

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

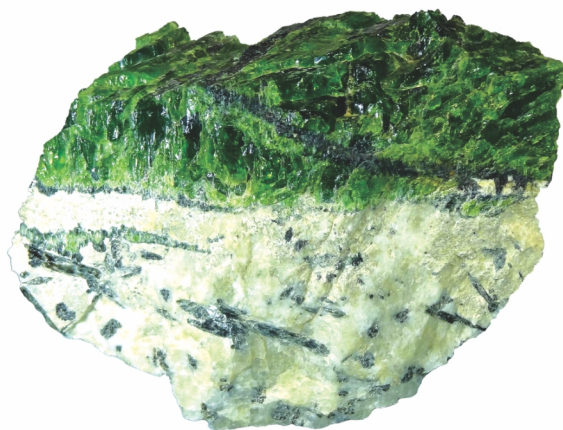
2023, том 12, № 4

Восточная
Европа

Laboratory Diagnostics. Eastern Europe

International Scientific Journal

2023 Volume 12 Number 4



Диопсид (малаколит, алалит) – силикат из группы пироксенов. Имеет множество неповторимых расцветок, что объясняется наличием примесей железа, марганца, ванадия и хрома.

По этой причине минерал широко распространен в ювелирном деле.

Впервые был обнаружен в долине реки Ала в одноименном итальянском городе, от которой и получил свое третье название.

ISSN 2226-5392 (Print)
ISSN 2522-137X (Online)



ПРОФЕССИОНАЛЬНЫЕ
ИЗДАНИЯ

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Восточная
Европа

lab.recipe.by
recipe-russia.ru

2023, том 12, № 4

Основан в 2011 г.

Беларусь

Журнал зарегистрирован

Министерством информации Республики Беларусь 2 декабря 2011 г.
Регистрационное свидетельство № 1496

Учредитель

УП «Профессиональные издания»
при участии Республиканского научного общества специалистов
клинической лабораторной диагностики Беларуси

Редакция:

Директор Л.А. Евтушенко

Заместитель главного редактора А.В. Жабинский

Руководитель службы рекламы и маркетинга М.А. Коваль

Технический редактор Д.В. Нужин

Адрес:

220049, ул. Кнорина, 17, Минск
Тел.: +375 17 322 16 77, 322 16 78
e-mail: lab@recipe.by

Россия

Журнал зарегистрирован

Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
25 августа 2023 г.
Свидетельство ПИ № ФС77-85799

Учредитель и издатель

ООО «Вилин»

Редакция:

Директор Н.А. Рабкова

Адрес:

214522, Смоленская обл., Смоленский р-н, с.п. Катынское,
п. Авторемзавод, д. 1А, пом. 413
Тел.: +7 4812 515923
e-mail: lab@recipe.by

Подписка

В каталоге РУП «Белпочта» (Беларусь):
индивидуальный индекс – 01389, ведомственный индекс – 013892

В электронных каталогах на сайтах агентств:
ООО «Прессинформ», ООО «Криэйтив Сервис Бэнд»,
ООО «Екатеринбург-ОПТ», ООО «Глобалпресс»

Электронная версия журнала доступна на сайтах lab.recipe.by,
recipe-russia.ru, в Научной электронной библиотеке elibrary.ru,
в базе данных East View, в электронной библиотечной
системе IPRbooks

По вопросам приобретения журнала обращайтесь в редакцию

Журнал выходит один раз в три месяца
Цена свободная

Подписано в печать: 13.11.2023

Дата выхода в свет: 30.11.2023

Формат 70x100^{1/16}

Печать офсетная

Тираж 1000 экз. (Беларусь), 5000 экз. (Россия)

Заказ №

Отпечатано в типографии

Производственное дочернее унитарное предприятие
«Типография Федерации профсоюзов Беларуси».

Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий
№2/18 от 26.11.2013. Пл. Свободы, 23-103, г. Минск.
ЛП №02330/54 от 12.08.2013.

© «Лабораторная диагностика. Восточная Европа»

Авторские права защищены. Любое воспроизведение материалов издания возможно только с обязательной ссылкой на источник.

© УП «Профессиональные издания», 2023

© Оформление и дизайн УП «Профессиональные издания», 2023

© ООО «Вилин», 2023

Главный редактор

Камышников Владимир Семенович,
д.м.н., проф., заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики Института повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)

Редакционная коллегия:

Алехнович Л.И., к.м.н., доц., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)

Анисько Л.А., к.м.н., Городская клиническая инфекционная больница (Минск, Беларусь)

Батуревич Л.В., к.м.н., доц., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)

Беляев С.А., Белорусское общество лабораторной медицины (Минск, Беларусь)

Вергун О.М., к.б.н., доц., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Беларусь)

Владимирская Т.Э., к.б.н., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)

Гусина Н.Б., к.м.н., доц., Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» (Минск, Беларусь)

Державец Л.А., д.б.н., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)

Долгов В.В., д.м.н., проф., Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова (Москва, Россия)

Доценко Э.А., д.м.н., проф., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Беларусь)

Дубровский А.Ч., к.м.н., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)

Коломиец Н.Д., д.м.н., проф., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)

Коневалова Н.Ю., д.б.н., проф., Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (Витебск, Беларусь)

Кочетов А.Г., д.м.н., Российский университет дружбы народов (Москва, Россия)

Кузьменко А.Т., к.м.н., доц., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)

Лелевич В.В., д.м.н., проф., Гродненский государственный медицинский университет (Гродно, Беларусь)

Ляликов С.А., д.м.н., проф., Гродненский государственный медицинский университет (Гродно, Беларусь)

Манаева Н.А., к.б.н., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)

Новикова И.А., д.м.н., проф., Гомельский государственный медицинский университет (Гомель, Беларусь)

Потапнев М.П., д.м.н., проф., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Беларусь)

Прохорова В.И., д.м.н., проф., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)

Смолякова Р.М., д.б.н., проф., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)

Таганович А.Д., д.м.н., проф., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Беларусь)

Рецензируемое издание

Журнал включен в базы данных Scopus, Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, CNKI, ПИНЦ.

Журнал входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований. Решение коллегии ВАК от 24.10.2012 (протокол № 06-18/2).

Ответственность за точность приведенных фактов, цитат, собственных имен и прочих сведений, а также за разглашение закрытой информации несут авторы.

Редакция может публиковать статьи в порядке обсуждения, не разделяя точку зрения автора.

Ответственность за содержание рекламных материалов и публикаций с пометкой «На правах рекламы» несут рекламодатели.

International Scientific Journal

LABORATORY Diagnostics

Eastern Europe

Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa

lab.recipe.by
recipe-russia.ru

2023 Volume 12 Number 4

Founded in 2011

Belarus

The journal is registered

by the Ministry of information of the Republic of Belarus
on December 2, 2011.
Registration certificate No. 1496

Founder

UE "Professional Editions" with the participation of the Republican
scientific society of experts of the clinical laboratory diagnostics
of Belarus

Editorial office:

Director L. Evtushenko

Deputy editor-in-chief A. Zhabinski

Head of advertising and marketing department M. Koval

Technical editor D. Nuzhin

Address:

220049, Knorin str., 17, Minsk
Phones: +375 17 322-16-77, 322-16-78
e-mail: lab@recipe.by

Russia

The journal is registered

by the Federal Service for Supervision of Communications,
Information Technology, and Mass Media (Roskomnadzor)
on August 25, 2023.
Certificate ПИ No. ФС77-85799

Founder and Publisher

LLC "Vilin"

Editorial office:

Director N. Rabkova

Address:

214522, Smolensk region, Smolensk district,
rural settlement Katynskoye, Avtoremzavod village, 1A, office 413
Phone: +7 4812 515923
e-mail: lab@recipe.by

Subscription

In the Republican unitary enterprise "Belposhta" (Belarus)
individual index – 01389, departmental index – 013892

In the electronic catalogs on web-sites of agencies:
LLC "Pressinform", LLC "Kriektiv Servis Bend",
LLC "Ekaterinburg-OPT", LLC "Globalpress"

The electronic version of the journal is available on lab.recipe.by,
recipe-russia.ru, on the Scientific electronic library elibrary.ru,
in the East View database, in the electronic library system IPRbooks

Concerning acquisition of the journal address to the editorial office

The frequency of the journal is 1 time in 3 months
The price is not fixed

Sent for the press: 13.11.2023

Release date: 30.11.2023

Format 70x100 1/16

Litho

Circulation is 1000 copies (Belarus), 5000 copies (Russia)

Order No.

Printed in printing house

© "Laboratory diagnostics. Eastern Europe"

Copyright is protected. Any reproduction of materials of the edition is possible only with an obligatory reference to the source.

© "Professional Editions" Unitary Enterprise, 2023

© Design and decor of "Professional Editions" Unitary Enterprise, 2023

© LLC "Vilin", 2023

Editor-in-Chief

Vladimir S. Kamyshnikov,
Dr. of Med. Sci., Prof., Head of the Clinical Laboratory Diagnostics Department of the Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Editorial Board:

Alekhnovich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Anisko L., Cand. of Med. Sci., City Clinical Infectious Diseases Hospital (Minsk, Belarus)

Baturevich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Beliaev S., Belarusian Society of Laboratory Medicine (Minsk, Belarus)

Derzhavets L., Dr. of Biol. Sci., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)

Dolgov V., Dr. of Med. Sci., Prof., Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Dotsenko E., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Dubrovsky A., Cand. of Med. Sci., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)

Gusina N., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Republican Scientific and Practical Center "Mother and Child" (Minsk, Belarus)

Kochetov A., Dr. of Med. Sci., Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) (Moscow, Russia)

Kolomiets N., Dr. of Med. Sci., Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Konevalova N., Dr. of Biol. Sci., Prof., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University (Vitebsk, Belarus)

Kuzmenko A., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Lelevich V., Dr. of Med. Sci., Prof., Grodno State Medical University (Grodno, Belarus)

Lyalikov S., Dr. of Med. Sci., Prof., Grodno State Medical University (Grodno, Belarus)

Manaeva N., Cand. of Biol. Sci., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Novikova I., Dr. of Med. Sci., Prof., Gomel State Medical University (Gomel, Belarus)

Potapnev M., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Prokhorova V., Dr. of Med. Sci., Prof., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)

Smolyakova R., Dr. of Biol. Sci., Prof., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)

Taganovich A., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Vergun O., Cand. of Biol. Sci., Assoc. Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Vladimirskaia T., Cand. of Biol. Sci., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Peer-Reviewed Edition

The journal is included in the databases Scopus, Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, CNKI, RSCI.

The journal is included into a List of scientific publications of the Republic of Belarus for the publication of the results of the dissertation research. HCC board decision of 12.10.2012 (protocol No. 06-18/2).

Responsibility for the accuracy of the given facts, quotes, own names and other data, and also for disclosure of the classified information authors bear.

Editorial staff can publish articles as discussion, without sharing the point of view of the author.

Responsibility for the content of advertising materials and publications with the mark "On the Rights of Advertising" are advertisers.

Уважаемые коллеги!

Содержание представленного вашему вниманию номера во многом ориентировано на решение ряда актуальных задач, выдвинутых практическим здравоохранением и касающихся в том числе своевременного (раннего) выявления метаболических нарушений, отражающих нарушения функций жизненно важных органов у пациентов, перенесших COVID-19. Эта направленность определила использованную авторами большинства статей основную методологию исследования, базирующуюся на реализации молекулярно-биологического, молекулярно-генетического и иммунологического анализа.

Так, благодаря сочетанному применению молекулярно-генетического и клинико-морфологического методов исследования сотрудниками РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии впервые описаны все встречающиеся у представителей населения страны случаи первичного иммунодефицита, сопровождаемого синдромом лимфопролиферации; при этом получены результаты, открывающие перспективу более эффективного лечения таких пациентов. Внесен достаточно большой вклад и в становление в стране регенеративной медицины, сводящийся к совершенствованию этапа подготовки к использованию клеточного биологического материала – мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.

Приведены результаты исследований по установлению метаболических нарушений, характерно отражающих изменения функционального состояния жизненно важных органов у пациентов, перенесших коронавирусную инфекцию. Авторами одной из статей (Камилова У.К. и соавт., Узбекистан) выявлены неблагоприятия в регуляции системы свертывания крови и функции эндотелия, что чревато опасностью развития в последующем у таких пациентов грозных осложнений.

Тактике борьбы с COVID-19 в современных условиях, характеризующихся доминированием разных вариантов вируса SARS-CoV-2, посвящена совместная статья сотрудников РНПЦ эпидемиологии и микробиологии и Городской клинической инфекционной больницы г. Минска.

В статье представителей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси и РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий отражен уникальный вклад, привнесенный ими в создание технологии оценки персонализированного ответа организма пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом на традиционно применяемую схему лечения – по учету реакции систем метаболизма клеток крови – лимфоцитов.

Поскольку углубленное изучение процесса развития опухолей разной природы осуществимо лишь при условиях моделирования онкологического заболевания в эксперименте на животных, от научно обоснованного выбора дизайна надлежащего эксперимента во многом зависят и последующие результаты использования такой модели.



Этому важному аспекту исследований и посвящена статья специалистов разного профиля – физиологов, биохимиков и онкологов, представленная Институтом физиологии НАН Беларуси.

Не может не вызвать интерес и представление в одной из статей возможности неинвазивного исследования биохимического состава тканей опухоли головного мозга с применением воксельной магнитно-резонансной спектроскопии, технология применения которой, как оказалось, позволяет выявлять многие биохимические компоненты непосредственно в самих тканях, не прибегая при этом к биопсии для их последующего биохимического исследования (Бахратдинов Б.Р. и соавт., Узбекистан).

Не оставлена без внимания и предиктивная (предсказательная) медицина: на этот раз одна из работ касается выявления факторов риска воспалительных заболеваний пародонта с использованием соответствующих молекулярно-генетических методов исследования.

Статья сотрудников Гродненского государственного университета имени Янки Купалы, Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси и Гродненского государственного медицинского университета посвящена раскрытию биохимических механизмов формирования кардиомиопатии при отравлении алкоголем в опытах на животных, а также оценке протективного эффекта использования флавоноидов.

Работниками Государственного комитета судебных экспертиз (Вергун О.И.) и Городской клинической больницы скорой медицинской помощи г. Минска (Шмигельский А.А., Григорьев И.М.) представлена статистика отравлений синтетическими наркотиками, а также описана методология их определения.

Радует участие белорусских ученых в творческом решении проблемы импортозамещения в области клинико-лабораторных исследований, в частности создание отвечающей современным требованиям тест-системы для диагностики сифилиса.

Не могут не вызвать интерес и статьи наших коллег из Ирака, посвященные как верификации опухоли редкой локализации (миофибромы полости рта), так и влиянию курения сигарет на организм женщин.

Отраженное в статьях совместное участие специалистов разного профиля в выполнении научно-практических работ еще раз иллюстрирует междисциплинарный характер специальности «клиническая лабораторная диагностика».

В преддверии наступающего 2024 года желаю всем читателям нашего журнала крепкого здоровья, счастья, дальнейших больших творческих успехов в профессиональной и научной деятельности!

Главный редактор
Владимир Семенович Камышников



**Первичные иммунодефициты /
Высокотехнологичные
лабораторные исследования**

*Жаранкова Ю.С., Михалевская Т.М.,
Алешкевич С.Н., Шаранова С.О.,
Сакович И.С., Гурьянова И.Е.,
Полякова Е.А., Шитикова М.Г.,
Жилинский В.Э., Углова Т.А.,
Белевцев М.В.*
Клинико-морфологическая
характеристика синдрома
лимфопрролиферации
у пациентов с врожденными
дефектами иммунитета
(первичными иммунодефицитами) 479

**Биомедицинские клеточные технологии
в восстановительной медицине /**

Оригинальные исследования
*Величко А.В., Музыченко Б.А., Яковлева М.А.,
Нижегородова Д.Б., Зафранская М.М.*
Антиокислительный и регенеративный
потенциал мультиспонтанных
мезенхимальных стромальных
клеток в условиях гипоксии 499

**Коронавирусная инфекция
и ее осложнения /**

Оригинальные исследования
*Камилова У.К., Юсупов Д.М.,
Закирова Г.А., Утемурадов Б.Б.*
Состояние коагуляционного
гемостаза и функции эндотелия
у реконвалесцентов COVID-19 515

**Коронавирусная инфекция
и ее осложнения /**

**Лабораторные исследования
в клинической практике**
*Бельская И.В., Амвросьева Т.В.,
Богущ З.Ф., Поклонская Н.В.,
Аниско Л.А., Рогачева Т.А.*
Гуморальный иммунитет к SARS-CoV-2
в условиях доминирования разных
вариантов вируса 523

**Заболевания системы крови /
Высокотехнологичные
лабораторные исследования**

*Тамашевский А.В., Гармаза Ю.М., Федуро Н.А.,
Пасюков В.В., Слобожанина Е.И.*
Состояние окислительно-
восстановительного баланса в лимфоцитах
периферической крови пациентов
с хроническим В-лимфоцитарным
лейкозом как критерий
персонифицированной оценки ответа
их организма на проводимую
лекарственную терапию 536

**Заболевания системы крови /
Лабораторные исследования
в клинической практике**

Шашок Л.В., Кабаева Е.Н., Цвирко Д.Г.
Дефицит F XII фактора свертывания
(фактора Хагемана) – редкая
коагулопатия или частая
лабораторная находка? 551

**Заболевания системы крови /
Обзоры и лекции**

Зуховицкая Е.В., Кабаева Е.Н., Цвирко Д.Г.
Тромботическая тромбоцитопеническая
пурпура: этиопатогенез, диагностика
и терапия (обзор) 558

**Опухолевые заболевания /
Экспериментальные исследования**

*Соболева О.Е., Тихонович О.Г., Жогаль С.М.,
Шепетько М.Н., Пашкевич С.Г.*
Оценка гематологических показателей
крови у лабораторных мышей –
опухоленосителей аденокарциномы
Эрлиха 569

**Опухолевые заболевания /
Случай из практики**

*Хамид О., Мактуф З.,
Аль-Мараш А., Аль-Тай Р.*
Миофиброма полости рта:
клинический случай 581

**Опухолевые заболевания /
Инновации в лабораторной
диагностике онкологических
заболеваний**

*Бахритдинов Б.Р., Алиев М.А.,
Мардиева Г.М.*

Дифференциальная диагностика опухолей
головного мозга различной этиологии,
основанная на установлении особенностей
их биохимического состава методом
воксельной магнитно-резонансной
спектроскопии 585

**Стоматология /
Высокотехнологичные
лабораторные исследования**

*Полуян О.С., Костюк С.А.,
Мельникова Т.Ю., Юдина Н.А.*

Полиморфизмы генов коллагена
и рецептора витамина D как
молекулярно-генетические факторы
риска формирования воспалительных
заболеваний периодонта 595

**Наркология / Экспериментальные
исследования**

*Коваленя Т.А., Кирко С.Н., Белоновская Е.Б.,
Кузьмицкая И.А., Лапшина Е.А.,
Островская О.Б., Заводник И.Б.*

Протекторный эффект флавоноида
нарингина при алкогольной
кардиомиопатии у крыс 606

**Наркология /
Высокотехнологичные
лабораторные исследования**

*Вергун О.М., Шмигельский А.А.,
Григорьев И.М.*

Отравления синтетическими
каннабиноидами: статистика,
технология идентификации 617

**Токсикология /
Лабораторные исследования
в клинической практике**

Иззер Х.Т.

Влияние курения сигарет на
гематологические параметры
и минеральный состав сыворотки
у курящих женщин в Басре (Ирак) 628

**Венерология /
Новые технологии
в лабораторной медицине**

*Сивец И.С., Кудина В.А.,
Томчук Н.Н.*

Создание внутренней контрольной
панели сывороток для ее использования
в ходе производства RPR-тест-системы
для диагностики сифилиса на базе
унитарного предприятия
«Хозрасчетное опытное производство
Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси»
(УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси») 634

Primary Immunodeficiencies / High-Tech Laboratory Researches
Zharankova Yu., Mikhalevskaya T., Aleshkevich S., Sharapova S., Sakovich I., Guryanova I., Polyakova E., Shitikova M., Zhilinski V., Uglova T., Belevtsev M.
 Clinical-Morphological Characteristics of Lymphoproliferation Syndrome in Patients with Inborn Errors of Immunity (Primary Immunodeficiency) 481

Biomedical Cell Technologies in Restorative Medicine / Original Researches
Alesia V. Vialichka, Bogdan A. Muzychenko, Maria A. Yakauleva, Darya B. Nizheharodava, Marina M. Zafranskaya
 Antioxidant and Regenerative Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells under Hypoxia Condition 500

Coronavirus Infection and Its Complications / Original Researches
Kamilova U., Yusupov D., Zakirova G., Utemuradov B.
 State of Coagulation Hemostasis and Endothelial Function in COVID-19 Convalescents 516

Coronavirus Infection and Its Complications / Laboratory Researches in Clinical Practice
Ina V. Belskaya, Tamara V. Amvrosieva, Zoya F. Bohush, Natallia V. Paklonskaya, Liudmila A. Anisko, Tamara A. Rogacheva
 Humoral Immunity against Different SARS-CoV-2 Variants 524

Diseases of the Blood System / High-Tech Laboratory Researches
Tamashevski A., Harmaza Yu., Fiadura N., Pasiukov V., Slobozhanina E.
 Redox Reactions Balance in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Chronic B-Lymphocytic Leukemia as a Personalist Criterion for Assessment the Organism Response to Drug Therapy 538

Diseases of the Blood System / Laboratory Researches in Clinical Practice
Shashok L., Kabayeva K., Tsvirko D.
 Deficiency of FXII Coagulation Factor (Hageman Factor) is a Rare Coagulopathy or a Common Laboratory Finding? 552

Diseases of the Blood System / Reviews and Lectures
Zukhovitskaya H., Kabayeva K., Tsvirko D.
 Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Etiopathogenesis, Diagnosis and Therapy (A Review) 559

Tumor Diseases / Experimental Researches
Soboleva O., Tikhonovich O., Zhogal S., Shapetska M., Pashkevich S.
 The Evaluation of Hematological Blood Parameters in Laboratory Mice Tumor Ehrlich's Adenocarcinoma Carrier 570

Tumor Diseases / Case Report
Hameed O., Maktoof Z., Al-Marashi A., Al-Taee R.
 Myofibroma in the Oral Cavity: A Case Report 580

Tumor Diseases / Innovations in the Laboratory Diagnostics of Oncological Diseases
Bekzod R. Bakhriddinov, Mansur A. Aliev, Gulshod M. Mardieva
 Differential Diagnosis of Brain Tumors of Various Etiologies Based on Establishing the Characteristics of Their Biochemical Composition Using Voxel Magnetic Resonance Spectroscopy 586

Dentistry / High-Tech Laboratory Researches
Poluyan O., Kostiuks S., Melnikova T., Yudina N.
 Polymorphisms of Collagen and Vitamin D Receptor Genes as Molecular Genetic Risk Factors for the Inflammatory Periodontal Diseases Formation 596

Narcology /

Experimental Researches

Kavalenia T., Kirko S.,

Belonovskaya E., Kuzmitskaya I.,

Lapshina E., Astrowskaja A.,

Zavodnik I.

Protective Effect of the Flavonoid

Naringin in Alcoholic Cardiomyopathy

in Rats 607

Narcology /

High-Tech Laboratory Researches

Olga M. Viarhun,

Andrei A. Shmihelski,

Igor M. Grigorev

Poisoning with Synthetic Cannabinoids:

Statistics, Identification Technology 618

Toxicology /

Laboratory Researches in Clinical Practice

Yser H.T.

The Effect of Cigarette Smoking on Blood

Parameters and Serum Minerals on Smoker's

Women in Basrah (Iraq) 627

Venereology /

New Technologies in Laboratory Medicine

Sivets I., Kudzina V., Tamchuk N.

Creation of an Internal Control Serum

Panel for its Use in the Production of the

RPR-Test-System for Diagnostics Based

on the Domestic Manufacturer Unitary

Enterprise "Pilot Production of the Institute

of Bioorganic Chemistry of the National

Academy of Sciences of Belarus" 635



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.4.001>



Жаранкова Ю.С.✉, Михалевская Т.М., Алешкевич С.Н., Шарапова С.О., Сакович И.С.,
Гурьянова И.Е., Полякова Е.А., Шитикова М.Г., Жилинский В.Э., Углова Т.А.,
Белевцев М.В.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Клинико-морфологическая характеристика синдрома лимфопролиферации у пациентов с врожденными дефектами иммунитета (первичными иммунодефицитами)

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Жаранкова Ю.С., Михалевская Т.М., Белевцев М.В.; сбор материала – Жаранкова Ю.С., Михалевская Т.М., Алешкевич С.Н., Шитикова М.Г., Гурьянова И.Е., Полякова Е.А., Сакович И.С., Шарапова С.О., Углова Т.А.; обработка данных, анализ и интерпретация результатов – Жаранкова Ю.С., Михалевская Т.М.; написание текста – Жаранкова Ю.С.; редактирование – Жаранкова Ю.С.; фоторедакция – Жилинский В.Э.

Подана: 05.09.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: marukovich85@mail.ru

Резюме

Введение. Синдром лимфопролиферации является одним из клинических проявлений первичных иммунодефицитов (ПИД). Чаще всего синдром лимфопролиферации представлен незлокачественной лимфаденопатией и/или спленоmegалией. Трудно интерпретируемым может быть экстранодальное лимфопролиферативное поражение легких, печени, кишечника, кожи. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование позволяет более точно определить клеточный состав, дифференцировку, степень зрелости клеточных компонентов различных тканевых структур, но не позволяет дифференцировать различные варианты ПИД. К настоящему времени не изучены особенности клинико-морфологической картины синдрома лимфопролиферации при различных формах врожденных дефектов иммунитета, установлению которых и было посвящено данное исследование.

Цель. Проанализировать результаты морфологического исследования биопсийного материала пациентов с ПИД-ассоциированной лимфопролиферацией и на основании установления с использованием значимых морфологических и иммуногистохимических биомаркеров особенностей изменений клинико-морфологической картины исследуемой ткани повысить эффективность диагностики первичных иммунодефицитов, протекающих с синдромом лимфопролиферации.

Материалы и методы. Данное исследование было проведено на базе Республиканского научно-практического центра (РНПЦ) детской онкологии, гематологии и иммунологии. В исследование включены 58 пациентов Республики Беларусь с установленным диагнозом ПИД (составивших 13,1% от общего числа пациентов с ПИД), в клинической картине заболевания которых присутствовали лимфаденопатия, спленоmegалия и/или экстранодальное лимфопролиферативное поражение, обнаруженные нами в ходе клинического исследования пациентов. У 32 из них была

выполнена диагностическая биопсия ткани лимфатического узла, легкого, кишечника, печени, кожи. В работе были применены гистологические, иммунохимические и молекулярно-генетические методы исследования. Гистологическое исследование проводилось с использованием «рутинных» гистохимических окрасок гематоксилином и эозином. Во всех случаях проведено иммуногистохимическое исследование, состоящее в использовании антител против CD20, Pax5, CD3, CD4, CD8, TdT, Ki67, LMO2, CD10, CD79a, CD34, EBV. Мутационный анализ генов проводили методом секвенирования следующего поколения (NGS) и методом стандартного исследования по Сэнгеру. При проведении NGS использовали разработанную нами кастомную панель из 350 генов, предположительно связанных с развитием ПИД. По результатам NGS анализировали кодирующие области генов, прилежащие к ним сайты сплайсинга, регуляторные области. Все клинически значимые генетические варианты подтверждали секвенированием по Сэнгеру. В случае подтвержденного генетического дефекта у пациентов, включенных в исследование, были обследованы родственники первой линии для определения характера наследования и пенетрантности гена.

Результаты. На базе РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии с использованием методов молекулярно-генетического исследования у 34 из 58 пациентов были установлены следующие генетические дефекты: FAS-TNFRSF6 (12 пациентов), PIK3CDGOF (6 пациентов), STAT3GOF (3 пациента), LRBA (2 пациента), SH2D1A (2 пациента), XIAP (2 пациента), NFkB1 (1 пациент), NFkB2 (1 пациент), CTLA4 (3 пациента), C2 (1 пациент), HAVCR2 (1 пациент). В большинстве случаев у пациентов с ПИД диагностирована В-клеточная доброкачественная лимфопрлиферация. Синдром лимфопрлиферации выявлен у 30,9% пациентов с ОБИИ (26 пациентов), у троих из этого числа – В-клеточная лимфома. В-клеточная доброкачественная лимфопрлиферация отмечена у 100% пациентов с АЛПС, APDS, XLPI, XLPII, дефектами T-reg. У одной пациентки с В-клеточной лимфопрлиферацией выявлен дефект в гене C2. У пациентки с Т-клеточной лимфомой кожи установлен дефект в гене HAVCR2. ВЭБ-ассоциированная В-клеточная лимфома диагностирована у пациента с мутацией в гене SH2D1A (XLPI) и пациента с мутацией в гене CTLA-4 (дефекты T-reg). Лимфоцитарно-гранулематозное интерстициальное поражение легких установлено у пациентов с мутациями в генах LRBA, CTLA-4. У 7 пациентов с ОБИИ (26,9%) и у одного пациента с мутацией CTLA-4 (33,3%) выполнена биопсия кишечника, которая выявила узловую лимфоидную гиперплазию кишечника.

Заключение. Впервые в Республике Беларусь на базе РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии описаны особенности изменений клинико-морфологической картины при ПИД-ассоциированной лимфопрлиферации. ПИД-ассоциированный синдром лимфопрлиферации у пациентов Республики Беларусь преимущественно представлен незлокачественной В-клеточной прлиферацией, приводящей к лимфаденопатии и/или спленомегалии, у 7 пациентов (12,1%) диагностирована лимфома. Для большинства пациентов с ПИД отсутствовали специфические гистологические изменения. Характерным гистологическим изменением у пациентов с АЛПС было появление инфильтрата из атипичных TCRab+CD3+CD4-CD8 лимфоцитов. ВЭБ-ассоциированная лимфопрлиферация отмечалась у всех пациентов с Х-сцепленным лимфопрлиферативным синдромом, у 50% пациентов с синдромом активированной фосфоинозитид-3-киназы дельта и у 37,5% пациентов с дефектами T-регуляторных лимфоцитов. У двоих пациентов ВЭБ-инфекция привела



к развитию лимфомы Беркитта: у одного пациента с XLP I типа и у одного пациента с дефектами T-reg, вызванными мутацией CTLA-4. Незлокачественная лимфоидная гиперплазия в кишечнике приводит к картине хронического воспалительного заболевания кишечника у пациентов с ОВИН, дефектами T-reg. Установлен дефект в гене C2 у пациентки, имеющей в дебюте заболевания спленомегалию и генерализованную лимфаденопатию. У другой пациентки была диагностирована панникулитоподобная кожная Т-клеточная лимфома, вызванная герминогенной мутацией в гене HAVCR2, кодирующем Т-клеточный иммуноглобулин муцин-3 (TIM-3).

