смерти. При этом гиб-нущие опухолевые клетки высвобождают моле-кулярные фрагменты, ассоциированные с повре-ждениями (DAMPs – danger signals–damage–associated molecular patterns), белок HMGB 1 (high-mobility group protein B1), экспонируют на мемbrane молекулы, способствующие активации антиген-презентирующих клеток (например, каль-ретикулин, HLA), что в совокупности ведет к уси-лению противоопухолевых иммунных реакций.

Внутрибрюшинное введение циклофос-фана за неделю до ЛФГ или интрапутоморальное введение кетонала непосредственно перед ЛФГ способствуют усилинию эффекта гипертермии – торможению опухолевого роста, регрессу не только прогретого, но также непрогретого узла, и полному регрессу опухоли у 33 и 40 % животных соответственно. Показано, что химиопрепараты (в том числе ЦФ), как и гипертермия, могут оказывать двойкий эффект, вызывая не только гибель опухолевых клеток, но также вызывая имму-ногенную клеточную смерть и способствуя уси-лению противоопухолевого иммунитета [5]. В отно-шении ЦФ установлено, что в низких дозах этот химиопрепарат подавляет активность регуляторных Т-лимфоцитов, обладающих проопухо-левыми свойствами, способствует выработке ин-терферона I типа и стимулирует созревание денд-ритных клеток. Наряду с гибелю опухолевых клеток и последующим высвобождением анти-гена это может иметь решающее значение для стимулирования активности натуральных киллеров, а также развития противоопухолевых Т-клет-очных ответов. Выраженность противоопухолево-го иммунитета после применения ЦФ изменя-ется со временем. В эксперименте на мышах по-казано, что через сутки после инъекции 100 мг/кг ЦФ противоопухолевая резистентность снижа-ется, а через 3–21 сутки – усиливается и

становится даже более выраженной, чем в кон-троле [6]. Исходя из этого, мы вводили мышам ЦФ за 7 суток до гипертермии.

Можно предполагать, что ЦФ усиливал эф-фект гипертермии не только благодаря его дей-ствию на опухолевые клетки, но и через усиление иммунитета.

Кетопрофен – это нестериодный противо-воспалительный препарат, который, как показано в экспериментах *in vitro*, усиливает цитотоксиче-ское действие высоких температур на опухоле-вые клетки [7]. Нестериодные противовоспали-тельные средства также могут препятствовать формированию опухолеассоциированного воспа-ления, которое способствует опухолевому росту и подавлению противоопухолевых иммунных ре-акций. В нашем исследовании комбинированное применение ЦФ, кетонала и ЛФГ показало наибо-лее выраженное усиление противоопухолевого эф-фекта, способствуя торможению роста или полной регрессии как прогретого, так и непрогрето-го опухолевых узлов и выживанию 71 % нося-телей КЭ.

Заключение. В эксперименте на мышах локальная магнитная гипертермия в режиме 44 °C 20 мин одного из двух отдаленно расположенных опухолевых узлов вызывала торможение роста опухоли, главным образом за счет прогре-того узла; полный регресс обоих узлов наблю-дался в 13 % случаев. Внутрибрюшинное введе-ние циклофосфана за неделю до локальной гипер-термии или интрапутоморальное введение кетонала непосредственно перед локальной гипертермией, а в еще большей степени – применение обоих этих препаратов усиливало эффект локальной ги-пертермии, способствуя уменьшению объема не только прогретого, но также непрогретого узла, и вызывая полный регресс опухоли у 33, 40 и 71 % животных соответственно. Таким образом, наиболее выраженный противоопухолевый эф-фект обеспечивало комбинированное примене-ние локальной гипертермии с циклофосфаном и кетоналом.

Список цитированных источников

1. Outcomes for Hyperthermia Combined with Concurrent Radiochemotherapy for Patients with Cervi-
cal Cancer / Y. Wang [et al.] // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 2020. – Vol. 107, N 3. – P. 499–511.
2. Tomaszian, A. Percutaneous minimally invasive thermal ablation for management of osseous metas-tases: recent advances / A. Tomaszian, J. W. Jennings // Int. J. Hyperthermia. – 2019. – Vol. 36, N 2. – P. 3–12.
3. Influence of Co amount on the efficiency of energy absorption of Fe–Co ferrite nanoparticles / K. A. Kekalo [et al.] // JMMM. – 2009. – Vol. 321. – P. 1514–1516.