Ключевые слова: первичный иммунодефицит, синдром лимфопролиферации, иммунная дисрегуляция, фолликулярная гиперплазия, лимфома

Zharankova Yu.✉, Mikhalevskaya T., Aleshkevich S., Sharapova S., Sakovich I., Guryanova I., Polyakova E., Shitikova M., Zhilinski V., Uglova T., Belevtsev M.
Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Clinical-Morphological Characteristics of Lymphoproliferation Syndrome in Patients with Inborn Errors of Immunity (Primary Immunodeficiency)

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: research concept and design – Zharankova Yu., Mikhalevskaya T., Belevtsev M.; collection of material – Zharankova Yu., Mikhalevskaya T., Aleshkevich S., Shitikova M., Guryanova I., Polyakova E., Sakovich I., Sharapova S., Uglova T.; data processing, analysis and interpretation of the results – Zharankova Yu., Mikhalevskaya T.; writing the text – Zharankova Yu.; editing – Zharankova Yu.; photo editing – Zhilinski V.

Submitted: 05.09.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: marukovich85@mail.ru

Abstract

Introduction. Lymphoproliferation syndrome is one of the clinical manifestations of primary immunodeficiencies (PID). Most often, lymphoproliferation syndrome is represented by non-malignant lymphadenopathy and/or splenomegaly. Extranodal lymphoproliferative lesions of the lungs, liver, intestines, and skin may be difficult to interpret. Morphological and immunohistochemical studies make it possible to more accurately determine the cellular composition, differentiation, and degree of maturity of the cellular components of various tissue structures of the lymph node, but does not allow differentiating different variants of PID. To date, the features of the clinical and morphological picture of lymphoproliferation syndrome in various forms of congenital immune defects, the establishment of which was the focus of this study, have not been studied.

Purpose. To analyze the results of a morphological study of biopsy material in patients with PID-associated lymphoproliferation, and, based on establishing the characteristics of changes in the clinical and morphological picture, to increase the efficiency of diagnosing primary immunodeficiencies occurring with lymphoproliferation syndrome through the use of significant morphological, immunohistochemical biomarkers.

Materials and methods. This study was conducted at the Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology. The study included 58 patients with an established diagnosis of PID in the Republic of Belarus (13.1% of the total number of analyzed patients with PID), whose clinical picture of the disease included lymphadenopathy, splenomegaly and/or extranodal lymphoproliferative lesions, which we discovered during the clinical examination of the patient. In 32 patients, a diagnostic biopsy was performed (tissue from the lymph node, lung, intestine, liver, skin). The work used histological, immunochemical and molecular genetic research methods. Histological examination was performed using routine hematoxylin and eosin histochemical stains. In all cases, an immunohistochemical study was performed with antibodies against CD20, Pax5, CD3, CD4, CD8, TdT, Ki67, LMO2, CD10, CD79a, CD34, EBV. Mutational analysis of genes was carried out using the next generation sequencing (NGS) method and the standard Sanger method. When conducting NGS, we used a custom panel of 350 genes that we developed, presumably associated with the development of PID. Based on the NGS results, the coding regions of genes, adjacent splice sites, and regulatory regions were analyzed. All clinically significant genetic variants were confirmed by Sanger sequencing. In the case of a confirmed genetic defect in patients included in the study, first-degree relatives were examined to determine the pattern of inheritance and penetrance of the gene.

Results. At the Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, using molecular genetic research methods, the following genetic defects were identified in 34 out of 58 patients: FAS-TNFRSF6 (12 patients), PIK3CDGOF (6 patients), STAT3GOF (3 patients), LRBA (2 patients), SH2D1A (2 patients), XIAP (2 patients), NFkB1 (1 patient), NFkB2 (1 patient), CTLA4 (3 patients), C2 (1 patient), HAVCR2 (1 patient). In most cases, patients with PID are diagnosed with benign B-cell lymphoproliferation. Lymphoproliferation syndrome was detected in 30.9% of patients with CVID (26 patients), three of this number (11.5%) had B-cell lymphoma. B-cell benign lymphoproliferation was observed in 100% of patients with ALPS, APDS, XLPI, XLP II, and T-reg defects. One patient with B-cell lymphoproliferation had a defect in the C2 gene. A patient with cutaneous T-cell lymphoma has a defect in the HAVCR2 gene. EBV-associated B-cell lymphoma was diagnosed in a patient with a mutation in the SH2D1A gene (XLPI) and a patient with a mutation in the CTLA-4 gene (T-reg defects). Lymphocytic granulomatous interstitial lung disease was observed in patients with mutations in the LRBA and CTLA-4 genes. In 7 patients with CVID and 1 patient with CTLA-4, an intestinal biopsy was performed, which revealed nodular lymphoid hyperplasia of the intestine.

Conclusion. For the first time in the Republic of Belarus, on the basis of the Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, the features of changes in the clinical and morphological picture in PID-associated lymphoproliferation were described for the first time. PID-associated lymphoproliferation syndrome in patients of the Republic of Belarus is predominantly represented by non-malignant B-cell proliferation leading to lymphadenopathy and/or splenomegaly; lymphoma was diagnosed in 7 patients (12.1%). For most PIDs, there were no specific histological changes. A characteristic histological change in patients with ALPS was the appearance of an infiltrate of atypical TCRab+CD3+CD4-CD8 lymphocytes. EBV-associated lymphoproliferation was observed in all patients with X-linked lymphoproliferative syndrome, in 50% of patients with activated phosphoinositide 3-kinase delta syndrome, in 37.5% of patients with defects in T-regulatory lymphocytes. In two patients, EBV infection led to the development of



Burkitt's lymphoma – one patient with XLP type I and one patient with T-reg defects caused by a CTLA-4 mutation. Non-malignant lymphoid hyperplasia in the intestine leads to the picture of chronic inflammatory bowel disease in patients with CVID, T-reg defects. A defect in the C2 gene was identified in a patient who had splenomegaly and generalized lymphadenopathy at the onset of the disease. Another patient was diagnosed with panniculitis-like cutaneous T-cell lymphoma caused by a germ cell mutation in the HAVCR2 gene encoding T-cell immunoglobulin mucin-3 (TIM-3).

Keywords: primary immunodeficiency, lymphoproliferation syndrome, immune dysregulation, follicular hyperplasia, lymphoma

■ ВВЕДЕНИЕ

Синдром лимфопролиферации является частью клинического спектра различных вариантов моногенных врожденных дефектов иммунитета, включая заболевания с иммунной дисрегуляцией и аутовоспалительными нарушениями [1, 6, 7]. Лимфопролиферация, ассоциированная с врожденными дефектами иммунитета, приводит главным образом к лимфаденопатии и/или спленомегалии, а также может вовлекать нелимфоидные органы (легкие, печень, кишечник, кожа). Такие состояния могут быть трудно интерпретируемыми, а также недооцениваемыми и не распознаваемыми клиницистами как ассоциированные с первичным иммунодефицитом [2–5].

К настоящему времени не изучены особенности клинико-морфологической картины синдрома лимфопролиферации при различных формах врожденных дефектов иммунитета, установлению которых и было посвящено данное исследование. Гистологическое исследование у пациентов с ПИД-ассоциированной лимфопролиферацией вносит дополнительный вклад в постановку диагноза. Иммуногистохимическое исследование позволяет более точно определить клеточный состав, дифференцировку, степень зрелости клеточных компонентов различных тканевых структур лимфоузла, но не позволяет дифференцировать различные варианты ПИД в силу отсутствия у большинства из них специфических изменений.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проанализировать результаты морфологического исследования биопсийного материала пациентов с ПИД-ассоциированной лимфопролиферацией и на основании установления с использованием значимых морфологических и иммуногистохимических биомаркеров особенностей изменений клинико-морфологической картины исследуемой ткани повысить эффективность диагностики первичных иммунодефицитов, протекающих с синдромом лимфопролиферации.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 58 пациентов Республики Беларусь с установленным у них диагнозом первичного иммунодефицита (что составило 13,1% от общего числа пациентов с ПИД), в клинической картине заболевания которых присутствовали лимфаденопатия, спленомегалия и/или экстранодальное лимфопролиферативное поражение, обнаруженные в ходе клинического и инструментального исследования.

У 32 пациентов была выполнена диагностическая биопсия ткани лимфатического узла, легкого, кишечника, печени или кожи. В работе применены гистологические, иммунохимические и молекулярно-генетические методы исследования. Гистологическое исследование проводилось с использованием «рутинных» гистохимических окрасок гематоксилином и эозином. Во всех случаях проведено иммуногистохимическое исследование с антителами против CD20, Pax5, CD3, CD4, CD8, TdT, Ki67, LMO2, CD10, CD79a, CD34, EBV. Мутационный анализ генов проводили методом секвенирования следующего поколения (NGS) и методом стандартного исследования по Сэнгеру. При проведении NGS использовали разработанную нами кастомную панель из 350 генов, предположительно связанных с развитием ПИД. По результатам NGS анализировали кодирующие области генов, прилежащие к ним сайты сплайсинга, регуляторные области. Все клинически значимые генетические варианты подтверждали секвенированием по Сэнгеру. В случае подтвержденного генетического дефекта у пациентов, включенных в исследование, были обследованы родственники первой линии для определения характера наследования и пенетрантности гена.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Лимфаденопатия, спленомегалия и/или экстранодальное лимфопролиферативное поражение, выявленные в ходе клинического исследования, имели место у 58 пациентов с установленным диагнозом ПИД в Республике Беларусь (13,1% от общего числа пациентов с установленным диагнозом ПИД). С использованием методов молекулярно-генетического исследования у 34 из 58 пациентов были установлены следующие генетические дефекты: FAS-TNFRSF6 (12 пациентов), PIK3CDGOF (6 пациентов), STAT3GOF (3 пациента), LRBA (2 пациента), SH2D1A (2 пациента), XIAP (2 пациента), NFkB1 (1 пациент), NFkB2 (1 пациент), CTLA4 (3 пациента), C2 (1 пациент), HAVCR2 (1 пациент). У 32 пациентов была выполнена диагностическая биопсия ткани лимфатического узла, легкого, кишечника, печени, кожи. В большинстве случаев у пациентов с ПИД диагностирована В-клеточная доброкачественная лимфопролиферация.

Клинико-морфологическая картина проявлений синдрома лимфопролиферации при различных формах первичных иммунодефицитов

1. Общая переменная иммунная недостаточность (ОВИН). Известно, что пациенты с ОВИН характеризуются переменностью клинико-иммунологических признаков, повышенной восприимчивостью к инфекциям, а также иммунной дисрегуляцией, которая проявляется аутоиммунитетом, лимфопролиферацией и малигнизацией [9–11]. По разным оценкам, частота встречаемости хронической незлокачественной лимфопролиферации у пациентов с ОВИН составляет от 1,4% до 26%, у половины пациентов наблюдаются лимфаденопатия, спленомегалия и/или узловая лимфоидная гиперплазия желудочно-кишечного тракта [9–12].

Патогенез лимфопролиферации при ОВИН до конца не выяснен, и по этой причине в настоящее время изучается роль генетических факторов и иммунологических особенностей в развитии лимфопролиферации в этой группе ПИД.

В Республике Беларусь диагноз ОВИН выставлен у 84 пациентов (данные национального регистра Республики Беларусь по первичным иммунодефицитам). У 26 пациентов (30,9%) из 84 в клинической картине имели место лимфаденопатия и/или



спленомегалия (рис. 1), у 4 пациентов (4,8%) они констатированы в дебюте заболевания. У двоих пациентов (7,7%) из 26 были установлены генетические дефекты NFκB1 (1 пациент), NFκB2 (1 пациент). У 24 пациентов с ОВИН генетический дефект не был идентифицирован, диагноз был установлен на основании клинко-лабораторных данных (ESID Registry – Working Definitions for Clinical Diagnosis of PID).

Сочетание лимфаденопатии и спленомегалии имелось у 20 пациентов (76,9%). У 4 пациентов (15,4%) периферическая лимфаденопатия сочеталась с медиастиальной лимфаденопатией. У троих пациентов (11,5%) была диагностирована В-клеточная фолликулярная лимфома. Диагностическая биопсия выполнена у 15 пациентов (57,7%). У семи пациентов (26,9%) с хронической диареей была выполнена колоноскопия с биопсией кишечника, которая демонстрировала фолликулярную гиперплазию и очаговую лимфоидную инфильтрацию кишечника.

Интерпретация результатов диагностической биопсии осложнялась характером выраженных в разной степени гистологических изменений. Согласно данным литературы, у некоторых пациентов могут наблюдаться неправильное формирование зародышевых центров, появление клональной популяции лимфоидных клеток в незлокачественных лимфатических узлах, потенциально имитирующее лимфому. На рис. 2 представлена морфологическая картина исследованного биопсийного материала лимфоузла пациентки, которая была направлена к онкологу по поводу медиастиальной и периферической лимфаденопатии.

2. Аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (АЛПС). АЛПС обусловлен дефектом FAS-зависимого апоптоза лимфоцитов (Fas R – Fas L). Незлокачественная лимфаденопатия и спленомегалия присутствует у 95% пациентов с АЛПС [14]. Дефектный апоптоз вызывает накопление циркулирующих и паракортикальных дважды негативных Т-лимфоцитов (TCRab+CD3+CD4–CD8–), что приводит к клиническому увеличению лимфатических узлов и/или селезенки. В Республике Беларусь диагноз АЛПС выставлен у 12 пациентов. Изолированная спленомегалия отмечалась нами у 2 пациентов. У 10 пациентов она сочеталась с периферической лимфаденопатией (рис. 3). У 6 пациентов – с висцеральной/мезентериальной лимфаденопатией. У одного пациента развилась В-клеточная лимфома – возраст манифестации 45 лет. Диагностическая биопсия выполнена у 5 пациентов. На рис. 4 представлены данные морфологического исследования биопсийного материала лимфоузла пациента с АЛПС. Характерным гистологическим изменением у пациентов с АЛПС было появление инфильтрата из атипичных TCRab+CD3+CD4–CD8 лимфоцитов в паракортикальной зоне.

3. Синдром активированной фосфоинозитид-3-киназы дельта (APDS, PASLI-синдром). В основе заболевания лежат мутации молекулярного комплекса фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) – мутация фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата 3-каталитической субъединицы киназы δ (PIK3CD) с усилением функции гена (APDS1) и мутация регуляторной субъединицы фосфоинозитид-3-киназы 1 (PIK3R1) с потерей функции гена (APDS2) [15, 16]. Гиперактивация комплекса PI3K, совершаемая главным образом за счет усиления функции сигнального пути mTOR, приводит к комбинированному иммунному дефекту, часто связанному с уменьшением наивных Т-лимфоцитов, повышением уровня стареющих лимфоцитов

и гипогаммаглобулинемией; типичным также является повышение уровня IgM. У 89% пациентов отмечается стойкая (>6 месяцев) незлокачественная лимфопролиферация в виде хронической лимфаденопатии (~75%), спленомегалии (~43%), лимфоидной инфильтрации лор-органов (~48%) или кишечника (~24%) [15]. В Республике Беларусь диагноз APDS установлен у 6 пациентов. У 5 пациентов (83,3%) на момент постановки диагноза имели место лимфаденопатия и/или спленомегалия. Двое пациентов имели стойкую гиперплазию лимфоидного глоточного кольца. На рис. 5 представлена МРТ-картина гипертрофии Вальдейерова кольца у 20-летней пациентки.

У троих пациентов (50%) периферическая лимфаденопатия и спленомегалия сочетались с висцеральной/мезентериальной лимфаденопатией. У троих пациентов (50%) лимфаденопатия/спленомегалия были ассоциированы с персистирующей ВЭБ-инфекцией. Диагностическая биопсия была выполнена у 4 пациентов (66,7%). На рис. 6 представлены данные морфологического исследования биопсийного материала лимфоузла пациента с APDS, на рис. 7 – ВЭБ-ассоциированная лимфаденопатия у пациента с APDS.

4. Дефекты Т-регуляторных лимфоцитов. К настоящему времени описаны молекулярные дефекты, приводящие к нарушению функции Т-регуляторных лимфоцитов и клинике иммунной дисрегуляции. Лимфопролиферация является частью клинического спектра у пациентов с мутациями в генах LRBA, CTLA-4, STAT3GOF и встречается не менее чем у 50% пациентов [13, 17].

В Республике Беларусь у 8 пациентов были идентифицированы генетические дефекты STAT3GOF (3 пациента), LRBA (2 пациента), CTLA-4 (3 пациента), приводящие к нарушению T-reg.

Молекулярно-генетические дефекты CTLA-4 и LRBA приводят к схожим клиническим фенотипам у пациентов ввиду того, что являются звеньями одного патогенетического механизма. CTLA-4, экспрессируемый Treg, играет ключевую роль в снижении экспрессии костимулирующих молекул CD80 и CD86 на поверхности

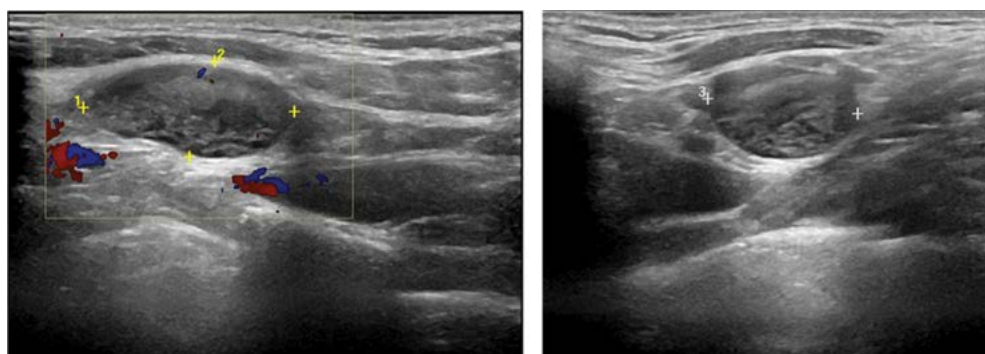


Рис. 1. УЗИ-картина надключичной лимфаденопатии с признаками патологической перестройки лимфоузла у пациента с ОВИН

Fig. 1. Ultrasound picture of supraclavicular lymphadenopathy with signs of pathological restructuring of the lymph node in a patient with CVID

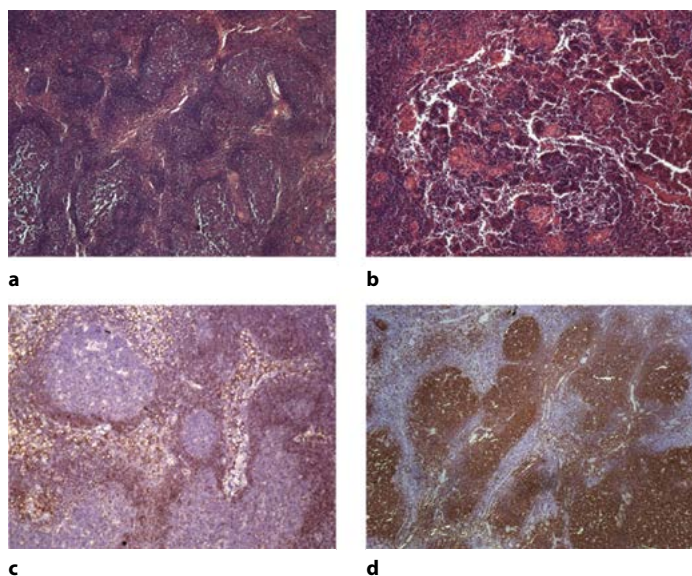


Рис. 2. Биопсия лимфатического узла у пациентки с ОВИН: а – участок ткани гиперплазированного лимфоузла с наличием выраженной «цветущей» фолликулярной гиперплазии со сливающимися и фолликулярными центрами, гематоксилин-эозин, $\times 50$; б – очаговое скопление эпителиоидных гистиоцитов в паракортикальной зоне, гематоксилин-эозин, $\times 200$; в – иммуногистохимическое окрашивание на антитела к bcl2: позитивная реакция клеток зоны мантии, увеличение $\times 100$; д – иммуногистохимическое окрашивание на антитела к CD20: преимущественная экспрессия в клетках фолликулярных центров, $\times 50$

Fig. 2. Biopsy of a lymph node in a patient with CVID: а – tissue area of a hyperplastic lymph node, with a pronounced "blooming" follicular hyperplasia with confluent and follicular centers of hematoxylin-eosin, $\times 50$; б – focal accumulation of epithelioid histiocytes in the paracortical zone of hematoxylin-eosin, $\times 200$; в – immunohistochemical staining for antibodies to bcl2: positive reaction of the cells of the mantle zone, $\times 100$ magnification; д – immunohistochemical staining for antibodies to CD20: predominant expression in the cells of the follicular centers, $\times 50$

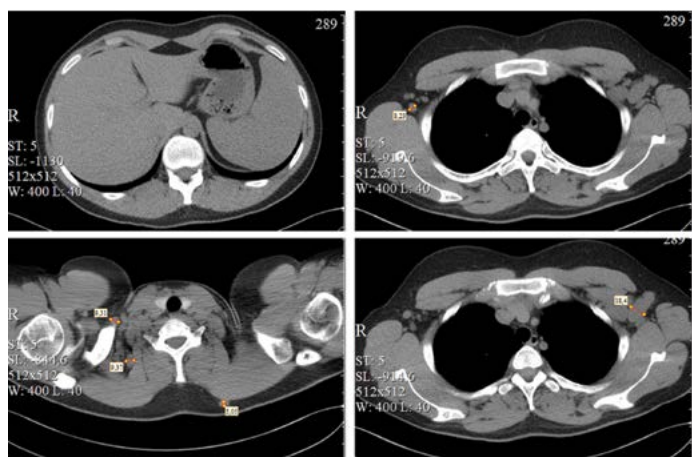


Рис. 3. КТ-картина гепатоспленомегалии, паховой, подмышечной лимфаденопатии у пациента с АЛПС

Fig. 3. CT picture of hepatosplenomegaly, inguinal, axillary lymphadenopathy in a patient with ALPS

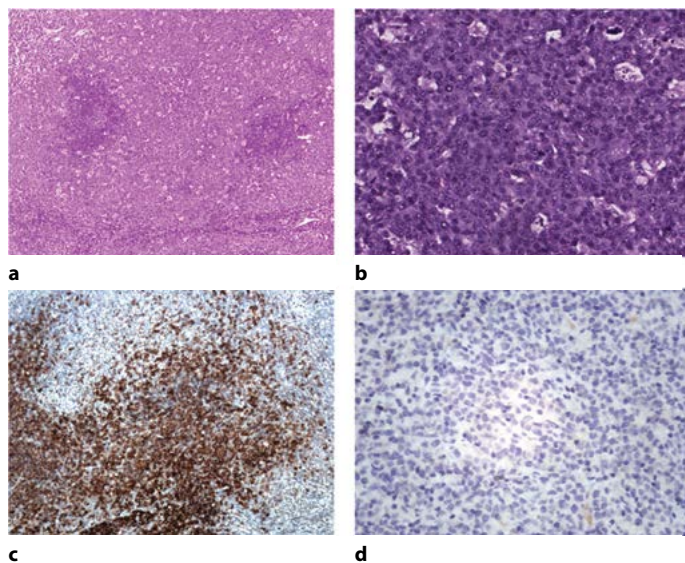


Рис. 4. Биопсия лимфатического узла у пациентов с АЛПС: а – паракортикальная зона лимфатического узла резко расширена за счет инфильтрата из светлых лимфоидных клеток, лимфоидные центры уменьшены в размере, атрофичны, гематоксилин-эозин, $\times 50$; б – инфильтрат представлен монморфными светлыми лимфоидными клетками без четких границ цитоплазмы с округлым ядром с глыбчатым хроматином и 1–2 ядрышками, гистиоцитами «звездного неба», гематоксилин-эозин, $\times 100$; при иммуногистохимическом исследовании атипичные лимфоциты экспрессируют CD3, $\times 100$ (с) и не экспрессируют CD4/CD8 (d), $\times 400$
Fig. 4. Lymph node biopsy in patients with ALPS: а – the paracortical zone of the lymph node is sharply expanded due to the infiltrate of light lymphoid cells, the lymphoid centers are reduced in size, atrophic, hematoxylin-eosin, $\times 50$; б – the infiltrate is represented by monomorphic light lymphoid cells without clear boundaries of the cytoplasm with a rounded nucleus with clumpy chromatin and 1–2 nucleoli, "starry sky" histiocytes, hematoxylin-eosin, $\times 100$; on immunohistochemical examination, atypical lymphocytes express CD3, $\times 100$ (c) and do not express CD4/CD8 (d), $\times 400$

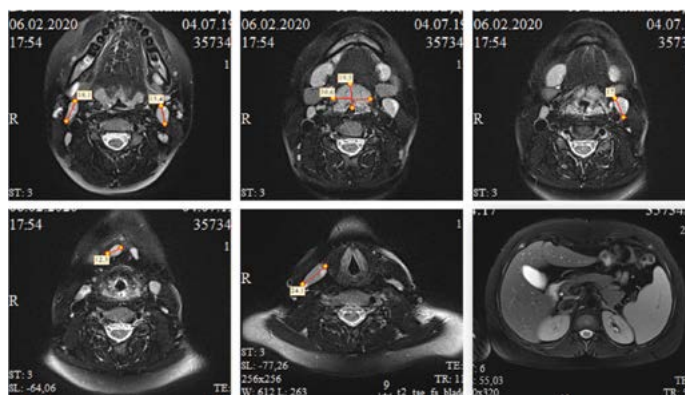


Рис. 5. МРТ-картина гипертрофии Вальдейера кольца – гипертрофия преимущественно за счет язычной миндалины (20 \times 33 – макс. поперечный размер язычной миндалины), гипертрофии подчелюстных л/у с обеих сторон до 15–18 мм, подбородочных л/у – до 12 мм у пациента с APDS
Fig. 5. MRI picture of hypertrophy of the Waldeyer ring – hypertrophy, mainly due to the lingual tonsil (20 \times 33 max transverse size of the lingual tonsil), hypertrophy of the submandibular lymph node on both sides up to 15–18 mm, submental lymph node – up to 12 mm, in a patient with APDS

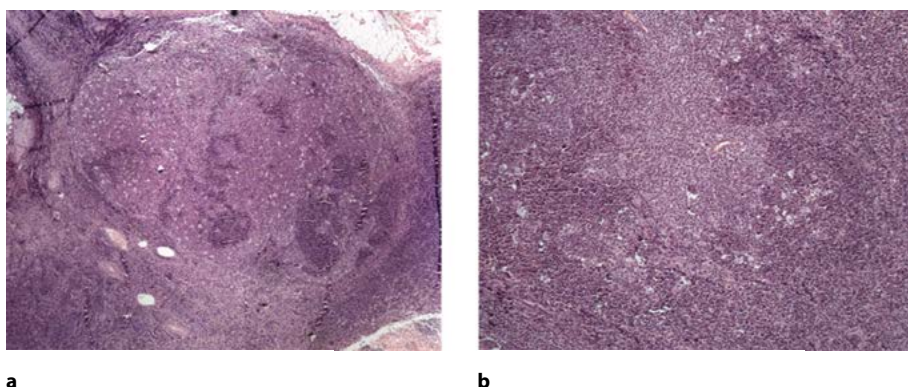


Рис. 6. Биопсия лимфатического узла у пациента с APDS: а – участки ткани лимфоузла с гиперплазированным центром фолликула с нечеткими границами, истончением мантийного слоя, гематоксилин-эозин, $\times 50$; б – скопления моноцитoidных В-лимфоцитов вокруг синусов, гематоксилин-эозин, $\times 100$
Fig. 6. Lymph node biopsy in a patient with APDS: a – areas of lymph node tissue with hyperplastic center of the follicle with fuzzy boundaries, thinning of the mantle layer, hematoxylin-eosin, $\times 50$; b – accumulations of monocytoid B-lymphocytes around the sinuses, hematoxylin-eosin, $\times 100$

антигенпрезентирующих клеток (APC), и LRBA ингибирует лизосомальную деградацию CTLA-4 [18]. До 50% пациентов с мутациями CTLA-4 демонстрируют лимфаденопатию/спленомегалию, которая наблюдается в том же числе случаев у пациентов с мутацией LRBA [17].

Схожая клиническая картина иммунной дисрегуляции характерна также для пациентов с молекулярными дефектами, затрагивающими гены STAT, которые вовлечены в сигнальные пути, активируемые различными цитокинами через фосфорилирование, опосредованное Янус-киназой (JAK). В частности, мутации GOF STAT3 приводят к клинике иммунодефицита, аутоиммунитета и лимфопролиферации (рис. 10).

Лимфаденопатия и спленомегалия была выявлена нами у 7 пациентов с дефектами T-reg в дебюте заболевания. Диагностическая биопсия лимфатических узлов выполнялась у 4 пациентов (50%).

В лимфопролиферативные процессы с экстранодальным поражением чаще всего вовлекались легкие и кишечник. Так, у пациентки с мутацией LRBA установлены КТ-картина генерализованной лимфаденопатии с вовлечением медиастинальных, бронхопульмональных лимфатических узлов, гепатоспленомегалия, а также множественное очаговое поражение легких (рис. 8). Пациентке была выполнена атипичная резекция легкого, биопсия лимфатического узла (рис. 9). У троих пациентов (37,5%) синдром лимфопролиферации был ассоциирован с ВЭБ-инфекцией.

Незлокачественная лимфоидная гиперплазия в кишечнике пациентов с дефектами T-reg, как и у пациентов с ОВИН, может приводить к картине хронического воспалительного заболевания кишечника, хронической диарее, потере массы тела, повышению содержания фекального кальпротектина. Биопсия толстого кишечника подтверждает наличие фолликулярной гиперплазии, очаговой лимфоидной инфильтрации и диффузной эозинофильной инфильтрации (рис. 12).

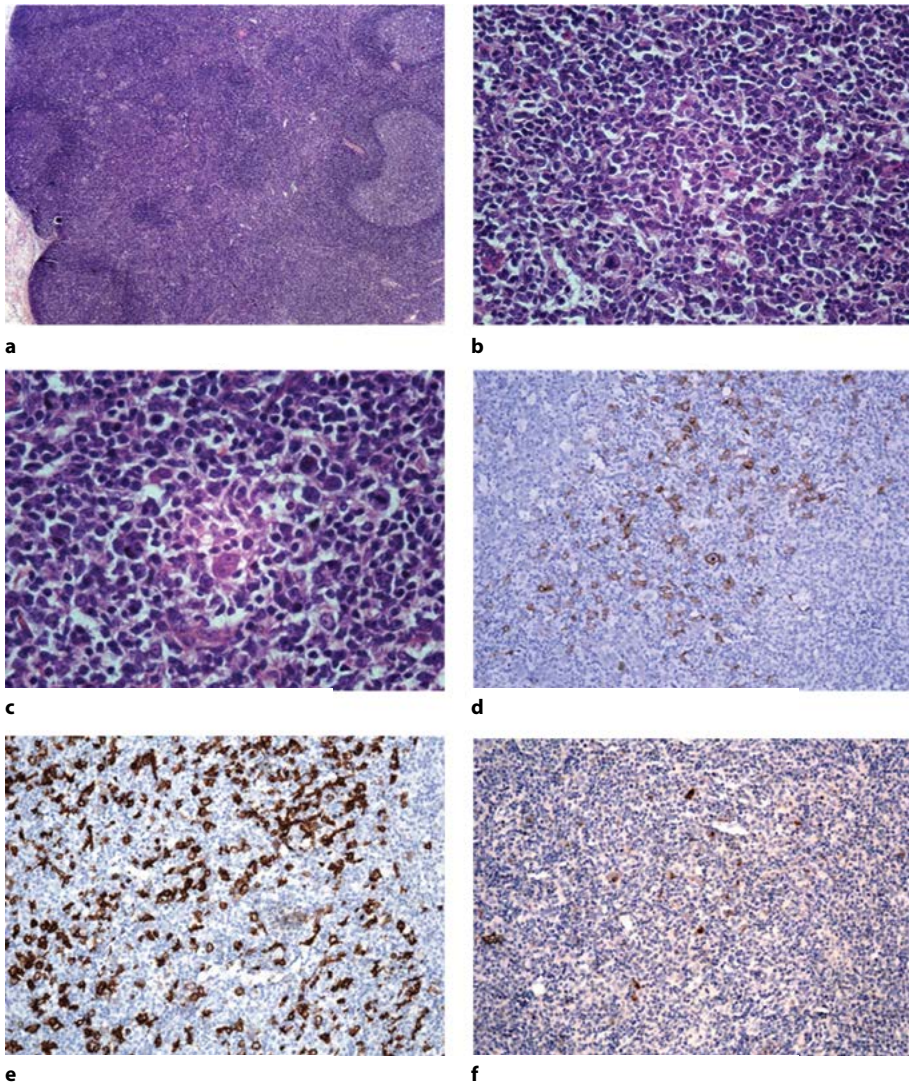


Рис. 7. Лимфаденопатия, вызванная вирусом Эпштейна – Барр, у пациента с APDS: а – участки ткани лимфоузла с фолликулярной гиперплазией и расширением зоны паракортекса, гематоксилин-эозин, $\times 50$; б – в паракортексе полиморфноклеточный инфильтрат из иммунобластов, плазмочитов и лимфоцитов, гематоксилин-эозин, $\times 400$; в – в инфильтрате встречаются крупные атипичные клетки типа клеток Рид – Штернберга, гематоксилин-эозин, $\times 400$; при иммуногистохимическом исследовании крупные клетки иммунобласты экспрессируют CD30 (д), CD20 (е), EBV LMP (ф), $\times 400$

Fig. 7. Epstein – Barr virus lymphadenopathy in a patient with APDS: а – sites of lymph node tissue with follicular hyperplasia and expansion of the paracortex zone hematoxylin-eosin, $\times 50$; б – in the paracortex polymorphocellular infiltrate of immunoblasts, plasmocytes and lymphocytes, hematoxylin-eosin, $\times 400$; в – large atypical cells of the Reed – Sternberg type, hematoxylin-eosin, $\times 400$ are found in the infiltrate; in immunohistochemical study, large cells of immunoblasts express CD30 (d), CD20 (e), EBV LMP (f), $\times 400$

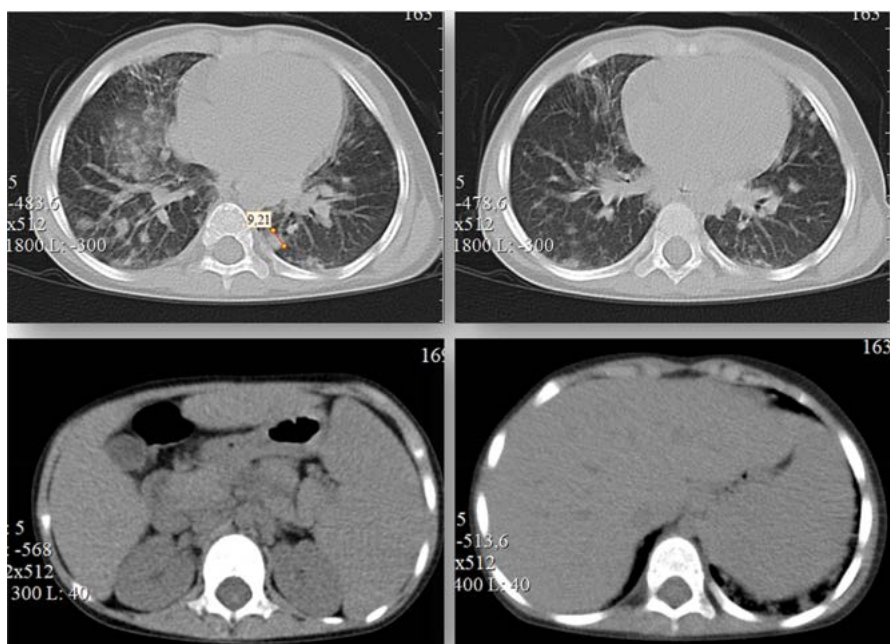


Рис. 8. РКТ-картина лимфоцитарно-гранулематозного интерстициального поражения легких, гепатоспленомегалии у пациента с дефектами Т-регуляторных лимфоцитов – мутация LRBA
Fig. 8. CT scan of lymphocytic-granulomatous interstitial lung disease, hepatosplenomegaly in a patient with defects in T-regulatory lymphocytes – LRBA mutation

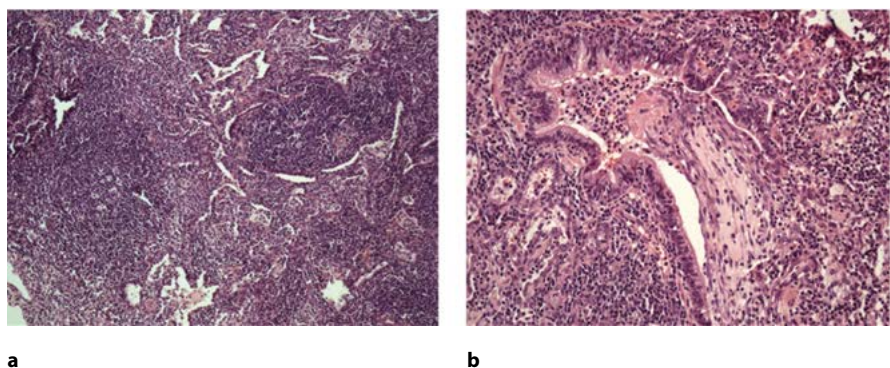


Рис. 9. Биопсия легкого у пациентки с LRBA-мутацией: а – участки ткани паренхимы легкого: нормальное альвеолярное строение полностью отсутствует. В межальвеолярных перегородках – выраженная лимфоплазмочитарная инфильтрация, формирование лимфоидных фолликулов, гематоксилин-эозин, $\times 100$; б – стенка бронхов инфильтрирована лимфоцитами с образованием фибропластической пробки, гематоксилин-эозин, $\times 100$
Fig. 9. Lung biopsy in a patient with LRBA-mutation: a – parts of the lung parenchyma tissue: the normal alveolar structure is completely absent. In the interalveolar septa, there is a pronounced lymphoplasmacytic infiltration, formation of lymphoid follicles, hematoxylin-eosin, $\times 100$; b – the wall of the bronchi is infiltrated with lymphocytes, with the formation of a fibroplastic plug, hematoxylin-eosin, $\times 100$

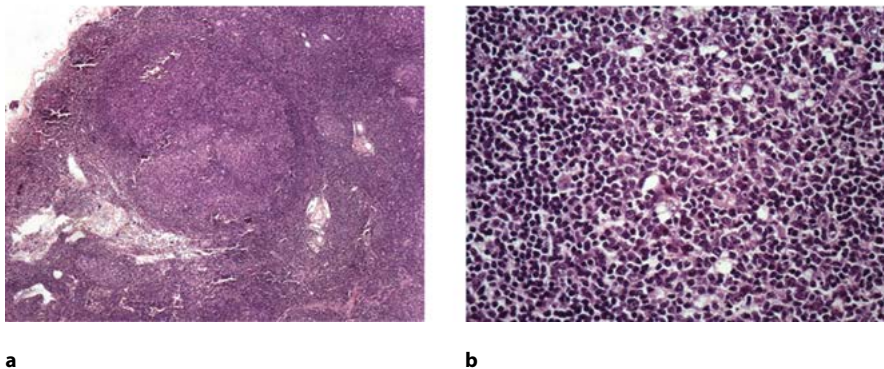


Рис. 10. Биопсия лимфатического узла у пациентки с STAT3GOF: а – участок ткани лимфоузла с наличием гиперплазированного фолликула неправильной формы, гематоксилин-эозин, $\times 50$; б – очаговое скопление плазматических клеток в лимфоидном фолликуле, гематоксилин-эозин, $\times 400$
Fig. 10. Lymph node biopsy in a patient with STAT3GOF: а – area of lymph node tissue with irregularly shaped hyperplastic follicle, hematoxylin-eosin, $\times 50$; б – focal accumulation of plasma cells in the lymphoid follicle, hematoxylin-eosin, $\times 400$

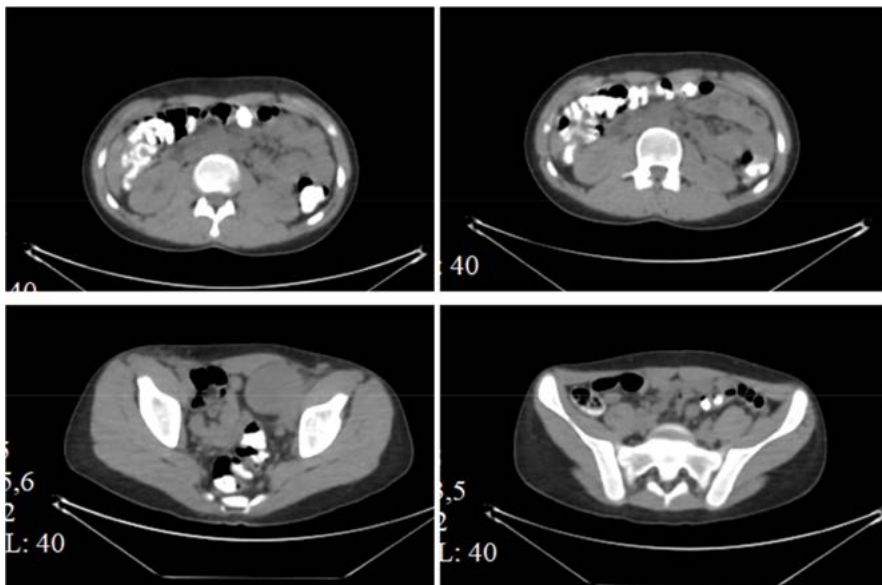


Рис. 11. ПЭТ-КТ-картина метаболически активного злокачественного поражения лимфоузлов брюшной полости, тазовых и паховых лимфоузлов с обеих сторон, левого надпочечника у пациента с дефектами Т-регуляторных лимфоцитов – мутация CTLA-4
Fig. 11. PET-CT picture of a metabolically active malignant lesion of the lymph nodes of the abdominal cavity, pelvic and inguinal lymph nodes on both sides, the left adrenal gland in a patient with defects in T-regulatory lymphocytes – CTLA-4 mutation

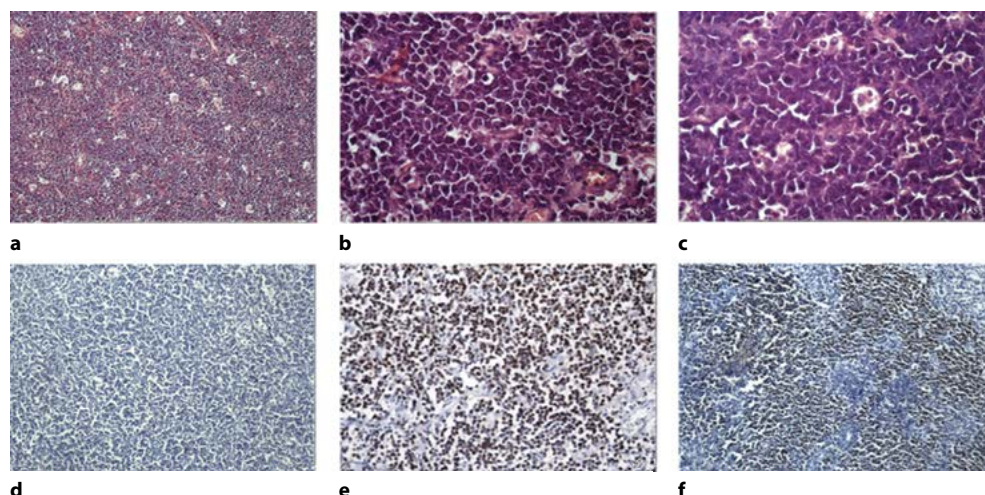


Рис. 12. Биопсия лимфатического узла и кишечника у пациента с CTLA-4: а – участки ткани лимфоузла totally замещены опухолью из мonomорфных атипичных клеток среднего размера с крупным ядром с глыбчатым хроматином и редкими ядрышками, с высокой митотической активностью, формированием очагов некроза и реактивной гистиоцитарной инфильтрацией. ИГХ: CD20(+++), CD10 (не работает), bcl2(-), bcl6(+++), CMYC(+++), Tdt(-), ki67(95%), заключение: лимфома Беркитта ICD-O 9687/3; б – участок слизистой оболочки тонкой кишки с сохраненной структурой, наличием нескольких гиперплазированных лимфоидных фолликулов, эозинофильной инфильтрации; с – участок слизистой оболочки толстой кишки с наличием гиперплазированного фолликула, очаговой лимфоидной инфильтрации и большого количества эозинофилов; д, е, ф – участки слизистой оболочки толстой кишки с сохраненной гистоархитектоникой, с наличием фолликулярной гиперплазии, очаговой лимфоидной инфильтрации, мелких очажков некроза и диффузной эозинофильной инфильтрации

Fig. 12. Biopsy of the lymph node and intestines in a patient with CTLA-4: a – parts of the lymph node tissue are totally replaced by a tumor of medium-sized monomorphic atypical cells with a large nucleus with clumpy chromatin and rare nucleoli, with high mitotic activity, the formation of foci of necrosis and reactive histiocytic infiltration. IHC: CD20(+++), CD10 (not working), bcl2(-), bcl6(+++), CMYC(+++), Tdt(-), ki67(95%), conclusion: Burkitt's lymphoma ICD-O 9687/3; b – area of the mucous membrane of the small intestine with a preserved structure, the presence of several hyperplastic lymphoid follicles, eosinophilic infiltration; c – area of the mucous membrane of the colon with the presence of a hyperplastic follicle, focal lymphoid infiltration and a large number of eosinophils; d, e, f – areas of the colon mucosa with preserved histoarchitecture, with the presence of follicular hyperplasia, focal lymphoid infiltration, small foci of necrosis and diffuse eosinophilic infiltration

Злокачественная лимфопрлиферация, согласно приведенным в систематическом обзоре данным, чаще встречается у пациентов с дефицитом CTLA-4. У одного из обследованных нами пациентов с мутацией CTLA-4 в последующем была диагностирована ВЭБ-ассоциированная лимфома Беркитта (рис. 11, 12).

5. X-сцепленный лимфопрлиферативный синдром. X-сцепленный лимфопрлиферативный синдром I, II типов (XLP I и XLP II) характеризуется повышенной восприимчивостью к ВЭБ-инфекции и развитием ВЭБ-ассоциированной лимфопрлиферации. Утрата иммунного контроля за ВЭБ может быть как полной, приводя к летальному исходу течения инфекционного мононуклеоза, так и частичной, способной вызывать развитие других лимфопрлиферативных заболеваний,

в том числе ВЭБ-ассоциированной лимфомы или ВЭБ-ассоциированного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (HLH) (рис. 14) [8]. Признаки, выявляемые при биопсии, не относятся к специфичным. Как правило, выявляется увеличение содержания фагоцитирующих макрофагов (пороговое значение отсутствует согласно данным литературы) и увеличение количества цитотоксических Т-лимфоцитов.

В Республике Беларусь диагноз X-сцепленного лимфопролиферативного синдрома установлен нами у 4 пациентов. У одного пациента в дебюте заболевания развивалась ВЭБ-ассоциированная лимфома Беркитта (рис. 14) с поражением брыжейки тонкого кишечника, мезентериальных и подвздошных лимфоузлов, мочевого пузыря, передней брюшной стенки. У одного пациента ВЭБ-индуцированный синдром лимфопролиферации имел быстро прогрессирующее течение и привел к летальному исходу. У двоих пациентов нами был диагностирован ВЭБ-индуцированный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз.

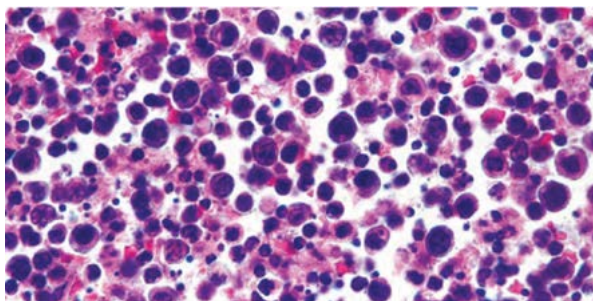


Рис. 13. Лимфопролиферативная болезнь при X-сцепленном лимфопролиферативном синдроме с признаками тяжелого инфекционного мононуклеоза. Отмечаются признаки пролиферации В-лимфоцитов с плазмацитозом и иммунобластами. Наличие выраженного апоптоза [8]
Fig. 13. Lymphoproliferative disease in X-linked lymphoproliferative syndrome with signs of severe infectious mononucleosis. There are signs of B-lymphocyte proliferation with plasmacytosis and immunoblasts. The presence of pronounced apoptosis [8]



Рис. 14. КТ-картина лимфопролиферативного заболевания с поражением мезентериальных, подвздошных лимфоузлов, стенок кишечника у пациента с X-сцепленным лимфопролиферативным синдромом I типа
Fig. 14. CT picture of a lymphoproliferative disease with lesions of the mesenteric, iliac lymph nodes, intestinal walls in a patient with type I X-linked lymphoproliferative syndrome



6. Дефекты системы комплемента. Дефекты системы комплемента (исключая дефицит С1-ингибитора) занимают малую часть в структуре ПИД, тем не менее, исследования последних лет показывают, что эта группа заболеваний в значительной степени недооценивается в клинической практике [18]. Чаще всего дефицит системы комплемента представлен С2-дефицитом. Основными клиническими проявлениями дефицита С2 являются инвазивные инфекции, вызванные инкапсулированными бактериями, и аутоиммунная патология. Лимфопролиферативный синдром не является типичным клиническим признаком проявления

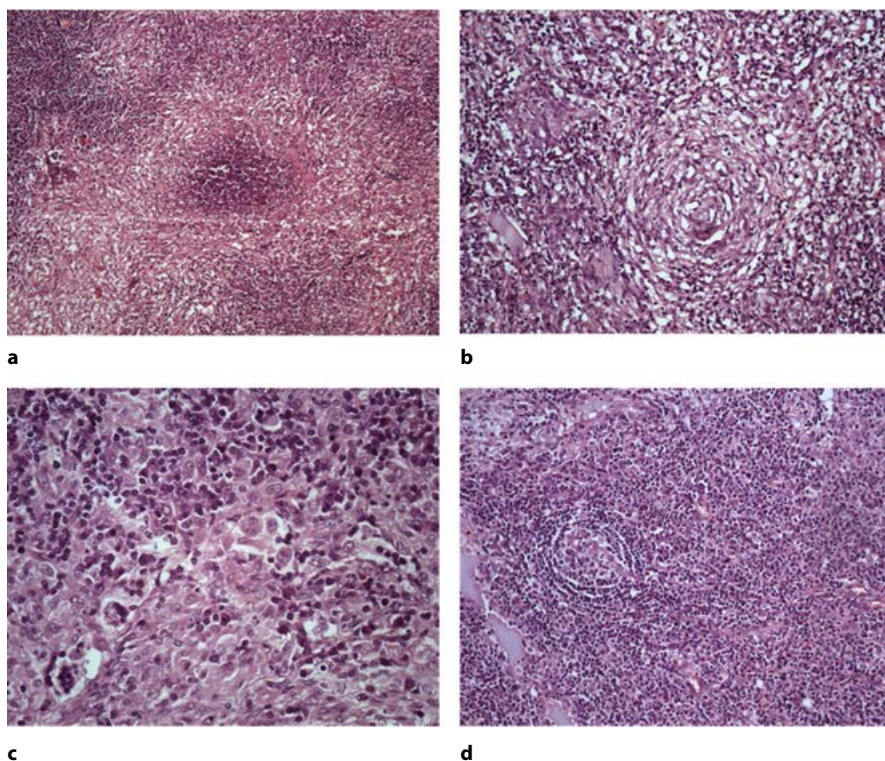


Рис. 15. Биопсия лимфатического узла у пациента с С2-дефицитом: а – в паракортикальной зоне лимфоузла многочисленные сливающиеся между собой гранулемы, в центре которых определяется лейкоцитокластический детрит, гематоксилин-эозин, $\times 100$; б – вокруг мелких сосудов формируются муфты из эпителиоидных гистиоцитов, гематоксилин-эозин, $\times 200$; в – расширенные синусы лимфоузла с макрофагами с признаками эмпириоплеза, гематоксилин-эозин, $\times 400$; г – атрофичный лимфоидный фолликул, вокруг в паракортексе инфильтрация плазматическими, эозинофильными лейкоцитами, гематоксилин-эозин, $\times 200$

Fig. 15. Lymph node biopsy in a patient with C2 deficiency: a – in the paracortical zone of the lymph node, numerous merging granulomas, in the center of which leukocytoclastic detritus hematoxylin-eosin $\times 100$ is determined; b – clutches of epithelioid histiocytes, hematoxylin-eosin $\times 200$ are formed around small vessels; c – dilated sinuses of the lymph node with macrophages with signs of emphysematous changes, hematoxylin-eosin, $\times 400$; d – atrophic lymphoid follicle, infiltration around the paracortex with plasmacytes, eosinophilic leukocytes, hematoxylin-eosin, $\times 200$

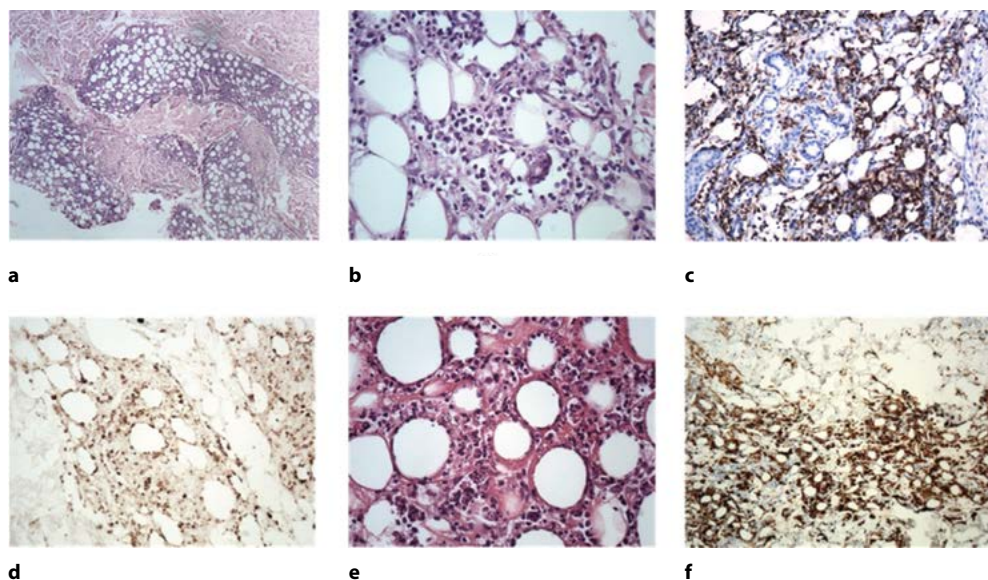


Рис. 16. Биопсия кожи у пациентки с подкожной паникулитоподобной Т-клеточной лимфомой и гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом на фоне TIM-3 дефицита: а – в подкожно-жировой клетчатке выраженный диффузный полиморфный инфильтрат вокруг долек жировой ткани, $\times 50$; б – инфильтрат представлен атипичными мелкими гиперхромными лимфоцитами и фагоцитирующими макрофагами, формирующими характерные ободки вокруг адипоцитов; при иммуногистохимическом исследовании атипичные лимфоциты экспрессируют CD8 (с) и granzyme B (d), $\times 400$; е – крупные фагоцитирующие форменные элементы крови, макрофаги формируют скопления вокруг адипоцитов, $\times 400$; ф – при иммуногистохимическом исследовании макрофаги экспрессируют CD163, $\times 100$

Fig. 16. Skin biopsy in a patient with subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma and hemophagocytic lymphohistiocytosis against the background of TIM-3 deficiency: а – in the subcutaneous fat, a pronounced diffuse polymorphic infiltrate around the lobules of adipose tissue, $\times 50$; б – the infiltrate is represented by atypical small hyperchromic lymphocytes and phagocytic macrophages, forming characteristic rims around adipocytes; on immunohistochemical examination, atypical lymphocytes express CD8 (с) and granzyme B (d), $\times 400$; е – large, phagocytic blood cells, macrophages form clusters around adipocytes, $\times 400$; ф – in immunohistochemical study, macrophages express CD163, $\times 100$

C2-дефицита. Тем не менее лимфаденопатия и спленомегалия могут развиваться у этих пациентов на фоне персистирующей инфекции и пролиферации клона аутореактивных клеток. В Республике Беларусь дефицит C2 был установлен у одной пациентки, которая была направлена в РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии по поводу генерализованной лимфаденопатии и спленомегалии. Для исключения злокачественного лимфопролиферативного заболевания пациентке была выполнена диагностическая биопсия лимфатического узла (рис. 15).

7. Аутовоспалительные синдромы. Группа аутовоспалительных синдромов разнообразна по своим клиническим проявлениям. Наиболее узнаваемая клиническая картина аутовоспалительных синдромов представлена повторяющимися



эпизодами лихорадки, сопровождающимися другими признаками или симптомами, которые могут включать лимфаденопатию. Считается, что в отличие от других заболеваний, аутовоспалительные синдромы не связаны с развитием лимфоидных злокачественных новообразований, но клинический фенотип часто трудно интерпретировать [19, 20]. Лимфаденопатия при аутовоспалительных синдромах в большинстве случаев сопровождается периодическую лихорадку, афтозный стоматит, фарингит при синдроме PFAPA, а также при синдроме гипер-IgD (HIDS).

В публикациях последних лет рассматриваются новые клинические и диагностические аспекты, связанные с мутацией HAVCR2, приводящей к подкожной панникулитоподобной Т-клеточной лимфоме (ПТКЛ) и гемофагоцитарному лимфогистиоцитозу. У пациентов заболевание дебютирует ближе к 20 годам. В основе заболевания лежит герминогенная мутация в гене HAVCR2, кодирующем Т-клеточный иммуноглобулин муцин-3 (TIM-3), ингибирующий рецептор, который экспрессируется на Т-клетках и клетках врожденного иммунитета. Нарушение экспрессии TIM-3 приводит к стойкой активации Т-клеток и повышению продукции воспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β). В Республике Беларусь такое заболевание было подтверждено нами у одной пациентки в возрасте 15 лет (рис. 16).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые в Республике Беларусь на базе РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии были проанализированы результаты морфологического исследования биопсийного материала (лимфатических узлов, кишечника, легких, кожи) и описаны особенности изменений клинко-морфологической картины при ПИД-ассоциированной лимфопролиферации у пациентов с врожденной иммунной дисрегуляцией, общей вариабельной иммунной недостаточностью, редкими формами аутовоспалительных синдромов.

ПИД-ассоциированный синдром лимфопролиферации у пациентов Республики Беларусь преимущественно представлен незлокачественной В-клеточной пролиферацией, приводящей к лимфаденопатии и/или спленомегалии, у 7 пациентов (12,1%) диагностирована лимфома. Причинами развития синдрома лимфопролиферации у пациентов Республики Беларусь были врожденные дефекты апоптоза, ВЭБ-инфекция, пролиферация клона аутореактивных лимфоцитов, хроническая персистирующая инфекция.

Для большинства ПИД отсутствовали специфические гистологические изменения. Характерным гистологическим изменением у пациентов с АЛПС было появление инфильтрата из атипичных TCRab+CD3+CD4-CD8 лимфоцитов. Ассоциации синдрома лимфопролиферации с ВЭБ среди пациентов с АЛПС выявлено не было. ВЭБ-ассоциированная лимфопролиферация отмечалась у всех пациентов с Х-сцепленным лимфопролиферативным синдромом, у 50% пациентов – с синдромом активированной фосфоинозитид-3-киназы дельта, у 37,5% пациентов – с дефектами Т-регуляторных лимфоцитов. У двоих пациентов ВЭБ-инфекция привела к развитию лимфомы Беркитта: у одного пациента с XLP I типа и у одного пациента с дефектами T-reg, вызванными мутацией CTLA-4. Таким образом, обнаружение ВЭБ-ассоциированной лимфопролиферации может указывать на наличие ПИД. Экстранодальное лимфопролиферативное поражение легких, кишечника, кожи в сочетании с иммунологическими данными также может указывать на наличие ПИД.

Незлокачественная лимфоидная гиперплазия в кишечнике приводит к картине хронического воспалительного заболевания кишечника у пациентов с ОВИН, дефектом T-reg.