4. Терпинская, Т. И. Динамика гибели клеток асцитной карциномы Эрлиха в процессе гипертермического воздействия *in vitro* / Т. И. Терпинская, Б. Э. Кашевский, В. А. Кульчицкий // Новости медико-биологических наук. – 2008. – № 1–2. – С. 83–87.
5. Galluzzi, L. Immunogenic cell death in cancer and infections disease // Nat Rev Immunol. – 2017. – Vol. 17, N 2. – P. 97–111.
6. Терпинская, Т. И. Динамика противоопухолевой резистентности после воздействия циклофосфана / Т. И. Терпинская // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – № 11. – С. 545–547.
7. Терпинская, Т. И. Цитотоксический эффект кетопрофена при физиологической и повышенной температуре *in vitro* / Т. И. Терпинская // Актуальные проблемы медицины. Сборник научных статей республиканской научно-практической конференции и 26-й итоговой научной сессии Гомельского государственного медицинского университета (Гомель, 3–4 ноября 2016 г.), Гомель. – ГомГМУ. – 2017. – С. 781–784.

Anti-tumor effect of local magnetic hyperthermia in animals with two tumor nodes

¹Terpinskaya T. I., ²Kashevsky S. B.

¹Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus;

²A.V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

In an experiment on mice with two tumor nodes, local hyperthermia of one of the nodes led to inhibition of tumor growth, primarily due to the heated node; complete regression of both nodes was observed in 13 % of cases. Intraperitoneal administration of cyclophosphamide a week before hyperthermia or intratumoral administration of ketonal immediately before hyperthermia, and to an even greater extent, the use of both of these drugs enhanced the effect, helping to reduce the volume of not only the heated, but also the unheated node, and causing complete regression of the tumor in 33, 40 and 71 % of animals, respectively.

Keywords: cancer, local hyperthermia, magnetic nanoparticles.

Поступила 05.06.2024



Содержание

ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

ОЦЕНКА РИСКА РАЗВИТИЯ НЕСТОХАСТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРИ ПРОЖИВАНИИ НА ЗАГРЯЗНЕННЫХ РАДИОНУКЛИДАМИ ТЕРРИТОРИЯХ
Аветисов А. Р., Стожаров А. Н., Сосновский А. В. 12

ДИНАМИКА СМЕРТНОСТИ В 5-ЛЕТНИХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ В 1990–2019 ГГ.

Агиевец О. В., Романова А. П. 17

МЕДИЦИНСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА НЕИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ДЕТЕЙ НА ОСНОВЕ ОПТИМИЗАЦИИ ИХ СУТОЧНОЙ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Борисова Т. С., Самохина Н. В., Кушнерук А. В. 25

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ HBSAG СРЕДИ ДЕТЕЙ 2009–2015 ГОДОВ РОЖДЕНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Высоцкая В. С.¹, Коломиец Н. Д.², Гасич Е. Л.³, Глинская И. Н.¹, Романова О. Н.⁴,
Дашкевич А. М.¹, Карабан И. А.⁵, Гапеенко Е. В.⁶ 32

СЕРОПРЕВАЛЕНТНОСТЬ НАСЕЛЕНИЯ МИНСКОЙ ОБЛАСТИ К ВИРУСУ SARS-CoV-2 В 2021 ГОДУ

Дашкевич А. М.¹, Коломиец Н. Д.², Глинская И. Н.¹, Самойлович Е. О.³, Колодкина В. Л.³,
Ермолович М. А.³, Дронина А. М.³, Карабан И. А.⁴, Тарасенко А. А.⁵, Загорская Т. О.⁵ 38