Синдром лимфопрлиферации не является типичным клиническим проявлением у пациентов с дефектами системы комплемента и аутовоспалительными синдромами. Тем не менее, нами был установлен дефект в гене C2 у пациентки, имеющей в дебюте заболевания спленомегалию и генерализованную лимфаденопатию. У другой пациентки была диагностирована панникулитоподобная кожная Т-клеточная лимфома, вызванная герминогенной мутацией в гене HAVCR2, кодирующем Т-клеточный иммуноглобулин муцин-3 (TIM-3). Данная мутация относится к группе аутовоспалительных синдромов. В связи с редкостью встречаемости этих состояний и сложностью многогранных механизмов их формирования для обеспечения адекватного диагностического подхода необходимы тесное творческое содружество врачей-клиницистов, впервые наблюдающих пациента, и представителей многопрофильной группы специалистов, имеющих богатый опыт в области диагностики первичных иммунодефицитов и аутовоспаления.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Yazdani R. (2017) Infectious and Noninfectious Pulmonary Complications in Patients With Primary Immunodeficiency Disorders. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 27 (4), pp. 213–224. doi: 10.18176/jiaci.0166
2. Kenneth L. McClain (2019) *Peripheral lymphadenopathy in children: Etiology*.
3. Gangemi S., Allegra A., Musolino C. (2015) Lymphoproliferative disease and cancer among patients with common variable immunodeficiency. *Leukemia Research*, 39 (4), pp. 389–396. doi: 10.1016/j.leukres.2015.02.002
4. Sander C.A., Medeiros L.J., Weiss L.M. (1992) Lymphoproliferative Lesions in Patients with Common Variable Immunodeficiency Syndrome. *The American Journal of Surgical Pathology*, 16 (12), pp. 1170–1182. doi: 10.1097/0000478-199212000-00004
5. Alkhairy O.K., Abolhassani H., Rezaei N. (2015) Spectrum of Phenotypes Associated with Mutations in LRBA. *Journal of Clinical Immunology*, 36 (1), pp. 33–45. doi: 10.1007/s10875-015-0224-7.
6. Delmonte O.M., Notarangelo L.D. (2019) Targeted Therapy with Biologicals and Small Molecules in Primary Immunodeficiencies. *Medical Principles and Practice*, 29 (2), pp. 101–112. doi: 10.1159/000503997
7. Picard C., Bobby Gaspar H., Al-Herz W. (2017) International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *Journal of Clinical Immunology*, 38 (1), pp. 96–128. doi: 10.1007/s10875-017-0464-9
8. Steven H. Swerdlow, Elias Campo, Nancy Lee Harris, Elaine S. Jaffe (2017) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*.
9. Turpin D., Furudoi A., Parrons M. (2018) Increase of follicular helper T cells skewed toward a Th1 profile in COVID patients with non-infectious clinical complications. *Clinical Immunology*. doi: 10.1016/j.clim.2018.09.006
10. McCusker C., Upton J., Warrington R. (2018) Primary immunodeficiency. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14 (S2). doi: 10.1186/s13223-018-0290-5
11. Sánchez-Ramón S., Bermúdez A., González-Granado L.I. (2019) Primary and Secondary Immunodeficiency Diseases in Oncohaematology: Warning Signs, Diagnosis, and Management. *Frontiers in Immunology*, 10. doi: 10.3389/fimmu.2019.00586
12. Gathmann B., Mahlaoui N., Gérard L. (2014) Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134 (1), pp. 116–126.e11. doi: 10.1016/j.jaci.2013.12.1077
13. Fabre A., Marchal S., Barlogis V. (2019) Clinical aspects of STAT3 gain-of-function germline mutations: A Systematic Review. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. doi: 10.1016/j.jaip.2019.02.018
14. Natkunam Y., Gratzinger D., Chadburn A. (2018) Immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders: time for reappraisal? *Blood*, 132 (18), pp. 1871–1878. doi: 10.1182/blood-2018-04-842559
15. Luo Y., Xia Y., Wang Y. (2018) Identification of a novel de novo gain-of-function mutation of PIK3CD in a patient with activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome. *Clinical Immunology*. doi: 10.1016/j.clim.2018.08.007
16. Costagliola G., Consolini R. (2021) Lymphadenopathy at the crossroad between immunodeficiency and autoinflammation: An intriguing challenge. *Clinical & Experimental Immunology*, 205 (3), pp. 288–305. doi: 10.1111/cei.13620
17. Schubert D., Bode C., Kenefeck R., Hou T.Z. (2014) Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nature Medicine*, 20 (12), pp. 1410–1416. doi: 10.1038/nm.3746
18. Sjöholm A.G., Jönsson G., Braconier J.H. (2006) Complement deficiency and disease: An update. *Molecular Immunology*, 43 (1–2), pp. 78–85. doi: 10.1016/j.molimm.2005.06.025
19. Vargas-Hernández A., Mace E.M., Zimmerman O. (2018) Ruxolitinib partially reverses functional natural killer cell deficiency in patients with signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141 (6), pp. 2142–2155.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2017.08.040
20. Herber M., Mertz P., Dieudonné Y. (2019) Primary immunodeficiencies and lymphoma: a systematic review of literature. *Leukemia & Lymphoma*, 1–11. doi: 10.1080/10428194.2019.1672056



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.4.002>
УДК 602.9:612.262



Величко А.В.^{1,2}✉, Музыченко Б.А.¹, Яковлева М.А.¹, Нижегородова Д.Б.^{1,2},
Зафранская М.М.^{1,2}

¹ Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

² Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения
Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

Антиокислительный и регенеративный потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в условиях гипоксии

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Величко А.В. – проведение иммунологических исследований и статистическая обработка данных, написание исходного варианта текста; Музыченко Б.А. – проведение иммунологических исследований; Яковлева М.А. – проведение иммунологических исследований; Нижегородова Д.Б. – концепция и дизайн исследования, проведение иммунологических исследований и статистическая обработка данных, окончательное редактирование текста рукописи; Зафранская М.М. – концепция и дизайн исследования, окончательное редактирование текста рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке отдельного гранта Министерства образования Республики Беларусь, № госрегистрации 20220591.

Подана: 31.03.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: alesjswirskey@mail.ru

Резюме

Введение. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) представляют собой основу развития перспективной стратегии регенеративной медицины, используемой для терапии широкого спектра заболеваний. В настоящее время особое внимание уделяется исследованию секрета ММСК, посредством которого клетки участвуют в репарации и восстановлении поврежденных тканей, а также обеспечивают антиоксидантную защиту организма при патологических состояниях, сопровождающихся гипоксией.

Цель. Оценить регенеративный и антиокислительный потенциал ММСК костного мозга и жировой ткани человека в условиях экспериментального моделирования гипоксии.

Материалы и методы. Материалом исследования явились 20 культур ММСК доноров, которые предоставили информированное согласие. Мононуклеары периферической крови, нейтрофилы и макрофаги получали от 10 здоровых доноров. Условия гипоксии создавали с помощью микробиологического набора Anaerocult A® mini. Для оценки поверхностного фенотипа и внутриклеточных молекул ММСК использовали метод проточной цитометрии, для внеклеточной продукции ростовых факторов и цитокинов – метод иммуноферментного анализа. Оксидантную активность клеточных культур и кокультур оценивали методом хемилюминесценции. Обработку данных проводили в программе Statistica 8.0.

Результаты. В условиях гипоксии изменялись морфология и фенотип ММСК посредством снижения экспрессии маркеров CD105 и CD90, что может влиять на клеточную

адгезию и межклеточную кооперацию. В то же время гипоксия стимулировала продукцию репаративных факторов (рецептор 2-го типа фактора роста эндотелия сосудов, матриксная металлопротеиназа 3, фактор роста тромбоцитов D), что усиливало репаративные и ангиогенные свойства ММСК, а также увеличивала синтез антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы 3, каталазы, глутатиона, NO-синтазы), предотвращающих избыточное образование активных форм кислорода. В условиях дефицита кислорода ММСК проявляли иммуномодулирующий эффект в отношении нейтрофилов и макрофагов, что проявлялось увеличением интенсивности хемилюминесценции.

Заключение. Для оптимизированной пробоподготовки биомедицинских клеточных продуктов на основе ММСК необходимо учитывать, что гипоксия влияет на морфологию, изменяет фенотип и стимулирует секретом клеток, а также проявляет иммуномодулирующий эффект в отношении клеток врожденного иммунитета.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, оксидативный стресс, гипоксия, иммуномодуляция, фенотип

Alesia V. Vialichka^{1,2}✉, Bogdan A. Muzychenko¹, Maria A. Yakauleva¹, Darya B. Nizheharodava^{1,2}, Marina M. Zafranskaya^{1,2}

¹ International Sakharov Environmental Institute of the Belarusian State University, Minsk, Belarus

² Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Antioxidant and Regenerative Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells under Hypoxia Condition

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Alesia V. Vialichka – conducting immunological studies and statistical data processing, writing the original version of the text; Bogdan A. Muzychenko – conducting immunological studies; Maria A. Yakauleva – conducting immunological studies; Darya B. Nizheharodava – concept and study design, conducting immunological studies and statistical data processing, final editing of the manuscript; Marina M. Zafranskaya – concept and study design, final editing of the manuscript.

Funding. The work was carried out with the financial support of a personal grant from the Ministry of Education of the Republic of Belarus, registration number 20220591.

Submitted: 31.03.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: alesjswirskay@mail.ru

Abstract

Introduction. Multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) represent a promising strategy of regenerative medicine used for the treatment of a wide range of diseases. Currently, particular attention is paid to the study of MMSCs secretome, through which cells participate in the repair and regeneration of damaged tissues, and also provide antioxidant protection of the body in pathological conditions accompanied by hypoxia.

Purpose. To evaluate the regenerative and antioxidant potential of human bone marrow and adipose tissue derived MMSCs under experimental hypoxia.



Materials and methods. The material was 20 MMSCs cultures from donors who provided informed consent. Peripheral blood mononuclear cells, neutrophils and macrophages were obtained from 10 healthy donors. Hypoxia condition was created using the Anaerocult A® mini microbiological kit. The flow cytometry method was used for the assessment of the surface phenotype and intracellular molecules of MMSCs while extracellular growth factors and cytokines were estimated by enzyme immunoassay. The oxidant activity of cell cultures and co-cultures was evaluated by chemiluminescence. Data processing was carried out with Statistica 8.0 program.

Results. MMSCs morphology and phenotype were changed via decreased CD105 and CD90 expression under hypoxia conditions, what may affect cell adhesion and intercellular cooperation. Hypoxia stimulated the production of reparative factors (vascular endothelial growth factor type 2 receptor, matrix metalloproteinase 3, platelet-derived growth factor D), what enhanced the reparative and angiogenic properties of MMSCs as well as increase the synthesis of antioxidant enzymes (superoxide dismutase 3, catalase, glutathione, NO-synthase) preventing the excessive formation of reactive oxygen species. In conditions of oxygen deficiency MMSCs showed an immunomodulatory effect on neutrophils and macrophages, what was proved by an increase in the intensity of chemiluminescence.

Conclusion. For optimized MMSC-based biomedical cell products preparation it is important to take into account that hypoxia affects MMSCs morphology, changes their phenotype and stimulates cell secretion as well as enhances an immunomodulatory effect of MMSCs on innate immunity cells.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells, oxidative stress, hypoxia, immunomodulation, phenotype

■ ВВЕДЕНИЕ

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) – недифференцированные клетки, образующиеся из мезенхимы в ходе эмбриогенеза, которые могут дифференцироваться *in vitro* в остеобласты, адипоциты и хондробласты, а также обладают способностью к самовоспроизведению через асимметричное деление. ММСК обладают иммуномодулирующей, репаративной и антиоксидантной активностью, которая реализуется через способность подавлять пролиферацию лимфоцитов, а также продуцируют широкий спектр биологически активных молекул, которые в совокупности называют секретомом ММСК. Секретом ММСК включает компоненты внеклеточного матрикса, белки, участвующие в процессе адгезии, ферменты, а также их активаторы и ингибиторы, факторы роста и связывающие белки, цитокины и хемокины. В совокупности данные факторы поддерживают регенеративные процессы в поврежденных тканях, однако также могут оказывать различное влияние на процессы, которые они регулируют в зависимости от условий микроокружения [7].

В последние годы интерес к потенциалу клинического применения ММСК привел к увеличению числа исследований влияния условий культивирования и экспансии на поведение и функцию клеток, в том числе на содержание кислорода. На сегодняшний день результаты оценки влияния низкого и нормального содержания кислорода на морфологию, фенотип, пролиферативную способность и функциональную

активность ММСК противоречивы и неоднозначны [2, 3, 5]. Доказательства прямой роли окислительного стресса в иммуномодуляции ММСК отсутствуют. В небольшом количестве исследований *in vitro* выявлены механизмы, участвующие в защитных эффектах ММСК, однако при этом не до конца понятно, каким образом ММСК опосредуют их действие *in vivo*. Известно, что по мере культивирования ММСК *ex vivo* окислительный стресс увеличивается, уровень определенных поверхностных антигенов снижается (например, CD13, CD29 и CD44), а способность подавлять пролиферацию Т-клеток уменьшается [5].

Учитывая, что ММСК уже успешно используются для лечения пациентов в клинических испытаниях, крайне важно понимать, как именно ММСК опосредуют свои эффекты при различных воспалительных заболеваниях, связанных с оксидативным стрессом, чтобы гарантировать использование ММСК с оптимальной терапевтической эффективностью и безопасностью [2]. В связи с тем что ММСК, полученные от пациентов, демонстрируют изменение выживаемости, пролиферации и дифференцировки, требуется разработка новой стратегии для улучшения их антиоксидантной, регенеративной и иммуномодулирующей способности. Потенциальным перспективным подходом является обработка культур факторами роста или гипоксическим шоком. Высокие терапевтические эффекты стволовых клеток в гипоксическом состоянии предполагают, что исходной нишей или предпочтительным их микроокружением является низкая концентрация кислорода [4].

Поскольку большинство клинических применений биомедицинского клеточного продукта ММСК зависят от их иммуномодулирующих, репаративных и антиокислительных свойств, весьма важной задачей является выяснение механизмов влияния условий гипоксии на функциональный потенциал ММСК, включая стимуляцию экспансии и увеличение клеточной биомассы *ex vivo*, а также улучшение терапевтической эффективности ММСК [6].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка регенеративного и антиокислительного потенциала ММСК костного мозга и жировой ткани человека в условиях экспериментального моделирования гипоксии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования явились ММСК костного мозга ($n=10$) и жировой ткани ($n=10$), полученные после информированного согласия от доноров; на основе клеток создан криобанк клеточных культур ММСК. Мононуклеары периферической крови (МПК), нейтрофилы и макрофаги получали от 10 здоровых доноров в возрасте от 21 до 31 года.

Культуральный метод

ММСК культивировали в культуральной среде DMEM (Gibco™, United Kingdom) с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Бразилия), 1%-ного L-глутамина (Gibco, США), 1%-ной смеси антибиотиков и антимикотика (Gibco, Германия) в течение 24 ч. и 72 ч. в условиях газовой гипоксии (1–2% O₂) с использованием микробиологического набора Anaerocult® A mini (Millipore, Германия) при 37 °C или в условиях нормоксии в CO₂-инкубаторе.



МПК, нейтрофилы и моноциты доноров выделяли из гепаринизированной венозной крови доноров (n=10) на градиенте плотности с $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ (Carl Roth, Германия). Для получения культуры макрофагов проводили культивирование моноцитов в течение 2 ч. в чашках Петри с адгезивным покрытием в культуральной среде DMEM (Gibco™, United Kingdom) с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Бразилия), 1%-ного L-глутамин (Gibco, США), 1%-ной смеси антибиотиков и антимикотика (Gibco, Германия).

Метод экспериментального моделирования гипоксии

Условия гипоксии (1–2% O₂) создавали с помощью микробиологического набора Anaerocult A® mini (Millipore, Германия), содержащего гипоксические пакеты с компонентами, которые химически быстро и полностью связывают кислород. Моделирование гипоксии проводили в течение 24 и 72 ч.

Иммуноферментный метод

Концентрации супероксиддисмутазы 3 (SOD3), рецептора 2-го типа фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), фактора роста тромбоцитов D (PDGF-D), матриксной металлопротеиназы (MMP3), фактора роста фибробластов 2 (FGF2), глутатиона, каталазы, фактора некроза опухоли α (TNF- α), интерлейкина 10 (IL-10), интерлейкина 12 (IL-12), интерферона γ (IFN- γ) определяли в супернатантах культур ММСК с использованием наборов, представленных в табл. 1, и рассчитывали концентрацию на 1×10^5 клеток.

Таблица 1
Используемые наборы для иммуноферментного анализа
Table 1
Used kits for enzyme immunoassay

Фактор	Наименование набора реагентов	Производитель	Каталожный номер
SOD3	Human Superoxide Dismutase 3 ELISA Kit	Elabscience, США	E-EL-H2382
VEGFR2	Human Vascular endothelial growth factor 2 ELISA Kit	Fine Test, Китай	EH0329
PDGF-D	Human Platelet-derived growth factor D человека ELISA Kit	Elabscience, США	E-EL-H2213
MMP3	Human Matrix metalloproteinase-3 человека ELISA Kit	Elabscience, США	E-EL-H1446
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2 ELISA Kit	Cloud-Clone Corporation, США	CEA551Po
Глутатион	GSH ELISA Kit	Cloud-Clone Corporation, США	E-EL-H0026
Каталаза	Catalase ELISA Kit	Cloud-Clone Corporation, США	SEC418Hu
TNF- α	Human Tumor Necrosis Factor Alpha ELISA Kit	Fine Test, Китай	EH0302
IL-10	Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ	ВЕКТОР-БЕСТ, Россия	A-9774
IL-12	Human Interleukin 12 ELISA Kit	Bioassay Technology Laboratory, Китай	E3301Hu
IFN- γ	Human IFN- γ ELISA Kit	Elabscience, США	E-EL-H0108

Метод проточной цитометрии

Для оценки фенотипа ММСК использовали панель моноклональных антител CD90-FITC, CD44-FITC, CD105-PE, CD45-PE-Cy7, CD34-PE (Beckman Coulter, США). Результаты регистрировали на 5000 клеток на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Уровень миелопероксидазы и NO-синтазы определяли с помощью моноклональных антител MPO-PE (миелопероксидаза) и eNOS-PE (эндотелиальная синтаза оксида азота) соответственно методом проточной цитометрии (Beckman Coulter, США).

Метод хемилюминесценции

Кокультивирование гипоксических и нормоксических ММСК с нейтрофилами и макрофагами проводили в полной культуральной среде RPMI-1640 (Lonza, Швейцария) в течение 12–18 ч. и 48 ч. соответственно. Для приготовления системы совместного культивирования ММСК помещали в трансвеллу лунки 24-луночных планшетов (Corning, США) в полной среде RPMI-1640 на 24 ч. при 5% CO₂, 37 °С для адгезии клеток. После 24-часовой инкубации, в условиях гипоксии, в лунки с ММСК добавляли свежие нейтрофилы. Планшеты инкубировали при 37 °С в течение 12–18 ч.

Для постановки кокультивирования ММСК в среде RPMI-1640 их помещали в трансвеллу лунки 24-луночных планшетов на 24 ч. при 5% CO₂, 37 °С. После 24-часовой инкубации в условиях гипоксии вносили макрофаги в лунки и клетки культивировали в течение 48 ч. при 5% CO₂, 37 °С.

Оценку люминолзависимой (1 ммоль/л) и форбол-12-миристетат-13-ацетат-индуцированной (ФМА-индуцированной) (0,5 мкг/мл) хемилюминесценции нейтрофилов и макрофагов проводили с помощью хемилюминометра Lum-100 (Россия), определяли максимальное значение интенсивности хемилюминесценции (I_{\max}).

Статистический метод

Обработку данных и построение графиков проводили в программе Statistica 8.0. Для представления полученных данных использовали показатели медианы, нижнего и верхнего квартилей (25-й÷75-й процентиля). Для сравнения 2 зависимых групп использовали критерий Вилкоксона, для сравнения 2 независимых групп – критерий Манна – Уитни.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фенотипическая характеристика ММСК в условиях гипоксии

Согласно мнению специалистов Международного сообщества по клеточной терапии, фенотип ММСК определяется как CD90⁺CD105⁺CD44⁺CD119⁺CD34⁻CD45⁻CD31⁻, где экспрессия положительных маркеров должна составлять не менее 95%, а отрицательных – не более 2,5%. Для соответствия фенотипа ММСК рекомендовано проводить оценку по двум и более положительным и отрицательным маркерам.

В данном исследовании проведено иммунофенотипирование ММСК костного мозга (рис. 1А–1Е) и жировой ткани (рис. 1Ж–1М) по трем положительным маркерам – CD105, CD190 и CD44, двум отрицательным – CD34 и CD45. Установлено, что в условиях гипоксии статистически значимо снижалась экспрессия CD105 (эндоглина, входящего в рецепторный комплекс TGF-β и играющего ключевую роль в ангиогенезе) на мембране ММСК костного мозга (рис. 1А, 1Г) и CD90 (адгезивная



молекула, участвующая в межклеточном взаимодействии, а также взаимодействии между клетками и внеклеточным матриксом) на ММСК жировой ткани (рис. 13, 1Л) на фоне отсутствия изменений в экспрессии CD44 (интегральный клеточный гликопротеин, играющий важную роль в межклеточных взаимодействиях, клеточной адгезии и миграции) по сравнению с аналогичными показателями ММСК (рис. 1В, 1И), культивируемых в условиях нормоксии (рис. 1Е, 1М).

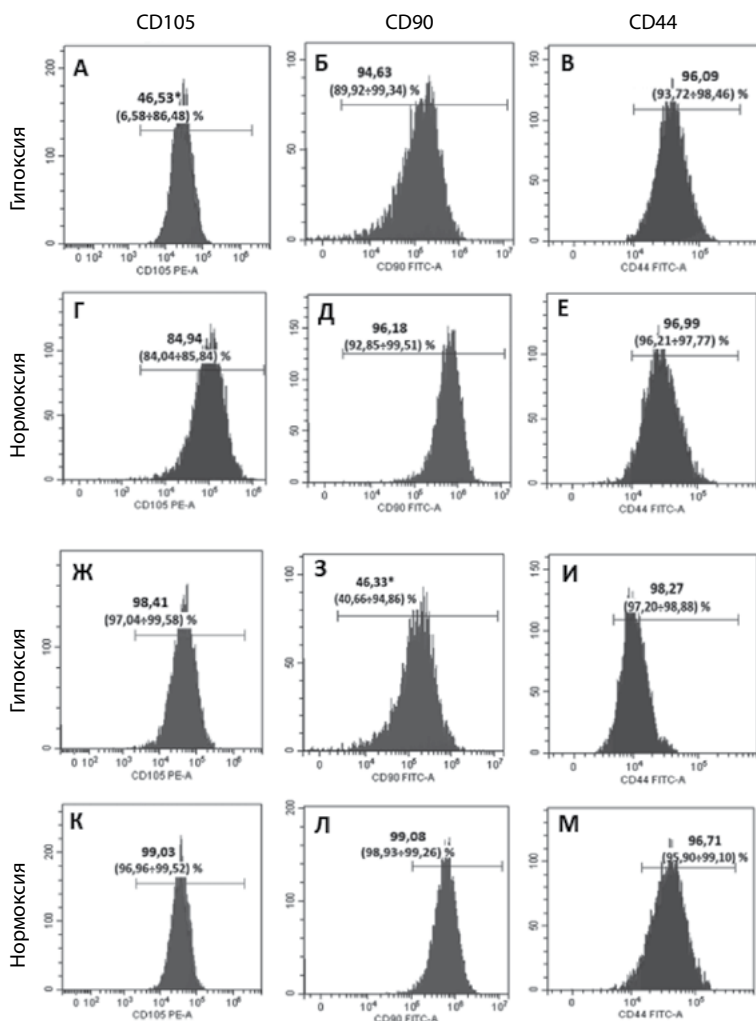


Рис. 1. Уровень экспрессии маркеров ММСК костного мозга и жировой ткани в условиях гипоксии и нормоксии

Примечание: * $p < 0,05$, статистически значимые различия указаны по сравнению с нормоксией.

Fig. 1. The level of expression of MMSCs markers of bone marrow and adipose tissue under conditions of hypoxia and normoxia

Уровень экспрессии негативных маркеров CD45 (гематопоэтический маркер, регулятор роста и дифференцировки клеток) и CD34 (молекула клеточной адгезии) на ММСК варьировал от 0,00 до 1,00% и не зависел от условий культивирования клеточных культур.

Согласно данным литературы, экспрессия эндоглина на ММСК опосредует передачу сигналов от TGF- β в контроле хондрогенной дифференцировки ММСК, а также взаимодействие между ММСК и кроветворными клетками в микроокружении костного мозга, в связи с чем его снижение может влиять на пролиферацию и дифференцировку клеток, развитие кровеносных сосудов [8].

CD90 играет роль в адгезии клеточного матрикса и межклеточной адгезии между медиаторами воспаления, иммунного ответа, обеспечивает адгезию лейкоцитов и моноцитов к эндотелиоцитам и фибробластам, опосредует регенерацию нервов, рост дендритов и аксонов нервов, восстановление тканей в результате воспаления.

CD44 функционирует как рецептор для гиалуроновой кислоты и многих других компонентов внеклеточного матрикса, а также кофактор для факторов роста и цитокинов, в связи с чем CD44 является платформой, которая интегрирует сигналы клеточной микросреды, факторов роста и цитокинов, передает их мембраносвязанным белкам цитоскелета или ядру для регулирования различных уровней экспрессии генов, связанных с адгезией клеточного матрикса, миграцией клеток, пролиферацией, дифференцировкой и выживанием [5].

В работе Andreeva и соавт. установлено, что пониженное содержание кислорода (5% по сравнению с окружающим – 20%) в культуральной среде не оказывало никакого влияния на иммунофенотип стромальных клеток [20]. Kwon и соавт. выявили пониженную экспрессию положительных маркеров CD44, CD73, CD90 и CD105 на ММСК при гипоксическом состоянии и пониженную экспрессию отрицательных маркеров CD31, CD34, CD45, что согласуется с полученными данными [7].

Изменение экспрессии маркеров CD105 и CD90 может являться возможной причиной угнетения ангиогенеза и репаративных свойств ММСК. В связи с этим определение уровня экспрессии поверхностных маркеров ММСК способствует установлению функциональных свойств ММСК и может определять выбор области применения в клеточной терапии.

Влияние гипоксии на ростовые факторы ММСК

Принимая во внимание выявленные изменения в фенотипе ММСК в условиях гипоксии, для определения функционального состояния клеточных культур проведена оценка синтеза ангиогенного фактора (VEGFR2) и факторов репарации (PDGF-D, MMP3, FGF2) в супернатантах культур ММСК костного мозга и жировой ткани.

Установлено увеличение синтеза VEGFR2 в культуре ММСК костного мозга и жировой ткани в условиях дефицита O₂ при культивировании на протяжении 72 ч. относительно аналогичных культур ММСК в условиях нормального уровня кислорода ($p < 0,05$) (рис. 2А, 2Б). Интенсивность стимуляции VEGFR2 была более выраженной в культурах ММСК, полученных из жировой ткани ($SI=15,5$), по сравнению с ММСК из костного мозга.

Выявлено повышение продукции PDGF-D в культуре ММСК костного мозга в условиях отсутствия кислорода при культивировании в течение 48 ч. относительно ММСК, культивируемых при нормальном уровне O₂ ($p < 0,05$). Аналогично



при культивировании ММСК костного мозга и жировой ткани в условиях гипоксии в течение 72 ч. концентрация PDGF-D увеличивалась в 3 и 1,5 раза соответственно, по сравнению с ММСК, находящимися в условиях нормоксии ($p < 0,05$) (рис. 2В, 2Г).

В гипоксических условиях культивирования ММСК жировой ткани в течение 72 ч. установлено увеличение концентрации MMP3 относительно ММСК, культивируемых в условиях нормального уровня кислорода ($p < 0,05$) (рис. 2Е). Аналогично в культуре ММСК костного мозга в условиях дефицита кислорода наблюдалась тенденция к повышению синтеза MMP3 по сравнению с ММСК, культивируемыми при нормоксии (рис. 2Д).

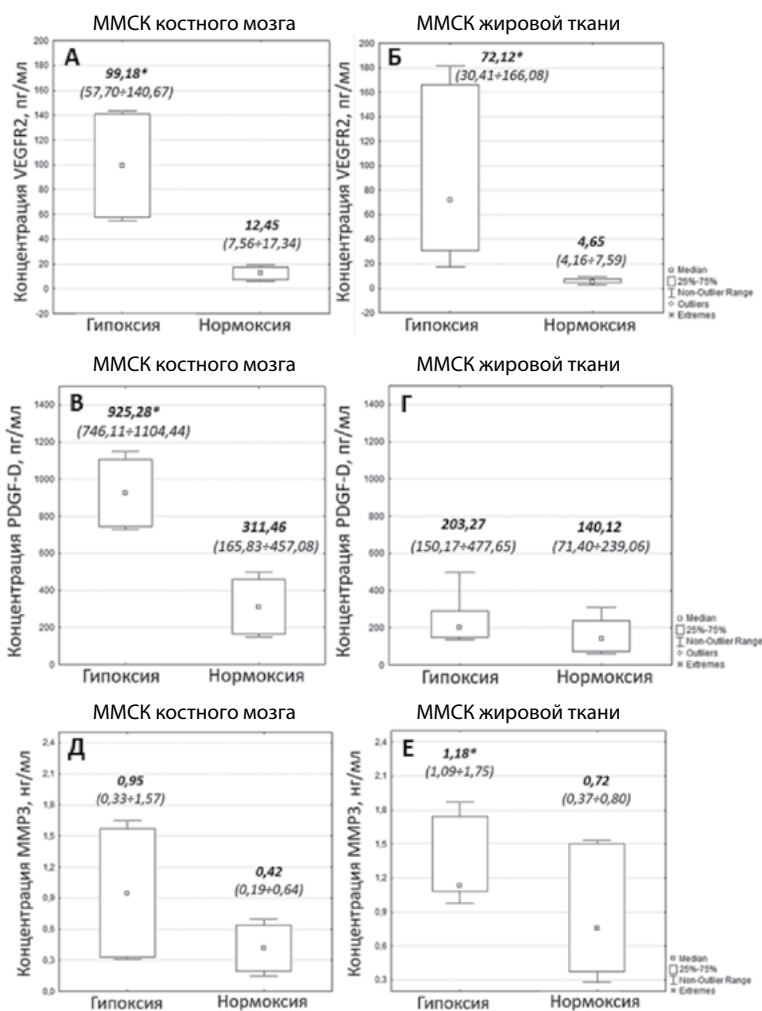


Рис. 2. Продукция ростовых факторов ММСК в условиях гипоксии и нормоксии

Примечание: * $p < 0,05$, статистически значимые различия указаны по сравнению с нормоксией.

Fig. 2. Production of MSCs growth factors in hypoxia and normoxia

Проведена оценка концентрации FGF2 в культуре ММСК, культивируемых в условиях гипоксии и нормоксии, и установлено, что различная концентрация кислорода не оказывала влияния на синтез FGF2.

Таким образом, изменение фенотипа ММСК отражает функциональные особенности культур в условиях гипоксии, а именно снижение экспрессии маркера CD90 ММСК жировой ткани сопровождается угнетением репарационных свойств за счет потери межклеточных контактов, а снижение экспрессии маркера CD105 ММСК костного мозга приводит к нарушению ангиогенеза вследствие изменения передачи сигналов от TGF- β .

Влияние гипоксии на продукцию цитокинов ММСК

Цитокины принимают участие в регуляции пролиферативных процессов, процессов дифференцировки, роста, деятельности клеток. Количественное содержание цитокинов и их соотношение отражают динамику патологического процесса, коррелируют с активностью заболевания, что позволяет судить об эффективности проводимой терапии [9]. В данном исследовании проведена оценка продукции провоспалительного IL-12 в культурах ММСК костного мозга и жировой ткани в условиях гипоксии и нормоксии при культивировании в течение 72 ч. Установлено значительное снижение концентрации IL-12 в культуре ММСК костного мозга в условиях гипоксии относительно ММСК, культивируемых в условиях нормоксии ($p < 0,05$). Выявлено увеличение концентрации IL-12 в культуре ММСК жировой ткани, культивируемых при отсутствии кислорода, относительно культур, культивируемых при нормальном уровне O_2 ($p < 0,05$) (табл. 2).

Концентрация TNF- α в культуре ММСК костного мозга при 1–2%-ном содержании кислорода имела тенденцию к повышению относительно ММСК, культивируемых при условиях нормоксии. Синтез противовоспалительного цитокина IL-10 в культуре ММСК жировой ткани при дефиците O_2 снижался относительно ММСК, культивируемых при нормальном уровне кислорода ($p < 0,05$). Уровень γ IFN в исследуемых группах не определялся.

Таблица 2
Производство цитокинов ММСК в условиях гипоксии и нормоксии
Table 2
Production of MMSCs cytokines under conditions of hypoxia and normoxia

Фактор	Источник ММСК	Гипоксия	Нормоксия	p
IL-10, нг/л	Костный мозг	–	–	–
	Жировая ткань	10,14 (9,86÷10,41)	13,08 (10,82÷15,34)	0,01
IL-12, мкг/л	Костный мозг	1,66 (0,86÷2,46)	7,35 (5,10÷9,60)	0,01
	Жировая ткань	1,52 (1,17÷2,04)	0,93 (0,35÷1,41)	0,04
TNF- α , нг/л	Костный мозг	19,97 (0,00÷39,94)	1,27 (0,00÷2,53)	0,43
	Жировая ткань	–	–	–

Примечание: p – уровень статистической значимости различий по сравнению с нормоксией.