ОЦЕНКА ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ФУНГИЦИДАНА ОСНОВЕ МЕТАМИТРОНА В БАТАРЕЕ ТЕСТОВ

Дудчик Н. В., Дроздова Е. В., Емельянова О. А., Фираго А. В., Суровец Т. З. 46

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ АЛЛЕРГЕННОЙ ОПАСНОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ КЛИНДАМИЦИНА ГИДРОХЛОРИД В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА БЕЛЫХ МЫШАХ

Земцова В. О.¹, Богданов Р. В.¹, Шевляков В. В.¹, Филонюк В. А.^{1,2}, Чернышова Е. В.¹,
Баранов С. А.¹ 52

МЕДИЦИНСКИЕ ФАКТОРЫ И ИХ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ

Калинина Т. В.¹, Костеневич М. М.¹, Мосько П. Л.² 58

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОРЕВОЙ ИНФЕКЦИИ У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ

Коломиец Н. Д.¹, Романова О. Н.¹, Ханенко О. Н.¹, Тонко О. В.¹, Высоцкая В. С.², Дашкевич А. М.²,
Соколова М. В.³, Самойлович Е. О.⁴, Байко А. Д.¹, Хватюк А. Ю.¹, Домарад В. Р.¹ 66

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЕЙ НОРМАЛИЗОВАННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ПАРАФИНИЗИРОВАННЫХ ОБРАЗЦАХ ТКАНЕЙ ПЛАЦЕНТЫ Полуян О. С., Костюк С. А.....	71
ПНЕВМОКОККОВАЯ ИНФЕКЦИЯ У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ (ПЕРИОД НАБЛЮДЕНИЯ 2016–2023 ГОДЫ) Соколова М. В. ¹ , Ханенко О. Н. ² , Коломиец Н. Д. ² , Тонко О. В. ² , Романова О. Н. ² , Мартыненко У. С. ² , Долгина Ю. Н. ² , Русикович С. С. ²	80
БАЗОВАЯ СЕРДЕЧНО-ЛЕГОЧНАЯ РЕАНИМАЦИЯ: БАРЬЕРЫ ПРАКТИЧЕСКОЙ РЕАЛИЗАЦИИ НА МЕСТЕ ПРОИСШЕСТВИЯ И ИХ ПРЕДИКТОРЫ Станишевский А. Л. ¹ , Соколов Ю. А. ¹ , Новикова Н. П. ¹ , Тимошук А. Л. ²	86
ГТОВНОСТЬ НАСЕЛЕНИЯ МЕГАПОЛИСА К ПРОВЕДЕНИЮ СЕРДЕЧНО-ЛЕГОЧНОЙ РЕАНИМАЦИИ Станишевский А. Л. ¹ , Соколов Ю. А. ¹ , Новикова Н. П. ¹ , Тимошук А. Л. ²	91
ЛИСТЕРИОЗ И ИЗОЛЯТЫ L. MONOSYTOGENES, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА Тонко О. В. ¹ , Коломиец Н. Д. ¹ , Ханенко О. Н. ¹ , Романова О. Н. ^{1,2} , Левшина Н. Н. ² , Ромашко Ю. В. ² , Клюйко Н. Л. ³ , Смаль А. П. ³ , Суховерхая В. В. ⁴	97
ОЦЕНКА АЛИМЕНТАРНЫХ РИСКОВ ЗДОРОВЬЮ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОТДЕЛЬНЫМИ ПОЛИБРОМИРОВАННЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ Федоренко Е. В.	105
ФАРМАЦИЯ	
ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФОРМ ФУЛЛЕРЕНОВ Ермоленко Е. М., Ринейская О. Н., Улосевич Д. С.	116
АНТИАГРЕГАНТЫ НА ОСНОВЕ ФТОРФЕНИЛЗАМЕЩЕННЫХ 2-ИЗОКСАЗОЛИН-5-КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ Ковганко Н. Н., Пархач М. Е., Борисевич С. Н., Глинник С. В., Принькова Т. Ю.	121
ВЛИЯНИЕ ДИПЕПТИДОВ PRO-GLY, PRO-LEU НА ДИНАМИКУ ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ И ЛОКОМОТОРНОЙ АКТИВНОСТИ В УСЛОВИЯХ ГРУППОВОЙ АКТОМЕТРИИ И МОДИФИКАЦИЯ ИХ ЭФФЕКТОВ ДИЗОЦИЛПИНОМ Кравченко Е. В. ¹ , Ольгомец Л. М. ¹ , Саванец О. Н. ¹ , Бизунок Н. А. ² , Дубовик Б. В. ²	125