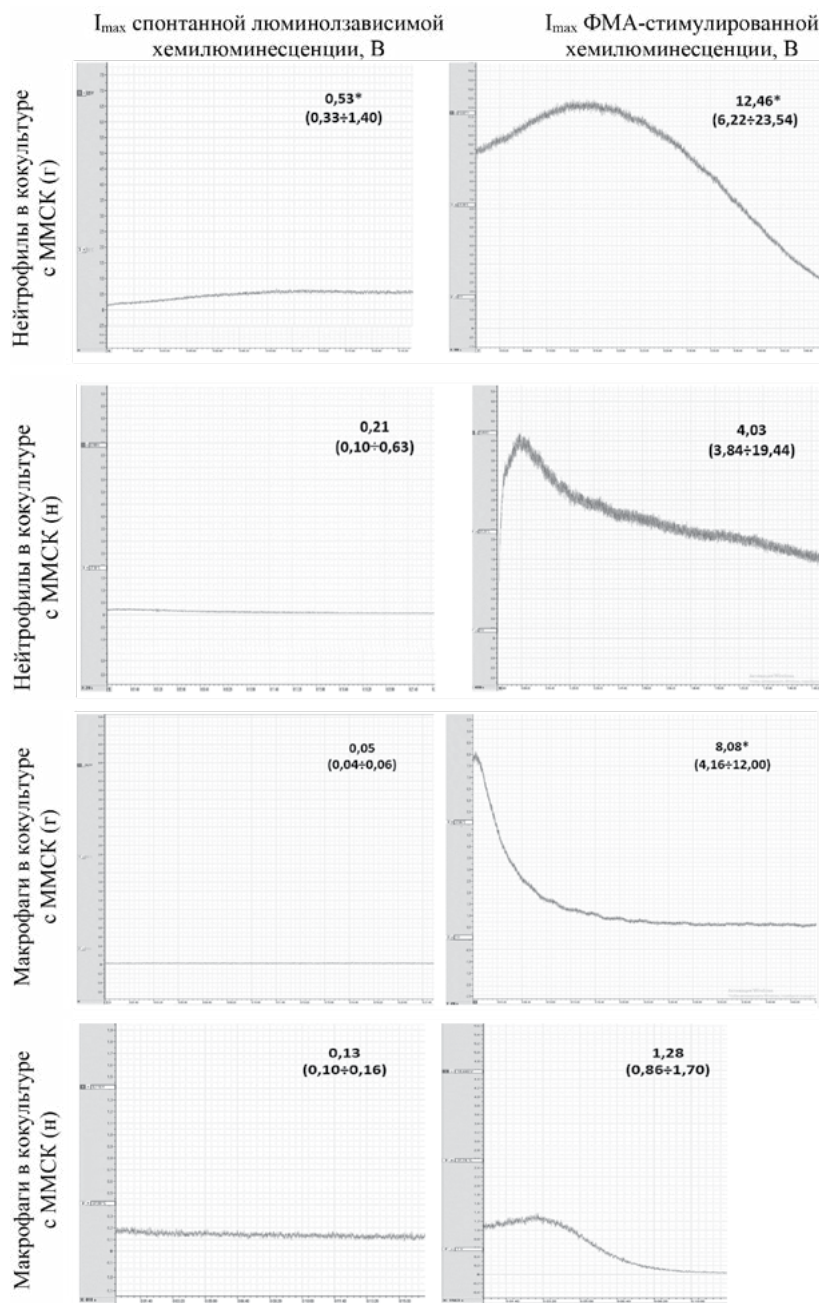


Рис. 3. Хемилюминесцентная активность нейтрофилов и макрофагов в кокультуре с ММСК

Примечания: * p < 0,05, статистически значимые различия указаны по сравнению с нормоксией; ММСК (н) – нормоксические ММСК; ММСК (г) – гипоксические ММСК.

Fig. 3. Chemiluminescent activity of neutrophils and macrophages in co-culture with MMSCs

Согласно Kotas и соавт., синтез TNF- α ММСК в условиях гипоксии приводит к выработке значительного количества белка, индуцируемого геном 6 фактора некроза опухоли (TSG-6). Во всех моделях TSG-6 ингибировал раннюю воспалительную реакцию, и в частности инфильтрацию нейтрофилов и провоспалительные цитокины.

Исследование уровня образования активных форм кислорода и антиоксидантной системы

В кокультуре с гипоксическими ММСК установлено увеличение I_{\max} как спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов, так и ФМА-стимулированной относительно кокультур с ММСК, культивируемыми в условиях нормоксии ($p < 0,05$). В то же время в кокультурах с макрофагами отмечалось повышение ФМА-стимулированной люминолзависимой хемилюминесценции в присутствии гипоксических ММСК относительно ММСК, культивируемых в условиях нормоксии ($p < 0,05$), при отсутствии статистически значимых изменений в спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции макрофагальных фагоцитов (рис. 3).

Таким образом, пробоподготовка ММСК в условиях гипоксии способствует усилению стимулированной хемилюминесцентной активности нейтрофилов и макрофагов. Результаты исследования согласуются с данными Cassatella и соавт., которые показали, что ММСК могут поддерживать и сохранять жизнеспособность и функции фагоцитов за счет согласованного действия эндогенно продуцируемых IL-6 и β IFN, определяющих большинство иммуномодулирующих эффектов.

Влияние гипоксии на антиокислительные факторы ММСК

Проведена оценка уровня антиокислительных ферментов MPO, eNOS, SOD3, каталазы и глутатиона в культуре ММСК в условиях гипоксии и нормоксии. Выявлено, что в условиях гипоксии и нормоксии содержание MPO не изменялось и составило 10,43% (рис. 4А, 4В). MPO является основным элементом нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs) и необходима для их образования, способствует активации протеаз и их высвобождению в ядрах, что приводит к деградации гистонов и деконденсации хроматина. ММСК могут непосредственно ослаблять кислородный взрыв нейтрофилов. Часть антиоксидантного ответа стволовых клеток может зависеть от контакта с клеткой, но паракринная активность, по-видимому, играет фундаментальную роль [10].

Установлено снижение уровня eNOS в культуре ММСК в условиях гипоксии по сравнению с контрольной группой (рис. 4Б, 4Г). eNOS, производная оксида азота (NO), регулирует многие важные функции, включая сосудистый тонус и региональный кровоток, пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, взаимодействие лейкоцитов и эндотелия и тромбоз. eNOS отвечает за выработку NO, который важен для поддержания целостности сосудов и может усиливать васкулогенез посредством передачи сигналов фактора роста фибробластов. VEGFR2 также индуцируется путем синтеза NO, способствуя ангиогенезу [11].

Проведена оценка продукции SOD3 в культурах ММСК костного мозга и жировой ткани в условиях гипоксии и нормоксии при культивировании в течение 72 ч. Установлено значительное увеличение концентрации SOD3 в культуре ММСК костного мозга (рис. 5А) и жировой ткани (рис. 5Б) при условиях гипоксии относительно ММСК, культивируемых в условиях нормоксии ($p < 0,05$). В то же время в условиях

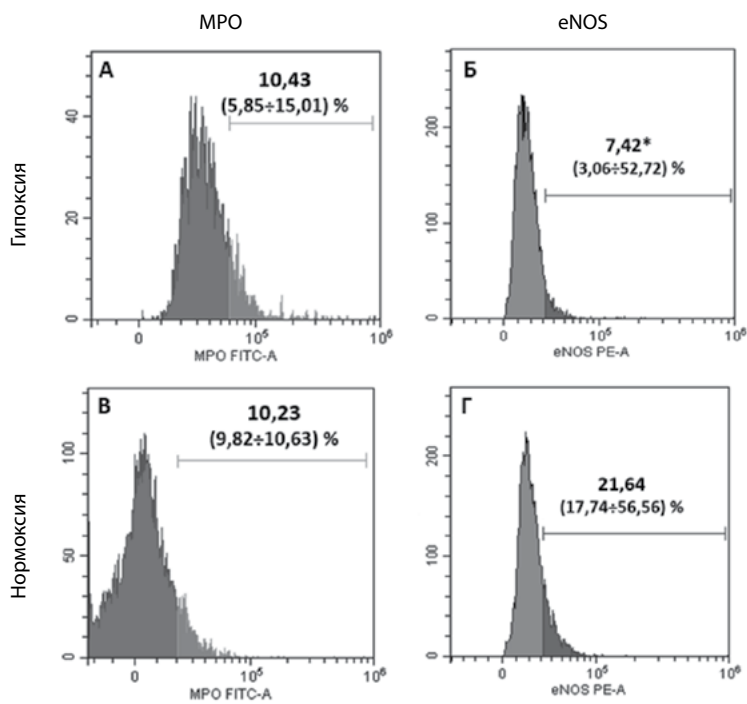


Рис. 4. Уровень синтеза MPO и eNOS MMCK в условиях гипоксии и нормоксии

Примечание: * $p < 0,05$, статистически значимые различия указаны по сравнению с нормоксией.

Fig. 4. The level of synthesis of MPO and eNOS MMSC in hypoxia and normoxia

гипоксии показатели стимуляции SOD3 (SI) по отношению к нормоксии были одинаковыми как в культурах MMCK костного мозга (SI=2,0), так и в культурах MMCK, полученных из жировой ткани (SI=2,3).

SOD3 является одним из антиоксидантных ферментов, который обладает иммуномодулирующими, ангиогенными, антихемотаксическими и противовоспалительными свойствами. Синтезируя перекись водорода, SOD3 может стимулировать образование фактора роста эндотелия сосудов, который стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток, регулирует развитие и формирование кровеносных сосудов, а также увеличивает проницаемость сосудов и хемотаксис эндотелиальных клеток [12].

Установлен уровень каталазы в культуре MMCK, культивируемых в условиях гипоксии и нормоксии (рис. 5B). Каталаза является одним из важнейших антиоксидантных ферментов, который в значительной степени смягчает окислительный стресс, разрушая клеточную перекись водорода с образованием воды и кислорода. MMCK ослабляют окислительный стресс, вызванный активными формами кислорода, и это антиоксидантное действие обусловлено присутствием каталазы в экзосомах. Каталаза

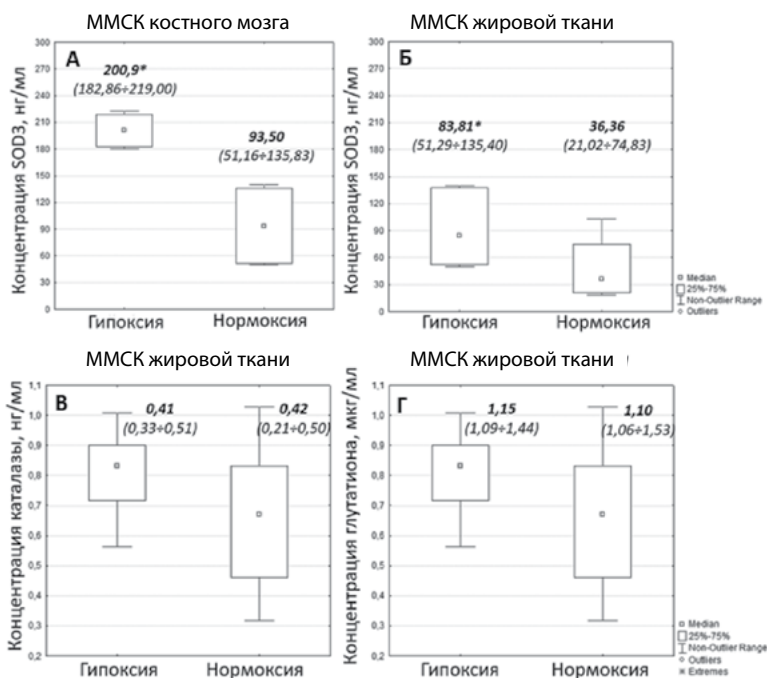


Рис. 5. Уровень синтеза SOD3, каталазы и глутатиона ММСК в условиях гипоксии и нормоксии

Примечание: * $p < 0,05$, статистически значимые различия указаны по сравнению с нормоксией.

Fig. 5. The level of synthesis of SOD3, catalase and glutathione MMSC in hypoxia and normoxia

может присутствовать в растворимой форме в секрете ММСК или адсорбироваться на внешней поверхности экзосом [13].

Определено содержание глутатиона в супернатантах культур ММСК, культивируемых в условиях гипоксии и нормоксии, статистически значимых различий не установлено (рис. 5Г).

Восстановленный глутатион представляет собой низкомолекулярный тиол, осуществляющий разрушение свободных радикалов. Глутатион в восстановленной форме может функционировать как антиоксидант многими способами: химически взаимодействовать с синглетным кислородом, супероксидом и радикалами гидроксила или напрямую разрушать свободные радикалы; стабилизировать мембранную структуру перемещением ацилпероксидов, образующихся путем перекисного окисления липидов. Глутатион является коферментом ряда ферментов, активность которых основана на изменении редокс-потенциала глутатиона [21].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К условиям дефицита кислорода (1–2%) более чувствительны ММСК костного мозга, чем ММСК жировой ткани, что проявлялось изменением морфологии клеток



к 3-м суткам культивирования. Гипоксия способствует снижению экспрессии маркеров CD105 и CD90 на ММСК костного мозга и жировой ткани, соответственно, влияет как на антиоксидантные свойства клеточных культур, так и на синтез факторов роста, участвующих в процессе ангиогенеза, что необходимо учитывать при моделировании иммунопатологических процессов, связанных с окислительным стрессом.

Условия дефицита кислорода повышают продукцию рецептора 2-го типа к VEGF, MMP 3-го типа, PDGF-D, что, соответственно, усиливает репаративные и ангиогенные свойства. Наряду с этим, прекондиционирование клеток в условиях гипоксии способствует снижению продукции провоспалительного IL-12, увеличению противовоспалительного IL-10 и не изменяет уровень синтеза TNF- α и IFN- γ в культурах ММСК, что может использоваться для регуляции воспалительной реакции.

Гипоксия стимулирует синтез SOD3, снижает синтез NO-синтазы и увеличивает синтез активных форм кислорода в культуре с гипоксическими ММСК по сравнению с контрольной группой. В кокультуре клеток врожденного иммунитета с гипоксическими ММСК увеличивается максимальное значение интенсивности хемилюминесценции (I_{max}), как спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов, так и ФМА-стимулированной, относительно кокультур с ММСК, культивируемыми в условиях нормоксии. В кокультурах с макрофагами повышается ФМА-стимулированная люминолзависимая хемилюминесценция в присутствии гипоксических ММСК относительно ММСК, культивируемых в условиях нормоксии, при отсутствии статистически значимых изменений в спонтанной люминолзависимой хемилюминесценции макрофагальных фагоцитов.

ММСК непосредственно влияют на уровень окислительного стресса и тем самым могут уменьшать объем клеточного повреждения, снижать воспаление и модулировать нарушения клеточного метаболизма, что может объяснять их цитопротекторные и противовоспалительные свойства. Среди основных эффектов предполагается прямое удаление свободных радикалов, усиление эндогенной антиоксидантной защиты, иммуномодуляция воспалительной реакции посредством подавления активных форм кислорода, стимуляция клеточного дыхания. Данные антиокислительные эффекты опосредуются не только за счет клеточных контактов, но и при помощи секрета ММСК, включающего ростовые факторы и иммунологические молекулы.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Almeria C., Weiss R., Roy M. Hypoxia Conditioned Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Induce Increased Vascular Tube Formation in vitro. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019;7:1–12. doi: 10.3389/fbioe.2019.00292
2. Bahir B., Choudhery M., Hussain I. Hypoxic Preconditioning as a Strategy to Maintain the Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Regenerative Medicine*. 2022;11:1–15. doi: 10.5772/intechopen.93217
3. Capek J., Rousar T. Detection of Oxidative Stress Induced by Nanomaterials in Cells – The Roles of Reactive Oxygen Species and Glutathione. *Molecules*. 2021;26(4710):1–20. doi: 10.3390/molecules26164710
4. Ferreira J.R., Teixeira G.Q., Santos S.G. Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(2837):1–17. doi: 10.3389/fimmu.2018.02837
5. Kosol W., Kumar S., Marrero-Berrios I. Medium conditioned by human mesenchymal stromal cells reverses low serum and hypoxia-induced inhibition of wound closure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;20:1–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.071
6. Kotas M.E., Matthay M.A. Mesenchymal stromal cells and macrophages in sepsis: new insights. *Eur Respir J*. 2018;51:1–4. doi: 10.1183/13993003.00510-2018
7. Kwon S.Y., Chun S.Y., Ha Y.S. Hypoxia Enhances Cell Properties of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Regen Med*. 2017;12(22):1–10. doi: 10.1007/s13770-017-0068-8
8. Mirshafey A., Asghari B., Ghalamfarsa G. The Significance of Matrix Metalloproteinases in the Immunopathogenesis and Treatment of Multiple Sclerosis. *SQU Medical Journal*. 2014;14(1):13–25. doi: 10.12816/0003332/

9. Murphy M.B., Moncivais K., Caplan A. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & Molecular Medicine*. 2013;45:1–16. doi: 10.1038/emm.2013.94
10. Najar M., Krayem M., Merimi M. Insights into inflammatory priming of mesenchymal stromal cells: functional biological impacts. *Inflammation Research*. 2018;14(22):1–11. doi: 10.1007/s00011-018-1131-1
11. Najar M., Raicevic G., Crompton E. The Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cells: A Story of a Regulatory Network. *J Immunother*. 2016;39(2):45–59. doi: 10.1097/CJI.0000000000000108
12. Neculachi C.A., Burlacu A., Mihai B.P. Inflammation and Hypoxia Negatively Impact the Survival and Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. *Romanian Journal of Cardiology*. 2021;31(3):547–554. doi: 10.47803/rjc.2021.31.3.547
13. Rodriguez-Fuentes D.E., Fernandez-Garza L.E., Samia-Meza J.A. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Archives of Medical Research*. 2021;52:93–101. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.08.006
14. Siegel G., Schafer R., Dazzi F. The Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation*. 2009;87:45–49. doi: 10.1097/TP.0b013e3181a285b0
15. Tao H., Han Z., Han Z.C. Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Stem Cells International*. 2016;11:1–12. doi: 10.1155/2016/1314709
16. Verges S., Chacaroun S., Godin-Ribuot D. Hypoxic conditioning as a new therapeutic modality. *Frontiers in Pediatrics*. 2015;3:1–14. doi: 10.3389/fped.2015.00058
17. Wang T., Jian Z., Baskys A. MSC-derived exosomes protect against oxidative stress-induced skin injury via adaptive regulation of the NRF2 defense system. *Biomaterials*. 2020;257:1–18. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120264
18. Wang X., Bove A.M., Simone G. Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8(59):1–12. doi: 10.3389/fcell.2020.599281
19. Wei F., Li Z., Crawford R. Immunoregulatory role of exosomes derived from differentiating mesenchymal stromal cells on inflammation and osteogenesis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13:1978–1991. doi: 10.1002/term.2947
20. Weiss D.J., English K., Krasnodembskaya A. The Necrobiology of Mesenchymal Stromal Cells Affects Therapeutic Efficacy. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(1228):1–12. doi: 10.3389/fimmu.2019.01228
21. Wu X., Jiang J., Gu Z.X. Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(345):1–16. doi: 10.1186/s13287-020-01855-9
22. Xiong Z., Wang Q., Li W. Platelet-Derived Growth Factor-D Activates Complement System to Propagate Macrophage Polarization and Neovascularization. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:1–16. doi: 10.3389/fcell.2021.686886



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.4.003>



Камилова У.К.✉, Юсупов Д.М., Закирова Г.А., Утемурадов Б.Б.
Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр
терапии и медицинской реабилитации, Ташкент, Узбекистан

Состояние коагуляционного гемостаза и функции эндотелия у реконвалесцентов COVID-19

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Камилова У.К.; сбор материала – Закирова Г.А.; обработка материала и выполнение лабораторных тестов – Утемурадов Б.Б.; статистическая обработка данных – Юсупов Д.М.; написание текста – Камилова У.К., Закирова Г.А.; редактирование – Камилова У.К.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках прикладного исследования MRB-2021-522 «Разработка алгоритма и мобильного приложения оценки кардиоваскулярного риска у реконвалесцентов COVID-19» (2022–2023 гг.).

Подана: 26.04.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: umida_kamilova@mail.ru

Резюме

Введение. Пандемия COVID-19 ставит глобальные задачи перед системой здравоохранения всего мира; среди них особенно актуальны ранняя диагностика, эффективность лечения, профилактика осложнений, реабилитация и организация вакцинации. В последние годы ряд исследований были посвящены изучению влияния характера и механизмов развития COVID-19 на сердечно-сосудистую систему. Показана патогенетическая значимость ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), эндотелиальной дисфункции в развитии COVID-19: установлено, что изменение их функционального состояния имеет важное значение в формировании, течении и прогнозе хронической сердечной недостаточности. Полученные данные нашли применение при разработке лечебно-профилактических мероприятий.

Цель. Оценка показателей коагуляционного гемостаза и гуморальных маркеров эндотелиальной дисфункции у реконвалесцентов COVID-19.

Материалы и методы. Проведено исследование 105 реконвалесцентов COVID-19. Пациенты были включены в исследование через 4–6 месяцев после перенесенного COVID-19. Средний возраст обследованных был $51,8 \pm 6,7$ года. Женщины составили 64 (60,95%), мужчины – 41 (39,05%). Состояние гемостаза было оценено по показателям коагулограммы: уровню фибриногена, Д-димеров (определенных иммуноферментным методом). О гуморальных факторах эндотелиальной дисфункции судили по уровню эндотелина-1, фактора фон Виллебранда, тромбомодулина, определенному иммуноферментным методом.

Результаты. В группе пациентов с повышенным уровнем фибриногена (4 г/л) значения показателей гуморальных маркеров эндотелиальной дисфункции были достоверно выше, чем таковые у пациентов с нормальным уровнем фибриногена. Аналогично у пациентов с повышенным уровнем Д-димера эти значения были достоверно выше, чем у пациентов с нормальным уровнем данного показателя. При определении в крови реконвалесцентов COVID-19 уровня фибриногена, Д-димера, эндотелина-1, фактора фон Виллебранда и тромбомодулина установлена прямая корреляция

между ними. Отмечена сильная корреляция между Д-димером и гуморальными факторами: эндотелином-1 ($r=0,88$) и ФФВ ($r=0,61$), а тромбомодулином – умеренная корреляция ($r=0,56$).

Заключение. В крови реконвалесцентов COVID-19 наблюдалось достоверное повышение уровня фибриногена, Д-димера, возрастание показателей маркеров эндотелиальной дисфункции, которое ассоциировалось с особенностями клинического течения заболевания.

Ключевые слова: реконвалесценты COVID-19, показатели гемостаза, маркеры эндотелиальной дисфункции

Kamilova U.✉, Yusupov D., Zakirova G., Utemuradov B.

Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center for Therapy and Medical Rehabilitation, Tashkent, Uzbekistan

State of Coagulation Hemostasis and Endothelial Function in COVID-19 Convalescents

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: the concept and design of the study – Kamilova U.; collection of material – Zakirova G.; material processing and laboratory tests – Utemuradov B.; statistical data processing – Yusupov D.; writing the text – Kamilova U., Zakirova G.; editing – Kamilova U.

Funding. The work was financially supported as part of the applied research MRB-2021-522 "Development of an algorithm and mobile application for assessing cardiovascular risk in COVID-19 convalescents" (2022–2023).

Submitted: 26.04.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: umida_kamilova@mail.ru

Abstract

Introduction. The COVID-19 pandemic poses global challenges for the entire healthcare system of the world, such as early diagnosis, treatment, prevention of complications, rehabilitation and organization of vaccination. In recent years, a number of studies have been devoted to studying the impact of COVID-19 on the cardiovascular system and its pathogenetic mechanisms. The pathogenetic significance of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), endothelial dysfunction in the development of COVID-19, which are important in the formation, course and prognosis of chronic heart failure, as well as in the development of therapeutic and preventive measures, was studied.

Purpose. Evaluation of coagulation hemostasis and humoral markers of endothelial dysfunction in COVID-19 convalescents.

Materials and methods. 105 COVID-19 convalescents were examined. Patients were included in the study after suffering COVID-19 after 4–6 months. The average age of the surveyed was 51.8 ± 6.7 years. Women made up 64 (60.95%), men – 41 (39.05%). Hemostasis indicators were assessed by coagulogram parameters – fibrinogen level, determination of D-dimer by enzyme immunoassay, humoral factors of endothelial dysfunction – endothelin-1, von Willebrand factor (VWF), thrombomodulin by enzyme immunoassay.

Results. In the group of patients with elevated fibrinogen levels (more than 400 mg/dl), these values were significantly higher in terms of humoral markers of endothelial



dysfunction than in patients with normal fibrinogen levels. Similarly, in patients with elevated levels of D-dimer, these values were significantly higher than in patients with normal levels of this indicator. When studying the levels of fibrinogen and D-dimer in the blood of COVID-19 convalescents, a direct correlation between them was established in relation to endothelin-1, VWF and thrombomodulin. There was a strong correlation between D-dimer and humoral factors endothelin-1 ($r=0.88$) and VWF ($r=0.61$), while thrombomodulin had a moderate correlation ($r=0.56$).

Conclusion. In the blood of COVID-19 convalescents, there was a significant increase in the level of fibrinogen and D-dimer. In COVID-19 convalescents, an increase in the level of markers of endothelial dysfunction was associated with indicators of the clinical course and indicators of fibrinogen and D-dimer.

Keywords: COVID-19 convalescents, hemostasis indicators, markers of endothelial dysfunction

■ ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19 ставит глобальные задачи перед системой здравоохранения всего мира; среди них особенно актуальны ранняя диагностика, эффективность лечения, профилактика осложнений, реабилитация и организация вакцинации [1, 2]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), «пандемия инфекции, вызванная новым штаммом коронавируса – SARS-CoV-2, привела к стремительному росту числа заболевших и высокой смертности во всем мире...» Наряду с поражением органов дыхания при COVID-19 установлено, что важными прогностическими критериями его течения являются возраст пациента, наличие сердечно-сосудистых и других сопутствующих заболеваний [2, 3]. По данным многоцентровых исследований, смертность пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями при COVID-19 высока, что делает актуальной задачу совершенствования методов объективной оценки клинико-функциональных процессов у них, а также разработки методов прогнозирования развития болезни [4]. Исследования по оценке клинического течения заболевания, осложнений, особенностей клинико-функциональных особенностей коморбидных состояний у пациентов с COVID-19 ориентируются на выявление новых сторон этиопатогенеза, раскрытых на основе оценки показателей специфических биомаркеров и молекулярно-генетических факторов; проводятся научные исследования по разработке методов раннего выявления и прогнозирования риска осложнений заболевания [5, 6]. Прямое и не прямое повреждение эндотелиальных клеток SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19 повышает активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), в силу чего возрастает риск ухудшения течения заболевания и развития неблагоприятного прогноза [7, 8]. В многоцентровом когортном исследовании повышенные уровни биомаркеров эндотелиальной дисфункции, гормонов РААС у пациентов с COVID-19 были связаны с повышенным риском смерти и неблагоприятным прогнозом [9].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка показателей коагуляционного гемостаза и гуморальных маркеров эндотелиальной дисфункции у реконвалесцентов COVID-19.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках проведенного исследования были обследованы 105 реконвалесцентов COVID-19. Пациенты были включены в исследование через 4–6 месяцев после перенесенного COVID-19. Средний возраст обследованных был $51,8 \pm 6,7$ года. Женщины составили 64 (60,95%), мужчины – 41 (39,05%). Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1. В обследование не включались пациенты с острыми нарушениями мозгового кровообращения (ОНМК), перенесенным ОНМК, сахарным диабетом (тяжелого течения) и инсулинозависимым СД, хроническими обструктивными заболеваниями легких, аритмиями высоких градаций, тяжелыми заболеваниями печени и почек. У всех реконвалесцентов COVID-19 был тщательно собран анамнез с учетом кардиоваскулярных факторов риска, были проанализированы выписки из истории болезни по лечению COVID-19 с представленными в них сведениями о течении заболевания, степени поражения легких по данным мультиспиральной компьютерной томографии, проведенной терапии. При оценке кардиоваскулярных рисков было установлено, чтоотягощенная наследственность была у 100 (95,24%) обследованных, ожирение – у 40 (38,09%), гиподинамия – у 97 (92,38%), дислипидемия – у 72 (68,5%), курение – у 29 (27,61%), артериальная гипертензия (АГ) – у 100 (95,2%). У 42 (40%) обследованных установлена ишемическая болезнь сердца (ИБС), при этом II функциональный класс (ФК) – у 40 (38,10%) и III ФК – у 2 (1,90%). Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) определена у 68 (64,76%) обследованных. Их распределение, по данным теста с 6-минутной ходьбой, на ФК показало, что I ФК наблюдался у 15 (14,29%), II ФК – у 33 (31,4%) и III ФК – у 20 (19,05%). Фибрилляция предсердий установлена у 1 (0,95%) обследованного.

Лабораторные исследования включали в себя постановку общего анализа крови, коагулограммы, определение иммуноферментным методом Д-димера (АО «Вектор-Бест», Россия), высокочувствительного С-реактивного белка (СРБ) (Demeditec Diagnostics, Германия), эндотелина-1 (Elabscience, США), фактора фон Виллебранда (ФФВ) (Elabscience, США), тромбомодулина (Elabscience, США).

Полученные при исследовании данные были подвергнуты статистической обработке на персональном компьютере Pentium-IV с помощью программного пакета Microsoft Office Excel-2019, включая использование встроенных функций статистической обработки. Использовались методы вариационной параметрической и непараметрической статистики с расчетом среднего арифметического изучаемого показателя (M), стандартного отклонения (SD), относительных величин (частота, %); статистическая значимость полученных измерений при сравнении средних величин определялась по критерию Стьюдента (t) с вычислением вероятности ошибки (P). Сравнение 3 и более независимых групп проводилось однофакторным анализом вариаций ANOVA. За статистически значимые изменения принимали уровень достоверности $p < 0,05$. Для выявления наиболее достоверных показателей определяли наличие корреляционной зависимости между ними. При этом взаимоотношения обозначали как имеющие сильную связь при $r = 0,6-1$, умеренную – при $r = 0,3-0,6$, слабую – при $r < 0,3$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В крови реконвалесцентов COVID-19 наблюдалось достоверное повышение уровня высокочувствительного СРБ, фибриногена и Д-димера. Высокочувствительный



СРБ составил $6,03 \pm 0,88$ г/л, фибриноген – $398,71 \pm 8,14$ мг/дл, Д-димер – $214,55 \pm 4,73$ мкг/л, тогда как у пациентов с ИБС уровень высокочувствительного СРБ увеличился в 2 раза, составляя $12,8 \pm 0,70$ г/л ($p < 0,01$), концентрация уровня фибриногена и Д-димера увеличилась на 13,4% и 31%, составляя $503,6 \pm 9,6$ мг/дл и $248,72 \pm 8,03$ мкг/л соответственно (табл. 1). Отмечено, что уровень СРБ ($p < 0,05$), высокочувствительного СРБ ($p < 0,001$), фибриногена ($p < 0,01$) и Д-димеров ($p < 0,01$) в крови реконвалесцентов COVID-19 с ИБС и ХСН был достоверно выше, чем в общей группе обследованных. При этом соответствующие показатели у пациентов с ХСН составили: высокочувствительный СРБ – $25,6 \pm 4,17$ г/л ($p < 0,001$); фибриноген – $568,6 \pm 10,3$ мг/дл ($p < 0,01$); отмечено увеличение количества Д-димера в 2 раза – $13,4 \pm 0,42$ мкг/л ($p < 0,01$).

Изучение показателей воспаления (стенки сосудов) и коагуляционного гемостаза у реконвалесцентов COVID-19 в зависимости от встречаемости факторов кардиоваскулярного риска у 1 лица показало, что уровень высокочувствительного СРБ у лиц с 3 и 4 факторами риска увеличился почти в 2 раза и составил $13,2 \pm 0,3$ и $14,7 \pm 1,5$ г/л ($p < 0,01$) относительно $7,9 \pm 0,75$ г/л у лиц с 1 фактором риска. Такая же динамика наблюдалась и по отношению к показателям фибриногена и Д-димера: уровень фибриногена и Д-димера достоверно увеличился на 13,4 и 31% у пациентов с 3 факторами риска и на 55,7 и 34,1% у пациентов с 4 факторами риска (табл. 2). У коморбидных пациентов, включенных в регистр АКТИВ и другие исследования, при наличии факторов кардиоваскулярного риска наблюдались более высокие лабораторные показатели воспаления и Д-димера, которые ассоциировались с ростом повторных госпитализаций и летальности в постгоспитальном периоде [10, 11].

Таблица 1
Показатели сосудистого воспаления и коагуляционного гемостаза у реконвалесцентов COVID-19
Table 1

Indicators of inflammation and coagulation hemostasis in COVID-19 convalescents

№	Показатели	Общий (n=105)	АГ (n=100)	ИБС (n=42)	ХСН (n=68)
1	СРБ высокочувствительный (г/л)	$6,03 \pm 0,88$	$10,80 \pm 0,28$	$12,8 \pm 0,70^*$	$13,4 \pm 0,42^*$
2	Фибриноген (мг/дл)	$398,71 \pm 8,14$	$498,1 \pm 8,33$	$503,6 \pm 9,6^*$	$568,6 \pm 10,3^*$
3	Д-димер (мкг/л)	$214,55 \pm 4,73$	$221,6 \pm 4,8$	$248,72 \pm 8,03^*$	$289,8 \pm 6,02^*$

Примечания: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, различия достоверны по сравнению с показателями общей группы.

Таблица 2
Показатели сосудистого воспаления и коагуляционного гемостаза у реконвалесцентов COVID-19 в зависимости от встречаемости факторов риска (X±Sx)
Table 2

Indicators of inflammation and coagulation hemostasis in COVID-19 convalescents depending on the occurrence of risk factors

№	Показатели	1 ФР (n=5)	2 ФР (n=12)	3 ФР (n=45)	4 и более ФР (n=42)
1	СРБ высокочувствительный (г/л)	$7,9 \pm 0,75$	$10,5 \pm 0,61$	$13,2 \pm 0,3$	$14,7 \pm 1,5$
2	Фибриноген (мг/дл)	$383,5 \pm 13$	$503,6 \pm 9,6$	$545,6 \pm 45,9^{**}$	$568,6 \pm 10,3^{**}$
3	Д-димер (мкг/л)	$210 \pm 14,5$	$224,1 \pm 12,58$	$243 \pm 7,78^*$	$274,6 \pm 7,47^*$

Примечания: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, различия достоверны по сравнению с показателями общей группы.

Содержание эндотелина-1, одного из биомаркеров эндотелиальной дисфункции, у реконвалесцентов COVID-19 составляло $90,61 \pm 2,36$ нг/л, у лиц с 1 ФР данный показатель был $80,76 \pm 16,23$ нг/л; с 2 ФР – $88,87 \pm 3,68$ нг/л, с 3 ФР – $89,07 \pm 3,34$ нг/л и 4 ФР – $94,3 \pm 7,49$ нг/л, что было на 29,3% выше по сравнению с лицами с 1 ФР соответственно. Анализ данного параметра в зависимости от наличия ССЗ показал, что у пациентов с ГБ этот показатель составил $91,57 \pm 2,45$, у пациентов с ИБС – $94,21 \pm 4,39$ и ХСН – $99,5 \pm 3,31$ нг/л ($p < 0,01$) (табл. 3).

Показатель ФФВ у лиц, перенесших COVID-19, составил $128,67 \pm 1,76\%$, у лиц с 1 ФР – $117,06 \pm 10,8\%$, с 2 ФР – $124,1 \pm 2,56\%$, с 3 ФР – $129,9 \pm 3,66\%$ ($p < 0,05$) и 4 ФР – $134 \pm 2,67\%$ ($p < 0,01$), что было на 23,5% выше по сравнению с таковым у лиц с 1 ФР соответственно. Анализ данного параметра в зависимости от наличия ССЗ показал, что у пациентов с АГ этот показатель составил $129,2 \pm 1,83\%$, у пациентов с ИБС – $134,43 \pm 2,51\%$ и ХСН – $139,1 \pm 2,17\%$ ($p < 0,05$).

Показатель тромбомодулина у лиц, перенесших COVID-19, составил $1388,5 \pm 18,2$ нг/л, у лиц с 1 ФР – $1351 \pm 69,79$, с 2 ФР – $1365 \pm 38,1$, с 3 ФР – $1410 \pm 26,14$ ($p < 0,05$) и 4 ФР – $1425 \pm 25,5$ ($p < 0,01$), что было на 19,6% выше по сравнению с аналогичными показателями у лиц с 1 ФР соответственно. Анализ данного параметра в зависимости от наличия ССЗ показал, что у пациентов с ГБ этот показатель составил $1393 \pm 18,6$ нг/л, у пациентов с ИБС – $1394,07 \pm 23,9$ и ХСН – $1436 \pm 21,7$ нг/л ($p < 0,05$).

Состояние эндотелиальной функции оценивалось на основании определения содержания эндотелина-1, ФФВ и тромбомодулина и было проанализировано в зависимости от активности воспаления и показателей гемостаза (табл. 4). У пациентов с нормальным содержанием СРБ (менее 6 мг/л) уровень эндотелина-1 составил $86,41 \pm 2,27$ нг/л, ФФВ – $128,67 \pm 1,76\%$ и тромбомодулина – $1384 \pm 14,9$ нг/л ($p < 0,01$), в группе пациентов с повышенным СРБ (более 6 мг/л) эти значения составили для эндотелина-1 $104,71 \pm 4,21$ нг/л ($p < 0,01$), для показателей ФФВ – $140,21 \pm 6,04\%$ ($p < 0,05$) и тромбомодулина – $1424 \pm 16,2$ нг/л ($p < 0,01$).

У пациентов с нормальным уровнем фибриногена (менее 400 мг/дл) показатель эндотелина-1 составил $82,81 \pm 3,12$ нг/л, ФФВ – $122,69 \pm 4,8\%$ и тромбомодулина – $1384 \pm 19,2$ нг/л. В группе пациентов с повышенным уровнем фибриногена (более 400 мг/дл) эти значения были на 28,5% ($p < 0,01$), 23,5% ($p < 0,05$) и 15,7% ($p < 0,05$) соответственно выше, чем у пациентов с нормальным уровнем фибриногена. Аналогично у пациентов с нормальным уровнем Д-димера (менее 0,6 мкг/л) показатель эндотелина-1 составил $85,44 \pm 2,82$ нг/л, ФФВ – $116,78 \pm 5,95\%$ и $1215,9 \pm 24,7\%$, тогда как

Таблица 3
Показатели эндотелиальной функции у реконвалесцентов COVID-19
Table 3
Indicators of endothelial function in COVID-19 convalescents

№	Показатель	Общий, n=105	АГ, n=100	ИБС, n=42	ХСН, n=68
1	Эндотелин-1 (нг/л)	$90,61 \pm 2,36$	$91,57 \pm 2,45$	$94,21 \pm 4,39$	$99,5 \pm 3,31^*$
2	ФФВ (%)	$128,67 \pm 1,76$	$129,2 \pm 1,83$	$134,43 \pm 2,51$	$139,1 \pm 2,17$
3	Тромбомодулин (нг/л)	$1388,5 \pm 18,2$	$1393 \pm 18,6$	$1394,07 \pm 23,9$	$1436 \pm 21,7^*$

Примечания: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, различия достоверны по сравнению с показателями общей группы.



Таблица 4

Показатели эндотелиальной дисфункции в зависимости от уровня СРБ, фибриногена и Д-димера у лиц, перенесших COVID-19

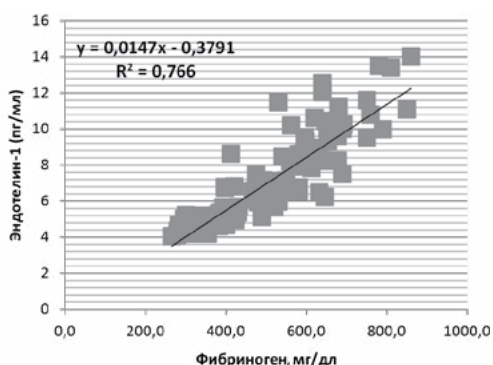
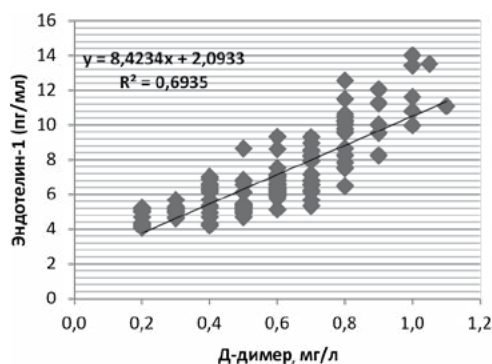
Table 4

Indicators of endothelial dysfunction depending on the level of CRP, fibrinogen and D-dimer in COVID-19 convalescents

Показатели	Эндотелин-1 (нг/л)	ФФВ (%)	Тромбомодулин (нг/л)
СРБ менее 6 мг/л	86,41±2,27	128,67±1,76	1247,5±14,9
СРБ более 6 мг/л	104,71±4,21	140,21±6,04	1424±16,2
Фибриноген менее 400 мг/дл	82,81±3,12	122,69±4,87	1241,9±19,2
Фибриноген более 400 мг/дл	106,41±3,23	151,52±3,06	1436,7±23,8
Д-димер менее 0,6 мкг/л	85,44±2,82	116,78±5,95	1215,9±24,7
Д-димер более 0,6 мкг/л	111,73±3,19	150,36±6,32	1441,7±24,6

в группе пациентов с повышенным уровнем Д-димера эти значения были достоверно выше для эндотелина-1 (на 30,8%, $p < 0,01$), для ФФВ (на 28,7%, $p < 0,01$) и для тромбомодулина (на 18,6%, $p < 0,05$) соответственно, по сравнению с показателями у пациентов с нормальным уровнем Д-димера. В исследованиях показано, что повышенный уровень Д-димера у пациентов, перенесших COVID-19, сохранялся длительно в постковидном периоде и ассоциировался с нарушениями функции эндотелия [12, 13].

При оценке корреляционной связи между показателями гуморальных маркеров эндотелиальной дисфункции и показателями гемостаза (фибриноген и Д-димер) установлена корреляционная связь высокой степени с фибриногеном эндотелина-1 ($r=0,68$) и ФФВ ($r=0,63$) и средней степени – тромбомодулином ($r=0,54$). Указанная корреляционная связь наблюдалась между Д-димером и характеризовалась наличием прямой корреляционной связи с эндотелином-1 ($r=0,71$), ФФВ ($r=0,61$) и тромбомодулином ($r=0,55$) (см. рисунок).



Корреляция уровней фибриногена, Д-димера с маркерами эндотелиальной дисфункции у пациентов, перенесших COVID-19

Correlation of fibrinogen, D-dimer levels with markers of endothelial dysfunction in COVID-19 convalescents

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение последствий перенесенного COVID-19, а также тактики действий в постковидном периоде в настоящее время представляет большую значимость, однако в ходе таких исследований возникает множество спорных и нерешенных вопросов. Согласно определению понятие постковидного синдрома включает в себя признаки и симптомы, развившиеся во время или после перенесенного COVID-19 и продолжающиеся >12 недель, которые не могут быть объяснены другой причиной.

В крови реконвалесцентов COVID-19 наблюдалось достоверное увеличение показателей коагуляционного гемостаза и воспаления, характеризующихся достоверным возрастанием уровней фибриногена и Д-димера, высокочувствительного СРБ. Полученные результаты говорят о целесообразности использования предложенных лабораторных тестов для оценки состояния коагуляционного гемостаза в крови пациентов с угрозой риска осложненного течения ишемической болезни сердца у реконвалесцентов COVID-19: у пациентов с ИБС уровень высокочувствительного СРБ увеличился в 2 раза, составляя $12,8 \pm 0,70$ г/л ($p < 0,01$), уровень фибриногена и Д-димера возрастал на 13,4 и 31%, составляя $503,6 \pm 9,6$ мг/дл и $248,72 \pm 8,03$ мкг/л соответственно.

У реконвалесцентов COVID-19 увеличение уровня параметров эндотелиальной дисфункции ассоциировалось с клиническим течением заболевания и коагуляционного гемостаза и воспаления.

Таким образом, сочетанное использование 3 маркеров эндотелиальной дисфункции – эндотелина-1, фактора фон Виллебранда и тромбомодулина – открывает новые перспективы в исследовании пациентов с коронарной патологией – реконвалесцентов COVID-19.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Amraei R, Rahimi N. COVID-19, Renin-Angiotensin System and Endothelial Dysfunction. *Cells*. 2020;9(7):1652.
2. Canale MP, Menghini R, Martelli E, et al. COVID-19-Associated Endothelial Dysfunction and Microvascular Injury: From Pathophysiology to Clinical Manifestations. *Card Electrophysiol Clin*. 2022;14(1):21–28.
3. Ponti G, Maccaferri M, Ruini C, Tomasi A, Ozben T. Biomarkers associated with COVID-19 disease progression. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2020;57(6):389–399.
4. Andrianto, Al-Farabi MJ, Nugraha RA, Marsudi BA, Azmi Y. Biomarkers of endothelial dysfunction and outcomes in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients: a systematic review and meta-analysis. *Microvasc. Res*. 2021;138:104224.
5. Castanares-Zapatero D, Chalou P, Kohn L, Dauvrin M, et al. Pathophysiology and mechanism of long COVID: a comprehensive review. *Ann Med*. 2022;54(1):1473–1487.
6. Del Turco S, Vianello A, Ragusa R, et al. COVID-19 and cardiovascular consequences: Is the endothelial dysfunction the hardest challenge? *Thromb Res*. 2020;196:143–151.
7. Roy R, McDonough B, O'Gallagher K. COVID-19 and the heart. *Br Med Bull*. 2022;144(1):4–11.
8. Goshua G., Pine A.B., Meizlish M.L., et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet. Haematol*. 2020;7:575–582.
9. Elshazli RM, Toraih EA, Elgami A, El-Mowafy M. Diagnostic and prognostic value of hematological and immunological markers in COVID-19 infection: A meta-analysis of 6320 patients. *PLoS One*. 2020;15(8):e0238160.
10. Arutyunov A.G., Tarlovskaya E.I., Galstyan G.R., Batluk T.I. et al. The impact of BMI on the course of the acute SARS-COV-2 infection and the risks that emerge during the first year after the hospital discharge. Subanalysis evidence of the AKTIV and AKTIV 2 registries. *Problems of Endocrinology*. 2022;68(6):89–109. (in Russian)
11. Li Y, Zhao K, Wei H, Chen W, Wang W, Jia L. Dynamic relationship between D-dimer and COVID-19 severity. *Br J Haematol*. 2020;190(1):e24–e27.
12. Jung F, Krueger-Genge A, Franke RP, Hufert F, Kypper JH. COVID-19 and the endothelium. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2020;75(1):7–11.
13. Leentjens J, van Haaps TF, Wessels PF, Schutgens REG, Middeldorp S. COVID-19-associated coagulopathy and antithrombotic agents-lessons after 1 year. *Lancet Haematol*. 2021;8(7):e524–e533.



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.4.004>

УДК 616.98-022-097:578.834.15ARS-CoV-2:612.017.1(045)



Бельская И.В.¹✉, Амвросьева Т.В.¹, Богуш З.Ф.¹, Поклонская Н.В.¹, Анисько Л.А.²,
Рогачева Т.А.²

¹ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Беларусь

² Городская клиническая инфекционная больница, Минск, Беларусь

Гуморальный иммунитет к SARS-CoV-2 в условиях доминирования разных вариантов вируса

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, обработка, написание текста, серологические исследования, статистические исследования – Бельская И.В.; концепция и дизайн исследования, редактирование – Амвросьева Т.В.; серологические исследования – Богуш З.Ф.; статистические исследования – Поклонская Н.В.; взятие биологического материала, сбор анамнестических данных – Анисько Л.А., Рогачева Т.А.

Подана: 18.08.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: labsanvir@gmail.com

Резюме

Цель. Изучение основных характеристик и особенностей формирования гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 у пациентов с разным анамнезом его приобретения в условиях смены доминирующих геновариантов.

Материалы и методы. Сравнительный анализ серопревалентности к SARS-CoV-2, напряженности и протективности антительного ответа к возбудителю проводили в динамике инфекционного процесса у пациентов с тяжелой формой COVID-19 Wuhan-Hu-1 (n=125) и Omicron (n=164) этиологии. Изучение параметров гибридного гуморального иммунитета осуществляли у вакцинированных лиц, которые спустя 3–11 месяцев после иммунизации перенесли COVID-19, вызванный Delta (n=21) / Omicron (n=17).

Результаты. Постинфекционный гуморальный иммунный ответ, сформированный на SARS-CoV-2 Omicron, был менее выраженным по сравнению с таковым, вызванным геновариантом Wuhan-Hu-1. Это касалось как частоты выявления вирусоспецифических IgG (вплоть до 12 сут., $p < 0,001$), так и их количественных показателей (до 15 сут. – к N-белку, до 30 сут. – к S-белку, $p < 0,005$) в первый месяц от начала проявления клинических симптомов инфекции. Основной вклад в обеспечение различий напряженности постинфекционного антительного ответа к разным геновариантам SARS-CoV-2 вносили группы пациентов старше 65 лет. При этом доля пациентов с COVID-19 Omicron, у которых обнаруживались IgG высокой авидности, значительно превышала частоту регистрации высокоавидных IgG у пациентов с SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 ($p < 0,05$). Анализ гибридного иммунного ответа, сформированного на геновариант Delta или Omicron спустя 3–11 месяцев после первичного антигенного стимула в результате вакцинации, не выявил значимых различий в напряженности ($p = 0,38$) и авидности IgG ($p = 0,21$), выработанных на разные варианты SARS-CoV-2.

Заключение. Полученные результаты указывают на значимость исследований особенностей формирования гуморального иммунного ответа к разным геновариантам

SARS-CoV-2 в условиях происходящей их смены как важного направления системных работ с целью определения адекватной тактики борьбы с COVID-19.

Ключевые слова: варианты SARS-CoV-2, гуморальный иммунитет, вакцинация, авидность

Ina V. Belskaya¹✉, Tamara V. Amvrosieva¹, Zoya F. Bohush¹, Natallia V. Paklonskaya¹, Liudmila A. Anisko², Tamara A. Rogacheva²

¹ Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

² City Clinical Infectious Diseases Hospital, Minsk, Belarus

Humoral Immunity against Different SARS-CoV-2 Variants

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and design of the study, processing, writing the text, serological studies, statistical analysis – Ina V. Belskaya; concept and design of the study, editing – Tamara V. Amvrosieva; serological studies – Zoya F. Bohush; statistical analysis – Natallia V. Paklonskaya; collection of biological material, collection of anamnestic data – Liudmila A. Anisko, Tamara A. Rogacheva.

Submitted: 18.08.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: labsanvir@gmail.com

Abstract

Purpose. To study the humoral immune response to SARS-CoV-2 in patients with different anamnesis under conditions of prevalent variant changes.

Materials and methods. A comparative analysis of seroprevalence, intensity and protection in the dynamics of the infectious disease process was performed in patients with severe COVID-19 Wuhan-Hu-1 (n=125) and Omicron (n=164) etiology. The hybrid immunity study was carried out in vaccinated individuals who underwent COVID-19 Delta (n=21) / Omicron (n=17) 3–11 months after receiving the primary antigenic stimulation.

Results. The post-infection humoral immune response formed against SARS-CoV-2 Omicron was less pronounced than for Wuhan-Hu-1 variant. It was shown both for the detection frequency of virus-specific IgG (up to 12 days, $p<0.001$), and for IgG concentration (up to 15 days – to the N-protein, up to 30 days – to the S-protein, $p<0.005$) 1 month after the onset of disease. The main differences in the intensity of the post-infection antibody response to different SARS-CoV-2 variants were associated with contribution of patients older than 65 years. At the same time, the proportion of patients with COVID-19 Omicron who had high avidity IgG was significantly higher than the frequency of high avidity IgG in patients with SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 ($p<0.05$). Analysis of the hybrid immunity formed against Delta or Omicron variants 3–11 months after the primary antigenic stimulation as a result of vaccination failed to reveal significant differences in the intensity ($p=0.38$) and IgG avidity ($p=0.21$) developed for different variants of SARS-CoV-2.

Conclusion. The present results indicate the importance of humoral immune response to different SARS-CoV-2 variants study in the conditions of their ongoing change as a key area of systematic works regarding strategy development in order to combat COVID-19.

Keywords: SARS-CoV-2 variants, humoral immunity, vaccination, avidity



■ ВВЕДЕНИЕ

Начавшаяся в 2020 г. пандемия COVID-19 явилась неординарным и шоковым событием мирового масштаба, сопровождающимся стремительным ростом заболеваемости и смертности. В пандемический период зарегистрировано более 690 миллионов инфицированных и около 7 миллионов смертей [1]. Несмотря на завершение в мае 2023 г. режима чрезвычайной ситуации по COVID-19, по мнению ведущих экспертов ВОЗ, предстоящие эпидемиологические сезоны ОРВИ и гриппа будут развиваться в условиях сохранения рисков распространения SARS-CoV-2-инфекции, обусловленных появлением новых и быстрой сменой доминирующих геновариантов ее возбудителя.

Возникновение варианта SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) стало первым примером антигенного шифта вируса [2]. Впервые зафиксированный в Южной Африке в ноябре 2021 г., новый вариант вируса быстро дивергировал с образованием 5 основных линий к маю 2022 г. и множества рекомбинантных сублиний, в том числе с ранее доминировавшим вариантом SARS-CoV-2 Delta (линии XE и XF) [3]. Накопление значительного количества аминокислотных замен, в том числе от 26 до 37 локализованных в шиповидном белке геноварианта B.1.1.529 и его нисходящих линий, привело к повышению трансмиссивности SARS-CoV-2 Omicron более чем в 2,5–3,3 раза по сравнению с другими вариантами, вызывающими обеспокоенность (ВВО) [4]. Кроме того, для нового варианта вируса отмечено более чем пятикратное увеличение аффинности связывания рецептор-связывающего домена (РСД) S-белка вируса с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (АПФ-2). Таким образом, антигенная изменчивость привела к утере возможности антител, выработанных в результате предшествующей инфекции или вакцинации, вступать в конкурентные отношения за связывание с РСД S-белка возбудителя [5]. В совокупности с повышенной контагиозностью и способностью ускользать от иммунного ответа геновариант SARS-CoV-2 Omicron быстро распространился в человеческой популяции, вытеснив предшествующие ВВО. Его доминирование привело к полному изменению характерной клинической картины COVID-19 с увеличением числа регистрации легких форм заболевания [6]. Показано, что вероятность госпитализации пациентов, заболевших во время преобладания геноварианта Omicron, была на 25% ниже, по сравнению с таковой у пациентов, инфицированных в период циркуляции предыдущих ВВО [7]. Развитие же тяжелых форм COVID-19 и регистрацию случаев вирус-ассоциированных смертей связывают с чрезмерной реакцией иммунного ответа на контакт с ранее циркулировавшими вариантами SARS-CoV-2 [8]. При текущей стратегии ВОЗ по борьбе с COVID-19, направленной на обеспечение долгосрочной устойчивой профилактики, контроля и лечения инфекции, крайне важным является не только отслеживание новых вариантов SARS-CoV-2, но и исследование различий в формировании противовирусного иммунитета в конкретных условиях их циркуляции. Изучение особенностей развития иммунного ответа на SARS-CoV-2-инфекцию разной этиологии на фоне проводимой вакцинации представляет ценность для понимания эволюционных взаимоотношений между вирусом и хозяином и является основой для определения оптимальной стратегии и тактики принятия адекватных долгосрочных мер защиты населения от COVID-19.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение основных характеристик и особенностей формирования гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 у пациентов с разным анамнезом его приобретения в условиях смены доминирующих геновариантов.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В связи с постоянным появлением новых геновариантов SARS-CoV-2, накопивших значительное количество мутаций в регионах генома, кодирующих аминокислотные последовательности ключевых антигенов, важно изучение в сравнительном аспекте характеристик постинфекционного и гибридного гуморального иммунитета против актуальных возбудителей, циркулирующих в разные периоды регистрации COVID-19.

Установление характера формирования постинфекционного гуморального иммунного ответа к разным геновариантам SARS-CoV-2 осуществляли на основе исследования пациентов, находившихся на стационарном лечении в УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска.

Степень тяжести COVID-19 определяли в соответствии с критериями, установленными Министерством здравоохранения Республики Беларусь (приказ № 615 от 05.06.2020 «Об оказании медицинской помощи пациентам с инфекцией COVID-19», приказы № 20 от 11.01.2022 и № 841 от 22.06.2022 «Об утверждении Рекомендаций (временных) об организации оказания медицинской помощи пациентам с инфекцией COVID-19 и Алгоритмов»).

Контингент пациентов был подразделен на несколько групп.

Группа 1 включала 125 пациентов с тяжелой формой заболевания, возбудителем которого был SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1. Взятие у них биологического материала осуществляли в период с апреля по сентябрь 2020 г., он представлен 599 пробами сыворотки крови. Верификацию этиологического агента SARS-CoV-2-инфекции в данной группе респондентов проводили путем секвенирования гена, кодирующего аминокислотную последовательность его N-белка (1257 п. о.).

В группу 2 были включены 164 пациента с тяжелой формой COVID-19, вызванной геновариантом Omicron, которые ранее не болели COVID-19 и не были вакцинированы. В рамках обследования пациентов данной группы было проанализировано 568 проб сыворотки крови.

Исследование характеристик гибридного иммунитета к разным вариантам SARS-CoV-2 проводили в двух группах лиц (группы 3 и 4), которые получили первичный антигенный стимул в результате вакцинации и спустя 3–11 месяцев (медиана – 6 мес.) перенесли COVID-19. Взятие биологического материала осуществляли на 26–34-е сутки (медиана – 29 сут.) от момента инфицирования.

Группа 3 состояла из 17 пациентов со сформированным гибридным иммунитетом в результате перенесенного COVID-19 Omicron-этиологии после вакцинации «Спутник V» или Vero Cell.

В группу 4 был включен 21 пациент, прошедший вакцинацию препаратом «Спутник V» или Vero Cell и затем получивший дополнительный антигенный стимул в результате инфекции SARS-CoV-2, вызванной геновариантом Delta.



Основные демографические характеристики групп пациентов в рамках изучения постинфекционного и гибридного иммунного ответа
Main demographic characteristics of patient groups in the framework of the post-infection and hybrid immune response study

Параметр оценки	Доля обследованных лиц, %			
	Постинфекционный иммунитет		Гибридный иммунитет	
	Группа 1, Wuhan-Hu-1 (n=125)	Группа 2, Omicron (n=164)	Группа 3, Omicron (n=17)	Группа 4, Delta (n=21)
Возраст				
18–34 года	8,8%	6,1%	5,9%	33,3%
35–49 лет	12%	12,8%	23,5%	23,8%
50–64 года	34,4%	15,9%	11,8%	33,3%
более 65 лет	44,8%	65,2%	58,8%	9,6%
Пол				
женский	54,4%	53,7%	64,7%	76,2%
мужской	45,6%	46,3%	35,3%	23,8%

Идентификацию геновариантов SARS-CoV-2 Omicron и Delta у пациентов групп 3 и 4 осуществляли методом дифференциальной ПЦР в режиме реального времени с использованием набора «Арт-COVID-19-Тест» («АртБиоТех», Беларусь).

Для качественного обнаружения IgG в совокупности с определением уровня серопревалентности к N-белку SARS-CoV-2 использовали наборы «SARS-CoV-2-NP-ИФА-Г» (производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь).

Определение концентрации противовирусных IgG к N-белку патогена (BAU/мл) в пробах сыворотки крови для установления напряженности специфического иммунитета осуществляли с помощью набора реагентов «N-CoV-2-IgG PS» (производства ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Россия).

Для изучения количественных параметров постинфекционного гуморального ответа (BAU/мл), сформированного на S-белок (включая РСД) SARS-CoV-2, использовали набор реагентов «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» (производства «Вектор-Бест», Россия).

Постановку ИФА осуществляли в соответствии с инструкциями производителей.

Установление индекса avidности (ИА) IgG к S-белку вируса проводили согласно схеме серологического тестирования с включением дополнительной ступени обработки хаотропным агентом (5M мочевины). Оценку общей силы связывания проводили после дестабилизации комплекса антиген – антитело в течение 15 минут, измерив долю оставшихся антител. Данный этап был оптимизирован в соответствии с показателями, полученными с использованием набора «SARS-CoV-2 IgG RBD Авидность-ИМБИАН-ИФА» («Имбиан», Россия) на контрольной панели сывороток (n=90). Индекс avidности рассчитывали по формуле: $IA = (OP \text{ в лунке «диссоциации»} / OP \text{ в «интактной» лунке}) \times 100\%$.

Образец считался содержащим IgG «низкой avidности» при ИА $\leq 30\%$, «высокой avidности» – при ИА $\geq 50\%$, «средней avidности» – при ИА 30–50%.

Доверительные интервалы долей определяли по методу Вальда.

Достоверность обнаруживаемых различий оценивали, применяя критерий хи-квадрат с поправкой Йейтса и критерий Фишера (двусторонний).

Анализ количественных параметров проводили с использованием U-критерия Манна – Уитни и коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Силу связи сравниваемых величин определяли по шкале Чеддока.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительное исследование по выявлению постинфекционных анти-SARS-CoV-2 IgG к иммунодоминантным вирусным антигенам в динамике развития инфекционного процесса позволило установить, что в первый месяц от начала проявления клинических симптомов (рис. 1) частота их обнаружения у пациентов группы 1

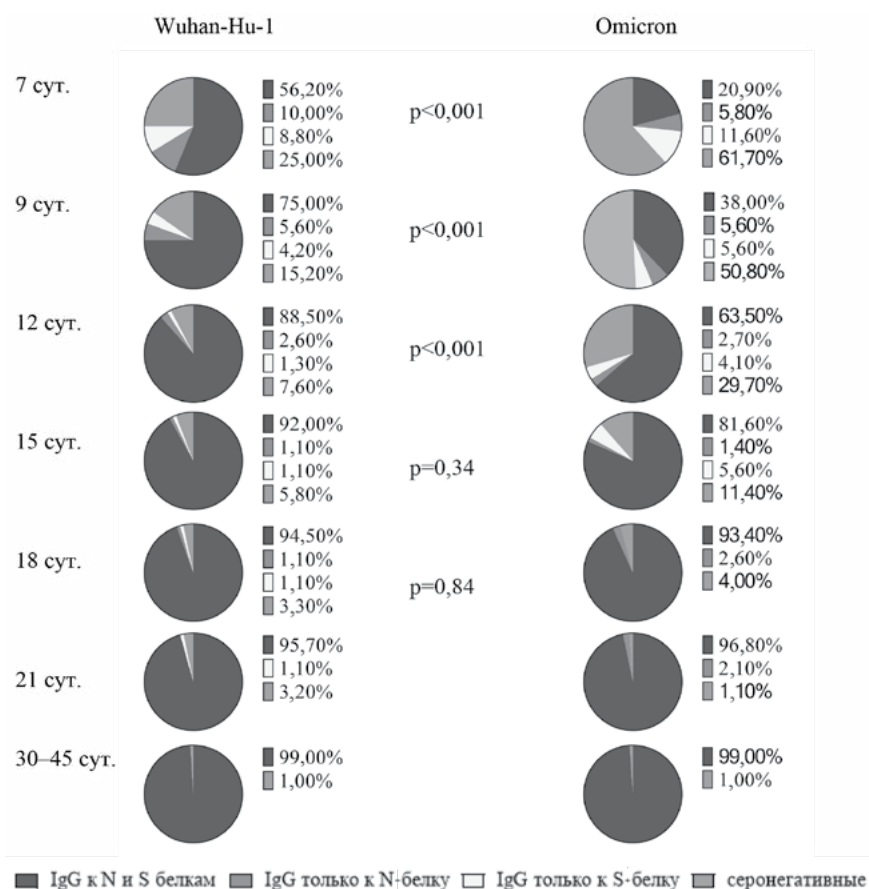


Рис. 1. Кинетика сероконверсии IgG к N- и S-белку возбудителя COVID-19 разной этиологии у пациентов с тяжелой формой заболевания

Fig. 1. Kinetics of IgG seroconversion rate to N and S proteins of different variants of COVID-19 causative agent in severe patients



(возбудитель SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1) уже на 7-е сутки была достаточно высокой и составила 65,0% [54,06%; 74,57%] к S-белку и 66,2% [55,3%; 75,7%] к N-белку возбудителя при общей достигнутой серопревалентности 75,0% [64,45%; 83,26%]. Во второй группе пациентов (возбудитель SARS-CoV-2 Omicron) показатель серопревалентности к двум основным антигенам в этот период был значительно ниже (в 2–2,5 раза, $p < 0,001$), достигнув сопоставимых значений только на 15-е сутки от начала заболевания ($p = 0,34$). К завершению периода наблюдения (1,5 мес.) доля серопозитивных пациентов обеих групп обследованных лиц составила 99%.