ИССЛЕДОВАНИЕ IN SILICO ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ В КАЧЕСТВЕ БЛОКАТОРОВ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ Краецкая О. Ф.	134
РАЗРАБОТКА СКРИПТА МНОЖЕСТВЕННОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА И ЕГО ВАЛИДАЦИЯ ПРИ СРАВНЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ IN SILICO ДЛЯ ГЛЮКОКИНАЗЫ Лахвич Ф. Ф., Прокопеня Я. О.	138
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТОПОЛОГИИ СВЯЗЫВАНИЯ РИВАРОКСАБАНА И КОМПЛЕКСА ИЗОНИКОТИНОИЛ-NADH С МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ NADH-ЗАВИСИМОЙ ЕНОИЛ-(ACP)-РЕДУКТАЗОЙ Лахвич Ф. Ф., Ринейская О. Н.	143
ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО МЕТОДА КОНСТРУИРОВАНИЯ ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ НА ПРИМЕРЕ ИЗОФОРМЫ P00749-2 УРОКИНАЗЫ Ринейская О. Н., Байроченко Д. С.	148
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭТАНОЛА В КОМБИНИРОВАННОМ СПРЕЕ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ Сушинская О. А. ¹ , Феськова Е. В. ² , Голяк Н. С. ¹	155
ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА – МЕДИЦИНА	
ДЕФОРМИРУЕМОСТЬ И ОКСИГЕНАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПО- И ГИПЕРОКСИИ Акулич Н. В. ^{1,2} , Зинчук В. В. ²	164
ОБРАЗОВАНИЕ НЕТ-ЛОВУШЕК И АКТИВНОСТЬ СЕКРЕТОРНЫХ ФЕРМЕНТОВ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ Белевич Е. И. ¹ , Готько О. В. ¹ , Прохорова В. И. ¹ , Таганович А. Д. ² , Ковганко Н. Н. ² , Колб А. В. ² , Хотько Е. А. ²	169
О ЗНАЧИМОСТИ АКТИВНОСТИ β-АДРЕНОРЕАКТИВНЫХ СИСТЕМ ГИПОТАЛАМИЧЕСКОЙ ОБЛАСТИ МОЗГА В РЕГУЛЯЦИИ СОДЕРЖАНИЯ ЛИПИДОВ КРОВИ ПРИ ГИПЕРТЕРМИИ Висмонт Ф. И., Жадан С. А., Абакумова Т. В., Яковлев Ф. Д., Шуляк Е. В., Шестель И. В.	173
ВЛИЯНИЕ СТЕНТИРОВАНИЯ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ НА БИОМАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ Владимирская Т. Э., Адзерихо И. Э., Жилкевич А. В., Рачок С. М., Семенкова Г. Н., Устемчук А. М.	177