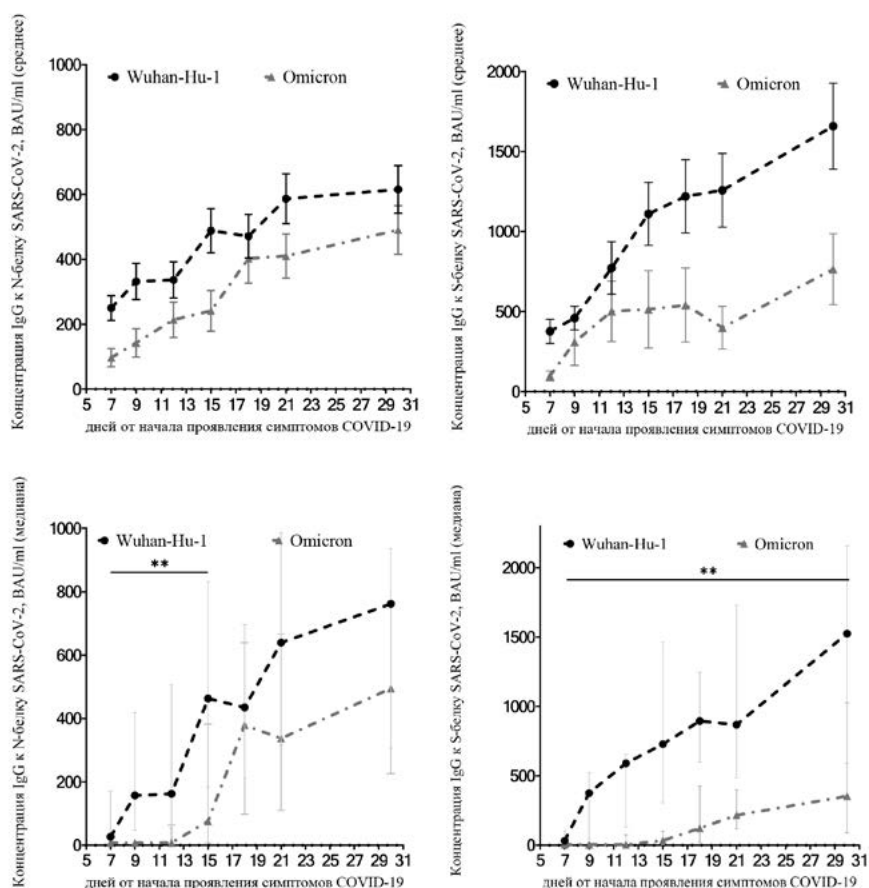


Рис. 2. Мониторинг напряженности антительного ответа к иммунодоминантным белкам SARS-CoV-2 у пациентов с тяжелой формой COVID-19 разной этиологии

Примечания: ** $p < 0,005$; для средних показателей концентрации диапазон значений отражает стандартную ошибку среднего, для медианы концентрации – 95%-ный доверительный интервал.

Fig. 2. Monitoring of the strength of the antibody response to immunodominant SARS-CoV-2 proteins in patients with severe COVID-19 of various etiology

При динамическом наблюдении показателей напряженности постинфекционного гуморального иммунитета (рис. 2) через месяц после начала заболевания установлены их достаточно высокие значения: в группе пациентов с COVID-19 Wuhan-Hu-1-этиологии медианная концентрация IgG к S-белку составила 1525,5 BAU/ml, к N-белку – 762 BAU/ml; у пациентов с Omicron-ассоциированной инфекцией она фиксировалась на значениях 354 BAU/ml и 495 BAU/ml к S- и N-белку соответственно. При этом значимые различия в напряженности сформированного иммунитета по IgG к S-белку к разным геновариантам SARS-CoV-2 наблюдались на протяжении всего периода наблюдения, а к N-белку – в течение первых двух недель. Пороговое значение концентрации сывороточных антител, равное 300 BAU/ml, свидетельствующее, по мнению специалистов, о формировании достаточно устойчивого противовирусного иммунитета, было достигнуто в двух группах пациентов.

Как известно, возрастной и половой факторы могут вносить определенный вклад в течение COVID-19 и дальнейший исход заболевания [9]. Риск развития тяжелой формы инфекции часто сопряжен с пожилым возрастом и мужским полом, женский организм отличается повышенной продукцией иммуносупрессивного ИЛ-10. Являясь одним из превентивных факторов развития неадекватно высокого иммунного ответа на инфекционный агент, он потенциально может обусловить гендерные различия в продукции вирусоспецифических антител [10]. В выполненных нами исследованиях анализ роли данных факторов проводили на 12–18-е сутки от начала проявления клинических симптомов инфекции. Установлено, что основной вклад в обеспечение различий напряженности постинфекционного антительного ответа к разным геновариантам SARS-CoV-2 вносили группы пациентов старше 65 лет (рис. 3А). Внутригрупповой анализ влияния данного фактора позволил выделить пациентов 35–49 лет среди группы переболевших COVID-19 Wuhan-Hu-1-этиологии, в которой регистрировалась сниженная медианная концентрация противовирусных IgG к N- и S-белку ($p=0,043$). В целом же с увеличением возраста прослеживалась тенденция повышения уровней анти-SARS-CoV-2-антител.

Анализ влияния гендерных различий на напряженность иммунного ответа к разным геновариантам SARS-CoV-2 не позволил установить значимого вклада любого из полов в регистрируемый медианный показатель концентрации IgG как к N-белку, так и к S-белкам в пределах групп пациентов с COVID-19 этиологии Wuhan-Hu-1 и Omicron (рис. 3В). Медианный показатель концентрации IgG к S-белку геноварианта Wuhan-Hu-1 у пациентов мужского пола составил 480,0 BAU/ml, у пациентов женского пола – 587,0 BAU/ml. Медиана концентрации IgG регистрировалась на уровне 93,51 BAU/ml у лиц мужского пола и 51,0 BAU/ml – у лиц женского пола при SARS-CoV-2 Omicron-индуцированном синтезе вирусоспецифических антител. Аналогичная закономерность наблюдалась в отношении медианного показателя IgG к N-белку разных геновариантов вируса.

Все представленные данные свидетельствуют о том, что антительный ответ, индуцированный геновариантом Omicron, был менее выраженным по сравнению с таковым, вызванным геновариантом Wuhan-Hu-1. Это касалось как частоты выявления вирусоспецифических IgG, так и их количественных показателей в первый месяц от начала проявления клинических симптомов инфекции.

Как известно, одним из весьма актуальных вопросов настоящего времени является выбор наиболее подходящего геноварианта SARS-CoV-2 для его использования

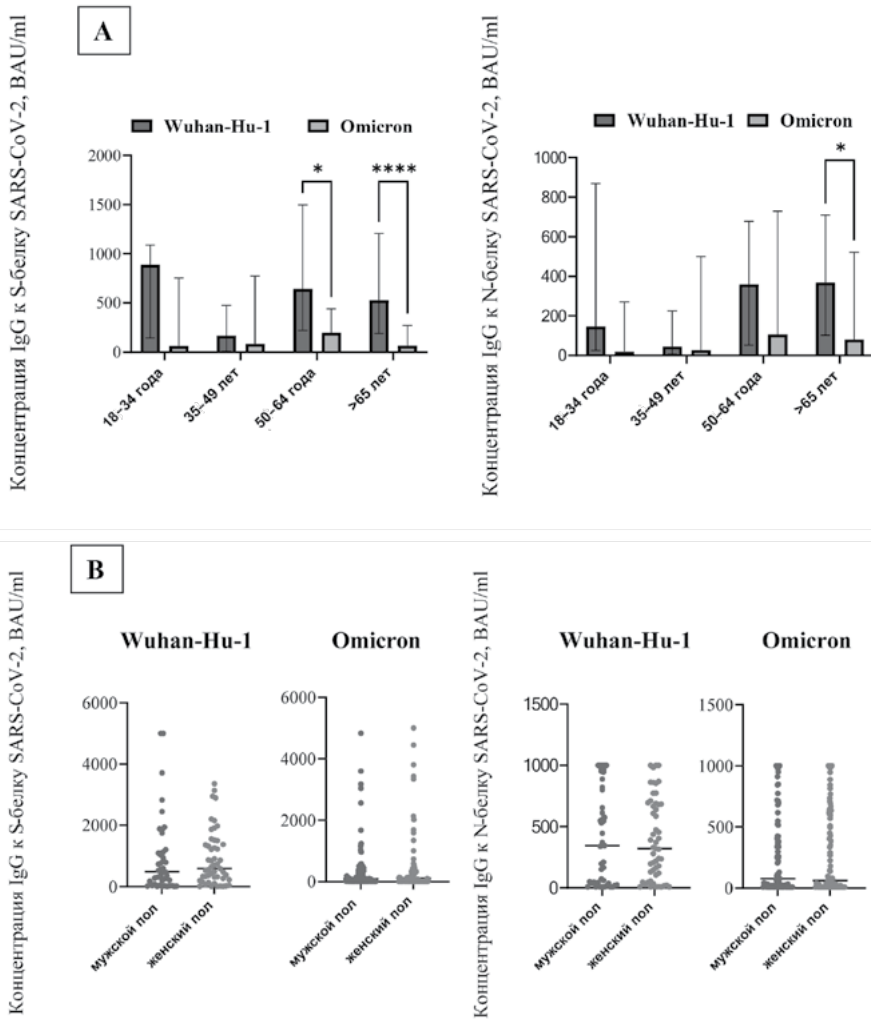


Рис. 3. Напряженность иммунного ответа у пациентов с COVID-19 разной этиологии в «разрезе» возрастного фактора (А) и гендерных различий (В)

Примечания: * $p < 0,0073$; **** $p < 0,0001$; диапазон значений отражает межквартильный размах.

Fig. 3. The intensity of the immune response in patients with COVID-19 of various etiology associated with age (A) and gender differences (B)

в качестве основы при создании новых средств вакцинопрофилактики. В условиях полного доминирования в человеческой популяции разных линий Omicron его сниженная способность индуцировать продукцию вирусоспецифических IgG, по сравнению с предыдущими ВВО, остается предметом научных дискуссий, касающихся протективных свойств кандидатного вакцинного штамма, которые зависят

не только от количества образовавшихся противовирусных антител, но и от силы их связывания с возбудителем. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о более высокой силе связывания продуцируемых в ответ на SARS-CoV-2 Omicron IgG со специфическим антигеном, несмотря на более низкие их количественные параметры, по сравнению с таковыми, регистрируемыми у пациентов, зараженных Delta-геновариантом [11]. Данную силу связывания IgG отражает показатель avidности. Соответственно, чем выше avidность циркулирующих противовирусных IgG, тем выше их способность вступать в конкурентные отношения с клеточным рецептором АПФ-2 за связывание с антигеном SARS-CoV-2. При более чем 5-кратном увеличении константы связывания РСД Omicron с АПФ-2 по сравнению с ранее циркулирующими геновариантами логично предположить, что антитела, сформированные на предшествующие варианты, будут эффективными в нейтрализации возникающих новых возбудителей только при высоком индексе их avidности. В подтверждение данного предположения было показано, что Omicron-индуцированные IgG обладают высокой кросс-реактивностью с антигенами предыдущих ВВО, но не наоборот [11].

Проведенное нами в рамках настоящей работы исследование avidности к S-белку IgG, образованных в ответ на инфицирование геновариантами SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 или Omicron, подтвердило данные предположения (рис. 4). Так, спустя 30 сут. от начала заболевания в группе пациентов с иммунным ответом, сформированным на SARS-CoV-2 Omicron, доля пациентов (36,9% [19,1%; 59,1%]), у которых обнаруживались IgG высокой avidности, значительно превышала частоту регистрации высокоавидных IgG у пациентов с SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 ($p < 0,05$).

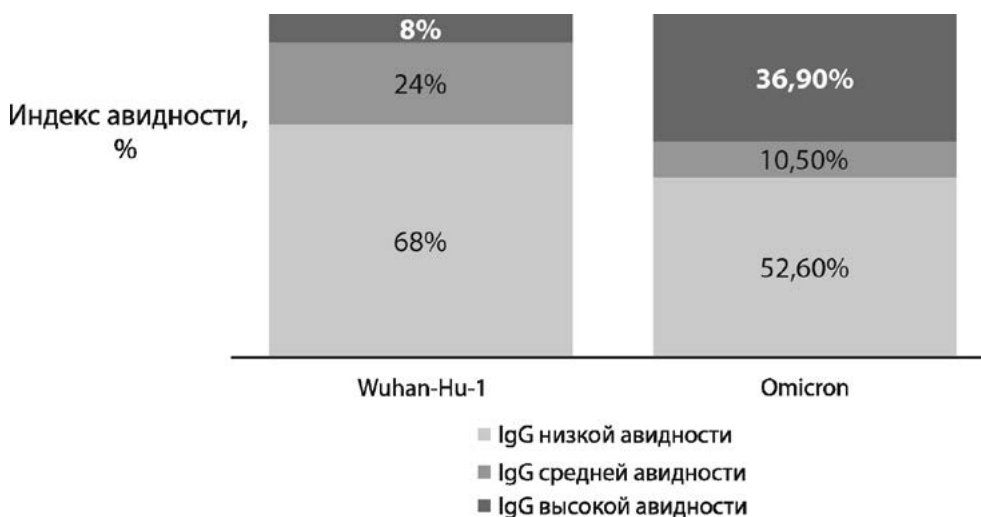


Рис. 4. Регистрируемые уровни ИА анти-SARS-CoV-2 IgG в группах обследуемых пациентов с тяжелой формой COVID-19 Wuhan-Hu-1 и Omicron этиологии

Fig. 4. Recorded levels of anti-SARS-CoV-2 IgG AI in groups of examined patients with severe COVID-19 Wuhan-Hu-1 and Omicron etiology



При анализе напряженности гибридного гуморального иммунного ответа, а также avidности противовирусных IgG, выработанных в ответ на вторичный антигенный стимул в результате SARS-CoV-2-инфекции (спустя 26–34 дня), обусловленной Delta или Omicron геновариантами, не было выявлено значимых различий в двух обследованных группах пациентов (рис. 5). Так, медиана концентрации в группе 4, где пациенты получили бустерный антигенный стимул в результате SARS-CoV-2 Delta инфекции, составила 4475 BAU/ml, в случае Omicron-обусловленной бустеризации (в группе 3) – 3973 BAU/ml. В двух группах лиц с гибридным иммунитетом отмечался высокий медианный индекс avidности (Delta – 97%, Omicron – 94%), что свидетельствовало о формировании протективного иммунного ответа независимо от этиологического агента COVID-19. Следует особо отметить, что в данных группах наблюдения регистрировались как высокие количественные показатели содержания противовирусных IgG и их avidности, так и крайне низкие, что говорит об индивидуальном характере формирования гибридного протективного иммунного ответа к SARS-CoV-2. Вместе с тем, как показали ранее выполненные нами исследования, для лиц со сформированным гибридным иммунитетом была характерна сильная корреляционная связь между показателем концентрации и индексом avidности (для Delta – 0,87, для Omicron – 0,9) [12, с. 6–15].

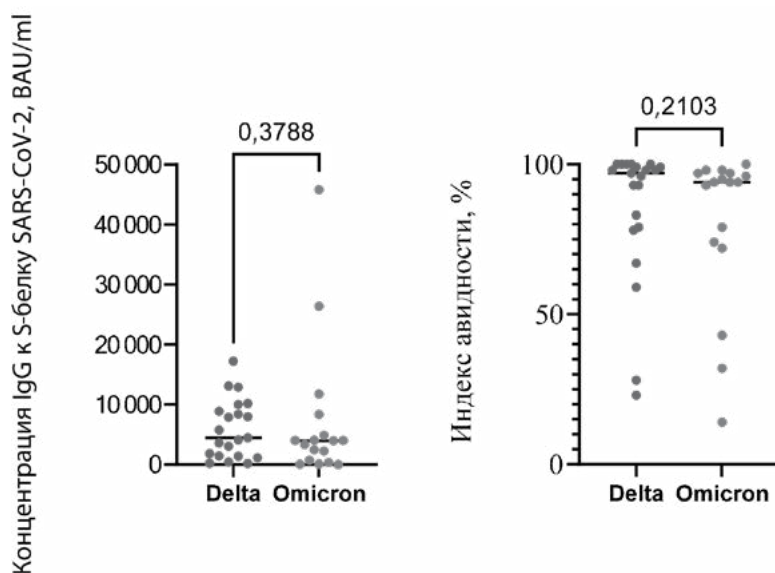


Рис. 5. Регистрируемые показатели напряженности иммунного ответа и avidности IgG к S-белку у лиц со сформированным гибридным иммунитетом в результате вторичной SARS-CoV-2-инфекции, ассоциированной с геновариантами Delta или Omicron

Fig. 5. Recorded indicators of the immune response intensity and IgG avidity to the S-protein in individuals with hybrid immunity formed as a result of secondary SARS-CoV-2 infection associated with the Delta or Omicron variant

В прикладном аспекте полученные нами данные позволяют с осторожностью предположить, что на фоне высокой серопревалентности к SARS-CoV-2 в Республике Беларусь [13] средства вакцинопрофилактики COVID-19, основанные на использовании различных ВВО, способны к индукции протективного иммунного ответа к SARS-CoV-2, о чем свидетельствует вариант-независимое увеличение концентрации противовирусных IgG и индекса их авидности.

Тем не менее при текущей тенденции в Республике Беларусь, направленной на разработку вакцин, следует принимать во внимание адаптивную изменчивость вируса в динамике формирования популяционного иммунитета к SARS-CoV-2. Повышение аффинности связывания РСД SARS-CoV-2 Omicron с клеточным рецептором АПФ-2 является одним из механизмов уклонения вируса от иммунного ответа хозяина, в связи с чем даже при напряженном Delta-индуцированном иммунном ответе выработанные антитела могут оказаться неэффективными в нейтрализации новых вариантов вируса.

Изучение кросс-реактивности антител к разным вариантам SARS-CoV-2 является следующим шагом в формировании доказательной базы при создании отечественных средств вакцинопрофилактики COVID-19, и полагаем, что накопленные данные о различиях гуморального иммунного ответа на разные ВВО являются основополагающими при выборе действующего компонента новых вакцин.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование особенностей формирования гуморального иммунного ответа к разным геновариантам SARS-CoV-2 следует рассматривать как важное направление системных работ по определению адекватной тактики борьбы с COVID-19.

Полученные в ходе выполнения настоящих исследований результаты оценки как первично сформированного (постинфекционного), так и вторично сформированного (гибридного) гуморального иммунного ответа к SARS-CoV-2 в разрезе разных его геновариантов дают основания сформулировать следующие выводы:

- при высокой частоте регистрации и количестве противовирусных антител, сформированных на геновариант SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 на ранних сроках от начала заболевания, реализация иммунного ответа при Omicron-ассоциированной инфекции характеризовалась более медленной кинетикой развития;
- различия в напряженности сформированного иммунного ответа к разным геновариантам SARS-CoV-2 находились в зависимости от возрастного фактора;
- несмотря на менее напряженный гуморальный иммунитет, вызванный геновариантом Omicron, частота обнаружения индуцированных им высокоавидных IgG была значительно выше аналогичного показателя, регистрируемого в ответ на геновариант Wuhan-Hu-1;
- установленные характеристики гибридного гуморального противовирусного иммунитета (количество и авидность анти-SARS-CoV-2 IgG), сформированного у привитых и позднее переболевших COVID-19 пациентов, не имели достоверных различий в зависимости от этиологического агента инфекции (Omicron/Delta).



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Coronavirus Cases*. *Worldometer*. 2023. Available at: <https://www.worldometers.info/coronavirus/> (accessed 6 July 2023).
2. Carabelli A.M., Peacock T.P., Thorne L.G. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21(3):162–177. doi: 10.1038/s41579-022-00841-7
3. Chatterjee S., Bhattacharya M., Nag S. A Detailed Overview of SARS-CoV-2 Omicron: Its Sub-Variants, Mutations and Pathophysiology, Clinical Characteristics, Immunological Landscape, Immune Escape, and Therapies. *Viruses*. 2023;15(1):167. doi: 10.3390/v15010167
4. Liu Y., Rocklöv J. The effective reproductive number of the Omicron variant of SARS-CoV-2 is several times relative to Delta. *J Travel Med*. 2022;29(3):taac037. doi: 10.1093/jtm/taac037
5. Kim S., Liu Y., Ziarnik M. Binding of human ACE2 and RBD of Omicron enhanced by unique interaction patterns among SARS-CoV-2 variants of concern. *J Comput Chem*. 2023;44(4):594–601. doi: 10.1002/jcc.27025
6. Gill R., Burioni R. SARS-CoV-2 before and after Omicron: two different viruses and two different diseases? *J Transl Med*. 2023;21(1):251. doi: 10.1186/s12967-023-04095-6
7. Wise J. Covid-19: Symptomatic infection with omicron variant is milder and shorter than with delta, study reports. *BMJ*. 2022;377:o922. doi: 10.1136/bmj.o922
8. Montazersaheb S., Hosseiniyan Khatibi S.M., Hejazi M.S. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virologia*. 2022;19(1):92. doi: 10.1186/s12985-022-01814-1
9. Parker E., Thomas J., Roper K.J. SARS-CoV-2 antibody responses associate with sex, age and disease severity in previously uninfected people admitted to hospital with COVID-19: An ISARIC4C prospective study. *Front Immunol*. 2023;14:1146702. doi: 10.3389/fimmu.2023.1146702
10. Kopel J., Perisetti A., Roghani A. Racial and Gender-Based Differences in COVID-19. *Front Public Health*. 2020;8:418. doi: 10.3389/fpubh.2020.00418
11. Mahalingam G., Periyasami Y., Arjunan P. Omicron infection increases IgG binding to spike protein of predecessor variants. *J Med Virol*. 2023;95(2):e28419. doi: 10.1002/jmv.28419
12. Amvrosieva T.V. A modern approach to assessing the protectiveness of humoral immunity against COVID-19. *Coronaviral disease 2022. 2nd*. Belarus: Belorusskaya nauka; 2022. (in Russian)
13. Samoilovich E.O., Kolodkina V.L., Dashkevich A.M. Seroprevalence to SARS-CoV-2 virus in the Republic of Belarus: general trends. *Healthcare*. 2022;12. (in Russian)



Тамашевский А.В.¹, Гармаза Ю.М.¹✉, Федуро Н.А.¹, Пасюков В.В.¹, Слобожанина Е.И.^{1,2}

¹ Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

² Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Состояние окислительно-восстановительного баланса в лимфоцитах периферической крови пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом как критерий персонифицированной оценки ответа их организма на проводимую лекарственную терапию

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Тамашевский А.В. – концепция, дизайн исследования, обзор литературы, проведение цитофлуориметрических исследований, анализ и статистическая обработка данных, написание текста статьи; Гармаза Ю.М. – проведение исследований по оценке редокс-статуса лимфоцитов, обзор литературы, анализ данных, написание текста статьи; Федуро Н.А. – выделение ПМНК из крови пациентов, постановка МТТ-теста; Пасюков В.В. – разработка критериев включения-исключения, сбор материала для исследования; Слобожанина Е.И. – руководство проектом, редактирование статьи.

Благодарность. Работа выполнена в рамках мероприятия 29 «Разработать технологию для экспресс-оценки степени повреждений лейкозных клеток, индуцированных терапевтическими факторами», реализуемого в ГП «Научное общество «Техника», подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии – 2020» (2017–2019 гг.). Авторы благодарят врачей-гематологов Минской областной клинической больницы за предоставленные образцы крови пациентов с В-ХЛЛ согласно критериям включения-исключения, разработанным для реализации проекта.

Подана: 14.08.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: garmaza@yandex.com

Резюме

Цель. Определить жизнеспособность лимфоцитов периферической крови пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом (В-ХЛЛ) до и после проведения им химиотерапии и оценить значимость редокс-состояния их иммунокомпетентных клеток при метаболизме лекарственных препаратов для персонифицированного учета ответа организма на использованную схему лечения.

Материалы и методы. В работе использована периферическая кровь пациентов с диагнозом В-ХЛЛ (n=25). В качестве лекарственных средств были выбраны: нуклеозидный аналог флударабел (Flu, 5 мг/л); ингибитор протеинтирозинкиназы иматиниб (Imat, 5 мг/л), синтетический глюкокортикостероид дексаметазон (Dex, 5 мг/л), а также винка-алкалоид винкристин (Vincr, 0,25 мг/л). Процентное содержание CD5⁺ лимфоцитов среди CD19⁺ клеток в суммарной популяции периферических мононуклеарных клеток (ПМНК) пациентов с В-ХЛЛ определяли цитофлуориметрически с использованием специфических моноклональных антител. Оценка уровня активных форм кислорода в ПМНК проводилась цитофлуориметрически с применением флуоресцентного зонда 5-хлорометил-2,7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (CM-H₂DCFDA). Чувствительность ПМНК к лекарственным средствам определяли с помощью МТТ-теста.



Результаты. Проведена оценка редокс-состояния лимфоцитов пациентов с В-ХЛЛ до и после воздействия на них лекарственных средств в терапевтических концентрациях, а также определена их чувствительность к данным противоопухолевым химиопрепаратам. Полученные результаты свидетельствуют о снижении чувствительности клеток пациентов с В-ХЛЛ после полного курса химиотерапии к флударабелу, винкристину, дексаметазону и иматинибу по сравнению с клетками пациентов, не прошедших химиотерапию. Выявлено изменение редокс-статуса в клетках пациентов с В-ХЛЛ до проведения химиотерапии после воздействия исследуемых лекарственных средств по сравнению с группой пациентов после химиотерапии. Обнаружены высокая гетерогенность популяций клеток пациентов с В-ХЛЛ и значительная вариабельность в индивидуальной чувствительности к концентрациям противоопухолевых лекарственных средств, близким к терапевтическим, что свидетельствует о необходимости персонализации чувствительности клеток пациентов к химиотерапевтическим воздействиям *ex vivo* при выборе адекватной стратегии лечения конкретного пациента.

Заключение. Для возможности персонализированного учета ответа клеток пациентов с В-ХЛЛ на химиотерапию в качестве прогностического показателя можно использовать изменение их редокс-состояния.

Ключевые слова: хронический В-лимфоцитарный лейкоз, активные формы кислорода, жизнеспособность клеток, лекарственная резистентность, противоопухолевые химиопрепараты

Tamashevski A.¹, Harmaza Yu.¹✉, Fiadura N.¹, Pasiukov V.¹, Slobozhanina E.^{1,2}

¹ Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Belarus

² Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Redox Reactions Balance in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Chronic B-Lymphocytic Leukemia as a Personalist Criterion for Assessment the Organism Response to Drug Therapy

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Tamashevski A. – concept, study design, literature review, cytofluorometric studies, analysis and statistical processing of data, text writing; Harmaza Yu. – conducting studies to assess the redox status of lymphocytes, literature review, data analysis, text writing; Fiadura N. – isolation of PMNC from the blood of patients, setting up the MTT test; Pasyukov V. – development of inclusion-exclusion criteria, collection of material for research; Slobozhanina E. – project management, article editing.

Acknowledgements. The work was carried out as part of activity 29 "Develop a technology for rapid assessment of the leukemia cells damage degree under inducing by therapeutic factors", implemented in the State Program "High-tech technologies and equipment", subprogram 1 "Innovative biotechnologies – 2020" (2017–2019). The authors thank the hematologists of the Minsk Regional Clinical Hospital for providing blood samples from patients with B-CLL according to the inclusion-exclusion criteria developed for the project.

Submitted: 14.08.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: garmaza@yandex.com

Abstract

Purpose. To determine the peripheral blood lymphocytes viability of patients with chronic B-lymphocytic leukemia (B-CLL) before and after chemotherapy and to estimate the significance of their immunocompetent cells redox balance under drugs metabolism for assessment the organism response to used treatment regimen.

Materials and methods. A peripheral blood of patients with B-CLL (n=25) was used. The following antitumor drugs have been chosen: nucleoside analog fludarabel (Flu, 5 mg/l); the protein tyrosine kinase inhibitor imatinib (Imat, 5 mg/l), the synthetic glucocorticosteroid dexamethasone (Dex, 5 mg/l), and the vinca alkaloid vincristine (Vincr, 0.25 mg/l). The percentage of CD5⁺ lymphocytes among CD19⁺ cells in the total population of B-CLL peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was determined by flow cytometry using special monoclonal antibodies. The level of reactive oxygen species in PBMCs was assessed using fluorescent probe 5-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA). The PBMCs sensitivity to antitumor drugs was determined using MTT test.

Results. The redox state of lymphocytes in patients with B-CLL was assessed before and after exposure to drugs in therapeutic concentrations and their sensitivity to these antitumor drugs was determined. The obtained results indicate about decrease in the cells sensitivity of B-CLL patients after a full course of chemotherapy to fludarabel, vincristine, dexamethasone and imatinib, compared with the cells of patients are not treated with chemotherapy. Alterations in the redox state of B-CLL patient's cells before chemotherapy after exposure to the studied drugs compared to the group of patients after chemotherapy was revealed. High heterogeneity of cell populations of B-CLL patients and significant



variability in individual sensitivity to anticancer drugs concentrations close to therapeutic ones were found. This indicates about importance of personalizing of the patient's cells sensitivity to ex vivo chemotherapeutic effects under choosing an adequate treatment strategy for certain patient.

Conclusion. Alterations in lymphocytes redox state can be used as a prognostic indicator for the possibility of personalized analysis of the response of B-CLL patient's cells to chemotherapy.