АПОПТОЗ СОСУДИСТЫХ КЛЕТОК ПРИ НЕОАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЯХ В СТЕНТИРОВАННЫХ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЯХ Владимирская Т. Э., Адзерихо И. Э., Жилкевич А. В., Рачок С. М., Семенкова Г. Н.	180
РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫПОЛНЕНИЯ ПОДПРОГРАММЫ «ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ» ГОСУДАРСТВЕННОЙ ПРОГРАММЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ «ТРАНСЛЯЦИОННАЯ МЕДИЦИНА» (2021–2023 гг.)	
Гайн Ю. М., Станкевич С. И., Манаева Н. А., Станкевич В. В.	184
ВИЗУАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ЧИСЛЕННОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ГЕМОДИНАМИКИ ОТРЕЗКА СОСУДА	
Гольцев М. В., Мансуров В. А., Рагунович Л. Д.	193
ПОСТРОЕНИЕ ВИРТУАЛЬНЫХ ТРЕХМЕРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЧИСЛЕННОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ГЕМОДИНАМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ	
Гольцев М. В., Мансуров В. А., Рагунович Л. Д.	198
АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА RS2542151 ГЕНА PTPN2 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ	
Достанко Н. Ю. ¹ , Ягур В. Е. ¹ , Синявская Е. С. ² , Гончарова Р. И. ²	203
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО И БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КРОВИ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ФИБРОЗА ЛЕГКИХ У ПАЦИЕНТОВ С ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫМИ ЛЕГОЧНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ	
Лукашевич А. А. ¹ , Юдина О. А. ^{1,2} , Давидовская Е. И. ³ , Пермякова А. О. ¹ , Сакович М. В. ¹ , Руденков Д. С. ¹ , Дядичкина О. В. ¹ , Кадушкин А. Г. ¹	209
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ «МОНОАЗИДОМ ПРОПИДИЯ – ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ STAPHYLOCOCCUS AUREUS ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПЕРИПРОТЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ СУСТАВОВ	
Лямцева А. К., Костюк С. А., Полуян О. С.	216
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ – ЛАБОРАТОРНО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПЛОЩАДКА ДЛЯ РЕШЕНИЯ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ	
Манаева Н. А.	222
РОЛЬ БЕЛКОВ РИБОНУКЛЕАЗ В ИММУННОМ ОТВЕТЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ РЕСПИРАТОРНОМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМЕ	
Матлакова М. А., Павлов К. И., Канашкова Т. А., Черношей Д. А., Метелица Т. Г., Чегодаева Е. В., Макаревич Ж. А., Лагода О. Ю., Красовская В. С.	227



ПРОДУКЦИЯ ГРАНЗИМА В ЛИМФОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ В КО-КУЛЬТУРЕ С КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИЕЙ K562	
Назаренко Е. М. ^{1,2} , Нижегородова Д. Б ^{2,1} , Морозова Н.А. ³ , Иванчик Г. И. ² , Колядич Ж.В. ³ , Зафранская М. М. ^{1,2}	233
СТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ РЕОРГАНИЗАЦИИ МИОКАРДА НА РАННИХ ЭТАПАХ ИЗОПРОТЕРЕНОЛ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ИШЕМИИ СЕРДЦА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ	
Новаковская С. А., Федорова Е. В., Мунтянова М. В., Басалай А. А.	238
ВЛИЯНИЕ РОЗУВАСТАТИНА НА РАЗВИТИЕ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПERTЕНЗИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ	
Семенкова Г. Н. ¹ , Адзерихо И. Э. ¹ , Владимирская Т. Э. ¹ , Амаэгбери Н. В. ² , Жилкевич А. В. ¹ , Устемчук А. М. ¹	245
МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕЦИДИВА ПОСЛЕ ПРОВЕДЕННОГО ЛЕЧЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ АДЕНОКАРЦИНОМОЙ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО	
Таганович А. Д. ¹ , Ковганко Н. Н. ¹ , Рутковская Ж. А. ¹ , Колб А. В. ¹ , Хотько Е. А. ¹ , Готько О. В. ² , Прохорова В. И. ²	251
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ ЛОКАЛЬНОЙ МАГНИТНОЙ ГИПЕРТЕРМИИ У ЖИВОТНЫХ С ДВУМЯ ОПУХОЛЕВЫМИ УЗЛАМИ	
Терпинская Т. И. ¹ , Кашевский С. Б. ²	257

Научное издание

БГМУ
в авангарде медицинской
науки и практики

Рецензируемый ежегодный сборник научных трудов

Выпуск 14

Том 2

Редакторы: *А. В. Царь, Н. С. Кудрявцева, Н. В. Оношко* (тексты на русском языке),
канд. хим. наук, доц. *Ф. Ф. Лахович* (тексты на английском языке)

Компьютерная верстка *М. Е. Лягушевич, О. С. Коротков,*
В. С. Прохорик

Дизайн обложки *К. И. Гончарик*

Подписано в печать 16.12.2024. Формат 60×84/8.

Бумага офсетная. Печать цифровая.

Усл. печ. л. 40,46. Уч.-изд. л. 28,92. Тираж 40 экз. Заказ 401.

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.