Keywords: chronic B-lymphocytic leukemia, reactive oxygen species, cell viability, drug resistance, anticancer drugs

■ ВВЕДЕНИЕ

Проблема первичной и приобретенной нечувствительности пациентов к проводимой химиотерапии актуальна из-за последствий, которые могут быть вызваны применением неэффективных лекарственных препаратов, – возможного развития осложнений и полной нечувствительности. Учитывая гетерогенность патофизиологических механизмов, обуславливающих развитие лейкозов, механизмов резистентности к терапии, даже не говоря о значительных колебаниях индивидуальной чувствительности опухолевых клеток к лекарственным препаратам, трудно выбрать оптимальную схему лечения отдельного пациента, основываясь на эмпирических фактах или статистических данных об эффективности терапии среднего пациента [1]. Лабораторный компонент персонализации терапии предполагает использование не только исходных структурных особенностей клеток (в частности мутаций) или выживаемости клеток после контакта с противолейкозными препаратами *in vitro*. Очевидно, что расширение спектра предсказательных диагностических технологий может способствовать прогнозированию ответа на терапию в организме с целью выбора адекватной стратегии терапии и ее мониторинга [1, 2].

Ранее было установлено, что по сравнению с интактными лимфоцитами доноров в клетках при хроническом лимфоцитарном лейкозе (ХЛЛ) наблюдается значительное увеличение уровня активных форм кислорода (АФК), что объясняют окислительным повреждением ДНК и мутациями митохондриальной ДНК (мтДНК), в особенности у пациентов, перенесших терапию ДНК-разрушающими лекарственными препаратами [3–5]. Поскольку дыхательная цепь митохондрий является основным источником генерации АФК вследствие бифуркации электронов от транспортных комплексов, предполагается, что дисфункция митохондриального дыхания может усиливать утечку электронов и запускать повышенную генерацию АФК [6]. Интересный факт состоит в том, что потеря р53, по-видимому, способствует мутациям в мтДНК и усилению продукции АФК в раковых клеточных линиях [7]. Несколько механизмов, включая митохондриальную дисфункцию и нарушения метаболизма, возможно, вносят вклад в формирование окислительного стресса на фоне повышенного уровня активных форм кислорода в клетках при хроническом лимфоцитарном лейкозе. С терапевтической точки зрения можно задать один важный вопрос: как использовать повышенный уровень АФК в клетках пациентов с ХЛЛ для разработки новых эффективных стратегий борьбы с данной патологией? Хотя увеличение

содержания АФК в раковых клетках часто рассматривают как неблагоприятное событие из-за их способности к запуску геномной нестабильности и клеточной пролиферации, они вместе с тем способны индуцировать гибель раковых клеток, что и является желаемым результатом химиотерапии [8, 9]. Это может служить основанием к использованию феномена индукции окислительного стресса в самих раковых клетках для разработки новых стратегий [9], которые помогут достичь токсического действия АФК против самих ХЛЛ-клеток с применением подходящих редокс-модулирующих лекарственных препаратов.

В работе [10] было продемонстрировано, что природное соединение β -фенилэтилизотиоцианат эффективно отключает глутатион-зависимую антиоксидантную систему и предпочтительно убивает раковые клетки яичников, в которых обнаружена активация генерации АФК, под влиянием онкогенного сигнала Ras, но при этом проявляет низкую токсичность для незлокачественных эпителиальных клеток яичников с низким уровнем АФК. На основе этих наблюдений авторы сделали вывод о том, что ХЛЛ-клетки из-за значительного усиления в них генерации АФК, вероятно, будут также сильно зависеть от функционирования антиоксидантной системы для поддержания редокс-баланса и эти клетки могут проявлять частичную чувствительность к такого рода препаратам. С другой стороны, установлено [3], что лимфоциты здоровых людей более толерантны к подобному лечению из-за низкого базального уровня АФК и нормальной метаболической регуляции. При этом показано, что флударабел-резистентные клетки пациентов с ХЛЛ на поздней стадии заболевания с предшествующей терапией или с отключенным белком p53 имеют тенденцию к увеличению уровня АФК и такие клетки, вероятно, будут чувствительны к β -фенилэтилизотиоцианату или его аналогам [11].

Стоит отметить, что многие противоопухолевые препараты, применяемые в терапии лейкозов, могут инициировать в опухолевой клетке апоптотические процессы не только по внутреннему пути – с участием митохондрий, но и по внешнему – с участием рецепторов семейства фактора некроза опухолей. Однако сведения об этих процессах в доступной литературе противоречивы [5]. АФК, такие как супероксиданион (O_2^-), H_2O_2 и гидроксил-радикал ($\cdot OH$), генерируются в ответ на противоопухолевые лекарственные препараты и также являются важными компонентами апоптоза [12]. Интересным фактом является то, что АФК могут реагировать на резкие изменения физиологии умирающих клеток, преобразовывая поздние апоптотические стадии в некротическую гибель клетки [13, 14]. Эти результаты указывают на то, что внутриклеточный уровень АФК может определять судьбу клеток, включая чувствительность или устойчивость к противоопухолевым препаратам.

Несмотря на то что гетерогенность ответа пациентов на терапию полностью не определяется вариантами взаимодействия клеток с лекарственными средствами вне организма, доклинический ответ клеток *in vitro* может исключить назначение неэффективных для конкретного пациента лекарственных средств, что является одним из способов предупреждения развития множественной лекарственной резистентности, а также использования редуцированной цитостатической нагрузки [1, 15]. Таким образом, сравнение принятых в клинической практике методов определения выживаемости клеток *in vitro* (например, МТТ-тест) и подхода диагностики повреждений лейкозных клеток человека на основе учета их редокс-состояния после



воздействия лекарственных средств в терапевтических концентрациях позволит разработать основу доклинической лабораторной оценки индивидуальной лекарственной чувствительности клеток пациентов при лейкозах [16, 17].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение жизнеспособности лимфоцитов периферической крови пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом до и после проведения им химиотерапии и оценка значимости редокс-состояния их иммунокомпетентных клеток при метаболизме лекарственных препаратов для персонализированного учета ответа организма на использованную схему лечения.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована периферическая кровь пациентов с диагнозом «хронический В-лимфоцитарный лейкоз» (В-ХЛЛ, n=25), предоставленная УЗ «Минская областная клиническая больница». От всех пациентов получены информированные согласия на участие в научных исследованиях. Образцы крови сохранялись в консерванте гепарин.

Критериями включения в группу пациентов являлось: наличие диагноза хронического В-лимфоцитарного лейкоза, доказанного по иммунофенотипу, наличие показаний к терапии (стадии В, С, стадия А с прогрессией), отсутствие тяжелой органной недостаточности и некурабельной инфекции. Критериями исключения из группы исследований были: наличие лимфомы из малых лимфоцитов, наличие второй опухоли на момент включения в протокол (кроме базалиомы кожи), химиотерапия по поводу второй опухоли, проведенная в течение 12 месяцев до начала терапии по поводу ХЛЛ, наличие острого гепатита и вирусного гепатита В, а также инфекционного заболевания, которое не может быть устранено на момент включения, наличие ВИЧ-инфекции, клиренс креатинина <30 мл/мин (противопоказание к назначению флударабела), сердечная недостаточность III–IV класса по NYHA, недостаточность функции печени, невозможность проведения терапии в полном объеме, наличие синдрома Рихтера, анафилактические реакции в анамнезе на моноклональные антитела, мышинные белки и компоненты ритуксимаба.

Периферические мононуклеарные клетки крови (ПМНК) изолировали в градиенте плотности гистопак-1077. После выделения ПМНК помещали в коммерческую питательную среду RPMI-1640 (Gibco) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина («полная» RPMI 1640); инкубировали в 24- или 96-луночных планшетах в увлажненной атмосфере с 5% содержанием CO₂ при температуре 37 °С в течение 2–3 ч, 18–20 ч или 44 ч с лекарственными средствами.

В качестве лекарственных средств использовали химиопрепараты 4 различных классов в концентрациях, близких к терапевтическим: нуклеозидный аналог флударабел (Flu, 5 мг/л); ингибитор протеинтирозинкиназы иматиниб (Imat, 5 мг/л), синтетический глюкокортикостероид дексаметазон (Dex, 5 мг/л), а также винка-алкалоид винкристин (Vincr, 0,25 мг/л). На рис. 1 представлены структурные формулы молекул используемых химиопрепаратов.

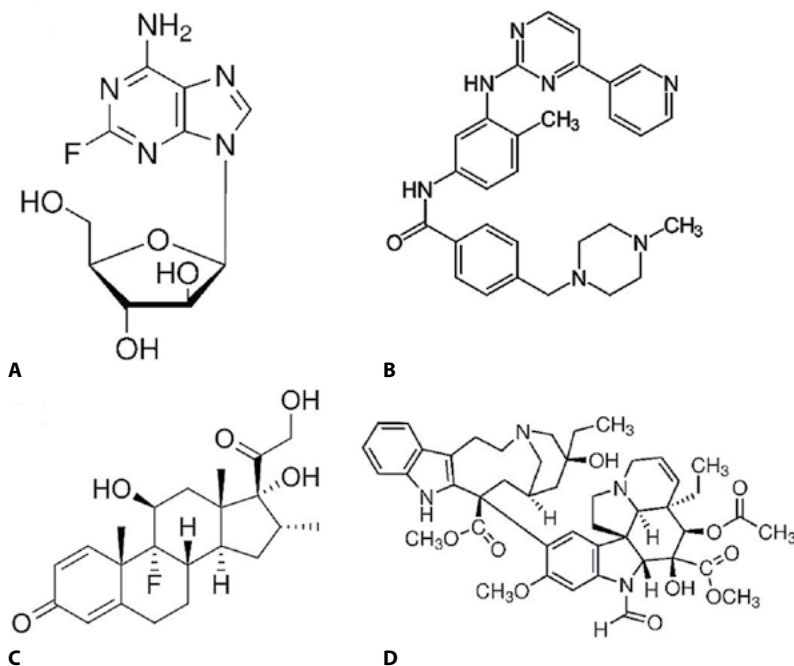


Рис. 1. Структурные формулы молекул цитостатических препаратов: А – флударабел (9-бета-D-Арабинофуранозил-2-фтор-9H-пурин-6-амин); В – иматиниб (4-[[4-Метил-1-пиперазинил]метил]-N-[4-метил-3-[[4-(3-пиридинил)-2-пиримидинил]амино]фенил]бензамид); С – дексаметазон (δ-1,9-α-фтор,16α-метил-гидрокортизон); D – винкристин (22-Оксовинкалейкобластин (в виде сульфата 1:1))

Fig. 1. Structural formulas of the cytostatic drugs molecules: A – fludarabine (9-beta-D-Arabinofuranosyl-2-fluoro-9H-purin-6-amine); B – imatinib (4-[[4-Methyl-1-piperazinyl]methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]phenyl]benzamide); C – dexamethasone (δ-1,9-α-fluoro,16α-methyl-hydrocortisone); D – vincristine (22-Oxovincal leukoblastine Sulfate)

Процентное содержание CD5⁺ лимфоцитов среди CD19⁺ клеток в суммарной популяции ПМНК пациентов с В-ХЛЛ определяли цитофлуориметрически по степени связывания с FITC-конъюгированными моноклональными антителами (MkAT) CD5 (клон BL1a) и фикоэритрин-конъюгированными MkAT CD19 (клон J3-119). Неспецифическое связывание контролировали с помощью соответственно IgG2a и IgG1.

Оценка уровня АФК в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ проводилась цитофлуориметрически с использованием флуоресцентного зонда 5-хлорометил-2',7'-дихлороди гидрофлуоресцеин диацетата (CM-H₂DCFDA) по интенсивности флуоресценции конечного продукта 5-хлорометил-2',7'-дихлорофлуоресцеин (CM-DCF) в FITC-Н канале. Итоговые данные на рисунках представлены в виде отношения значений средней интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах после воздействия химиопрепарата ($I_{\text{фл.к}}$) к средней интенсивности флуоресценции CM-DCF в контрольных лимфоцитах ($I_{\text{фл.к}}$) (без воздействия химиопрепаратов), выраженного в процентах. При определении интенсивности флуоресценции CM-DCF в клетках



пациентов с В-ХЛЛ учитывались только жизнеспособные лимфоциты, выделенные в отдельный регион по показателям бокового (SSC-H) и прямого (FSC-H) светорассеяния. Клетки, не окрашенные CM-H₂DCFDA, из анализа исключались.

Чувствительность ПМНК к лекарственным средствам определяли с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ-теста). МТТ-тест позволяет проводить сравнительную оценку метаболической (дегидрогеназной) активности митохондрий, степень которой коррелирует с жизнеспособностью клеток. Итоговые данные представлены в виде отношения значений средней оптической плотности суспензии после воздействия химиопрепарата на клетки (D) к средней оптической плотности суспензии в контрольных клетках пациентов (D_к) (без воздействия химиопрепаратов), выраженного в процентах.

Все цитофлуориметрические измерения проводились на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson) в FITC-H и PE-H каналах, а спектрофотометрические – на планшетном спектрофотометре Sunrise Microplate Reader (Tecan).

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрического критерия Уилкоксона. Корреляционные зависимости оценивали с применением критерия Спирмена (r_s) в программе STATISTICA 8.0. Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что CD5⁺ позитивные В-клетки (CD19⁺) составляют отдельную В-клеточную субпопуляцию. При рождении большинство В-лимфоцитов коэкспрессируют CD5, а взрослые CD5⁺ В-клетки составляют примерно одну пятую часть нормальных клеток периферической крови [18]. Таким образом, этот факт определил подход, при котором пациенты с ХЛЛ считаются в стадии фенотипической ремиссии: процентное содержание CD19⁺CD5⁺ клеток в крови не должно превышать 25% [19]. Для определения процентного содержания CD5⁺ лимфоцитов среди CD19⁺ клеток в суммарной популяции периферических мононуклеаров пациентов с ХЛЛ было выполнено иммунофенотипирование лимфоцитов всех отобранных пациентов (n=25). На рис. 2 представлены репрезентативные диаграммы распределения флуоресценции ПМНК пациентов с В-ХЛЛ, связавшихся с моноклональными антителами против кластеров дифференцировки лейкоцитов CD5 и CD19.

Полученные результаты позволили разделить пациентов с В-ХЛЛ на 2 группы. В первую группу вошли пациенты, среднее содержание CD19⁺CD5⁺ клеток у которых составило 3,1±2,5 (n=5). Эти пациенты прошли полный курс химиотерапии и находились в стадии ремиссии. Вторую группу составили пациенты, среднее содержание CD19⁺CD5⁺ клеток у которых составило 82,1±16,3 (n=20). У этих пациентов был диагностирован В-ХЛЛ, и их лечение не проводилось. Таким образом, результаты исследований по оценке уровня свободно-радикальных соединений до и после воздействия лекарственных средств, а также данные о чувствительности отобранных пациентов с В-ХЛЛ к воздействию исследуемых химиопрепаратов были разделены на 2 группы согласно процентному содержанию в них CD19⁺CD5⁺ клеток.

Известно, что выбранные нами лекарственные средства применяются в терапии различных злокачественных новообразований. Так, Vincr находит применение совместно с другими препаратами при терапии ХЛЛ, а также острого лимфобластного лейкоза у взрослых и детей [20]. Flu демонстрирует хорошие результаты при терапии

острых лимфобластных лейкозов и неходжкинских лимфом, но в основном они применяются при В-хроническом лимфоцитарном лейкозе [21]. Дех применяется при остром лимфобластном лейкозе в качестве индукционной терапии, а также при миелодиспластическом синдроме, ангиоиммунобластной злокачественной Т-клеточной лимфоме в комбинации с противоопухолевыми препаратами [22]. Иматиниб

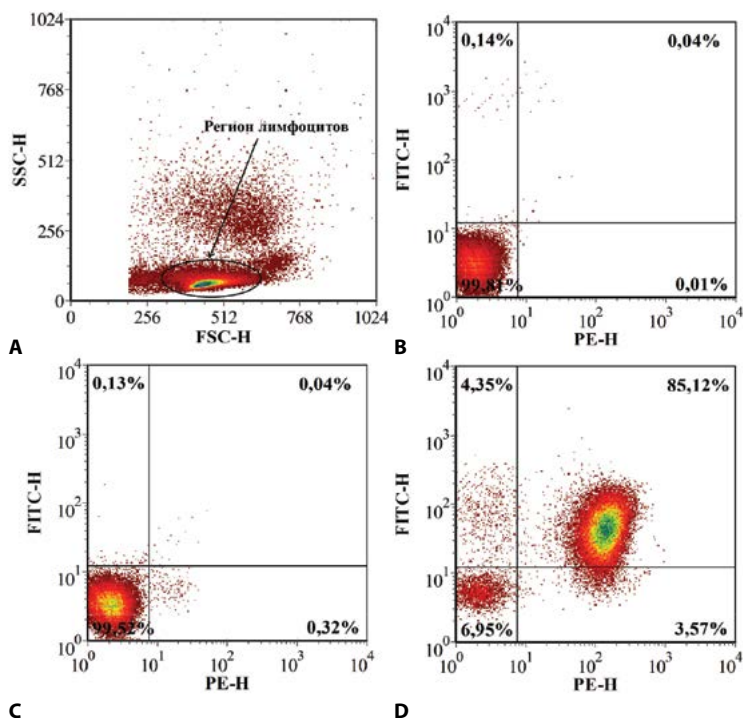


Рис. 2. Цитофлуориметрический анализ лимфоцитов периферической крови пациентов с В-ХЛЛ на содержание $CD19^+CD5^+$ клеток: А – распределение ПМНК пациентов с В-ХЛЛ по показателям прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; В – репрезентативная диаграмма распределения собственной флуоресценции клеток, попавших в «регион лимфоцитов» (по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции в канале PE-H в усл. ед., по оси ординат – интенсивность флуоресценции в канале FITC -H в усл. ед.); С – репрезентативная диаграмма распределения интенсивности флуоресценции IgG1-PE и IgG2a-FITC в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ (по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции IgG1-PE в усл. ед., по оси ординат – интенсивность флуоресценции IgG2a-FITC в усл. ед.); D – репрезентативная диаграмма распределения интенсивности флуоресценции CD19-PE и CD5-FITC в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ (по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции CD19-PE в усл. ед., по оси ординат – интенсивность флуоресценции CD5-FITC в усл. ед.)

Fig. 2. Cytofluorimetric analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with B-CLL for the frequency of $CD19^+CD5^+$ cells: А – distribution of PBMCs of patients with B-CLL in terms of forward (FSC) and side (SSC) light scattering; В – a representative diagram of the distribution of intrinsic fluorescence of cells that have fallen into the "lymphocyte region" (abscissa – fluorescence intensity in the PE-H channel, a.u., ordinate – fluorescence intensity in the FITC-H channel, a.u.); С – representative diagram of distribution of IgG1-PE and IgG2a-FITC fluorescence intensity in lymphocytes of patients with B-CLL (abscissa shows IgG1-PE fluorescence intensity in a.u., ordinate shows IgG2a-FITC fluorescence intensity in a.u.); D – representative distribution diagram of CD19-PE and CD5-FITC fluorescence intensity in lymphocytes of patients with B-CLL (abscissa shows CD19-PE fluorescence intensity in a.u., ordinate shows CD5-FITC fluorescence intensity in a.u.)



селективно подавляет пролиферацию и вызывает апоптоз клеточных линий, позитивных по BCR/ABL, а также незрелых лейкозных клеток при хронической миелоидной лейкемии с положительной филадельфийской хромосомой (Ph+) и при остром лимфобластном лейкозе [23].

На рис. 3 представлены результаты определения чувствительности клеток пациентов с В-ХЛЛ к исследуемым лекарственным средствам (флударабелу, винкристину, иматинибу, дексаметазону), полученные с помощью МТТ-теста.

Установлено, что в первой группе пациентов с В-ХЛЛ (n=5) чувствительность клеток к флударабелу, дексаметазону и иматинибу находилась на низком уровне и статистически достоверно отличалась от контрольных клеток (в среде инкубации которых отсутствовали противоопухолевые препараты) на 5–10% в сторону ее увеличения (рис. 3, А), что соответствовало снижению клеточной жизнеспособности спустя 44 ч после воздействия химиопрепаратов. Воздействие винкристина в течение 44 ч приводило к статистически достоверному снижению жизнеспособности клеток первой группы пациентов в среднем на 10–15% по сравнению с контролем (рис. 3, А). При воздействии исследуемых противоопухолевых средств на клетки пациентов второй группы (n=20) в течение 44 ч наблюдалось статистически достоверное увеличение их чувствительности (рис. 3, В), что соответствовало снижению жизнеспособности клеток по сравнению с контролем. Так, для флударабела и винкристина снижение жизнеспособности клеток пациентов с В-ХЛЛ второй группы спустя 44 ч составило в среднем 45–60% (рис. 3, В) по сравнению с интактными клетками (контролем). Через 44 ч для дексаметазона и иматиниба количество погибших клеток было немного снижено и составило в среднем 30–40% относительно контроля (рис. 3, В).

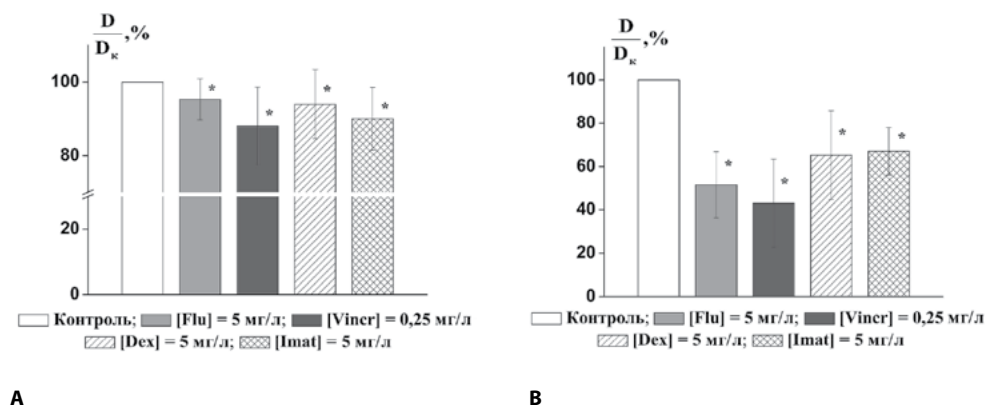


Рис. 3. Метаболическая активность клеток пациентов с В-ХЛЛ через 44 ч после воздействия лекарственных средств in vitro: А – первая группа пациентов с В-ХЛЛ; В – вторая группа пациентов с В-ХЛЛ. Величина средней оптической плотности лейкоэмических клеток с МТТ в отсутствие лекарственных средств принята за 100% (контроль); * различия по сравнению с контролем достоверны (p<0,05)

Fig. 3. Metabolic activity of cells of patients with B-CLL after drug exposure during 44 h in vitro: А – group I of patients with B-CLL; В – II group of patients with B-CLL. The value of the average optical density of leukemic cells with MTT in the absence of drugs was taken as 100% (control); * differences compared to control are significant (p<0,05)

Таким образом, клетки пациентов с В-ХЛЛ в стадии ремиссии (первая группа) обладают низкой чувствительностью к исследуемым лекарственным средствам в терапевтических концентрациях, по сравнению с лейкозными клетками второй группы (до проведения химиотерапии). Причем для флударабела и винкристина чувствительность клеток второй группы по сравнению с клетками первой группы была увеличена в среднем на 45%, а для дексаметазона и иматиниба – в среднем на 25–30%.

Проведенный корреляционный анализ с использованием критерия Спирмена (r_s) между процентным содержанием CD19⁺CD5⁺ клеток и чувствительностью этих клеток к исследуемым противоопухолевым средствам (МТТ-тест) выявил статистически значимую обратную зависимость. Причем для флударабела, винкристина и иматиниба она оказалась достаточно сильная (r_s в диапазоне от $-0,87$ до $-0,91$ со статистической значимостью p от $0,0000003$ до $0,000005$). Это свидетельствует о достаточно большой эффективности выбранных для исследования лекарственных средств в отношении злокачественной субпопуляции CD19⁺CD5⁺.

С целью выяснения вопроса о степени взаимосвязи между уровнем внутриклеточных свободно-радикальных соединений *in vitro* в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ и количеством погибших клеток при действии лекарственных препаратов различной природы была оценена их способность к образованию свободно-радикальных соединений после краткосрочного (2–3 ч) и долгосрочного (18–20 ч) воздействия исследуемых химиопрепаратов в терапевтических концентрациях. На рис. 4 представлены результаты измерения интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ первой группы после воздействия флударабела, винкристина, дексаметазона и иматиниба в концентрациях, близких к терапевтическим.

Как следует из рассмотрения рис. 4, А, флударабел, винкристин и иматиниб через 2–3 ч не влияли на редокс-статус лимфоцитов первой группы по сравнению

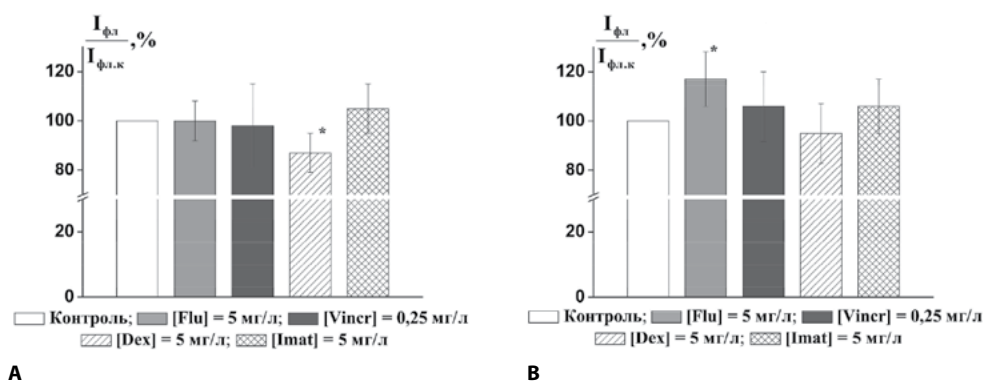


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ (первая группа) после краткосрочного (А) и долгосрочного (В) воздействия лекарственных средств *in vitro*. Величина интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах без воздействия лекарственных средств принята за 100% (контроль); * различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)
Fig. 4. Fluorescence intensity of CM-DCF in lymphocytes of patients with B-CLL (group I) after short-term (A) and long-term (B) exposure to drugs *in vitro*. The intensity of CM-DCF fluorescence in intact lymphocytes without drug exposure was taken as 100% (control); * differences compared to control are significant ($p < 0,05$)



с клетками, в среде инкубации которых отсутствовали лекарственные средства (контроль). Дексаметазон, в свою очередь, в среднем на 10–15% приводил к статистически достоверному снижению интенсивности флуоресценции CM-DCF по сравнению с таковой в контроле, что указывает на смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону восстановителей (антиоксидантов). Через 18–20 ч интенсивность флуоресценции CM-DCF в первой группе пациентов после воздействия флударабела статистически достоверно возрастала в среднем на 10–20% по сравнению с контрольными клетками (рис. 4, В), в то же время воздействие винкристина, дексаметазона и иматиниба не оказывало статистически значимого влияния на редокс-статус клеток по сравнению с контролем без химиопрепаратов. Полученные результаты указывают на накопление АФК в клетках пациентов с В-ХЛЛ (первая группа) после воздействия флударабела в течение 18–20 ч.

На рис. 5 представлены результаты измерения интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ до проведения химиотерапии (вторая группа) после воздействия тех же лекарственных средств в концентрациях, близких к терапевтическим. Как видно из рис. 5, А, воздействие флударабела и винкристина через 2–3 ч приводило к незначительному возрастанию интенсивности флуоресценции CM-DCF – в среднем на 5–10% по сравнению с контролем, причем для винкристина данное увеличение интенсивности флуоресценции CM-DCF было статистически значимым. Это свидетельствует о накоплении свободно-радикальных продуктов в клетках второй группы пациентов с В-ХЛЛ после воздействия винкристина, что вызывало смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону окислителей. Дальнейшее увеличение времени инкубации (до 18–20 ч) клеток второй группы пациентов при В-ХЛЛ с флударабелом и винкристином приводило к восстановлению (для флударабела) значений интенсивности флуоресценции CM-DCF к контрольным значениям (рис. 5, В) и статистически достоверному увеличению (для винкристина) интенсивности флуоресценции CM-DCF в среднем на 10–30% по сравнению с клетками, в среде инкубации которых отсутствовали лекарственные средства (рис. 5, В).

Инкубация лимфоцитов пациентов при В-ХЛЛ с дексаметазоном и иматинибом в течение 2–3 ч обуславливала статистически достоверное увеличение АФК в среднем на 20–45% и 40–80% по сравнению с контрольными клетками соответственно (рис. 5, А). Через 18–20 ч инкубации лейкозных клеток (вторая группа) с дексаметазоном и иматинибом интенсивность флуоресценции CM-DCF также статистически достоверно превышала контрольные значения в среднем на 10–30% и 5–15% (рис. 5, В), что указывает на смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону окислителей.

Таким образом, краткосрочное воздействие (2–3 ч) флударабела не оказывало влияния на редокс-статус клеток пациентов с В-ХЛЛ обеих групп. Винкринин спустя 2–3 ч также не оказывал влияния на редокс-статус клеток пациентов с В-ХЛЛ, но только в стадии ремиссии, в клетках второй группы он индуцировал накопление АФК. Краткосрочное воздействие дексаметазона приводило к смещению окислительно-восстановительного баланса в клетках пациентов с В-ХЛЛ, причем для первой группы – в сторону восстановителей (антиоксидантов), а для второй группы – в сторону окислителей. Долгосрочное воздействие флударабела (18–20 ч) не оказывало влияния на редокс-статус клеток пациентов с В-ХЛЛ (вторая группа), но приводило к накоплению свободно-радикальной продукции у пациентов в стадии ремиссии (первая

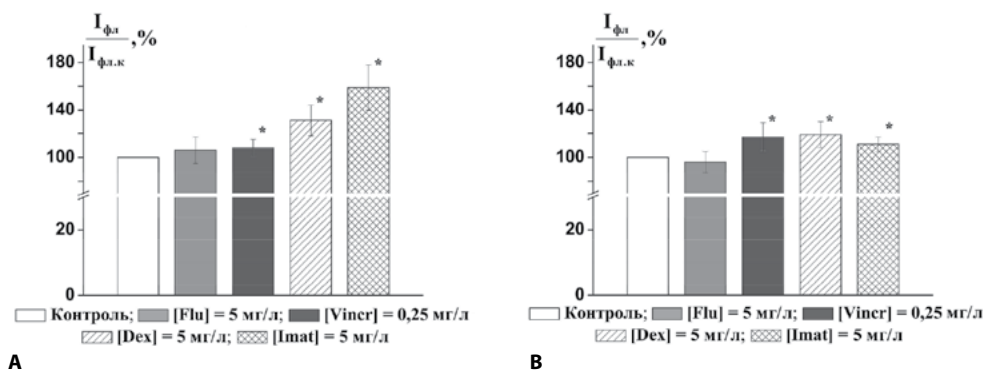


Рис. 5. Интенсивность флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ (вторая группа) после краткосрочного (А) и долгосрочного (В) воздействия лекарственных средств *in vitro*. Величина интенсивности флуоресценции CM-DCF в лимфоцитах без воздействия лекарственных средств принята за 100% (контроль); * различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)
Fig. 5. Fluorescence intensity of CM-DCF in lymphocytes of patients with B-CLL (group II) after short-term (A) and long-term (B) exposure to drugs *in vitro*. The intensity of CM-DCF fluorescence in intact lymphocytes without drug exposure was taken as 100% (control); * differences compared to control are significant ($p < 0,05$)

группа). Винкристин и дексаметазон через 18–20 ч не приводили к изменению редокс-статуса в клетках пациентов с В-ХЛЛ в стадии ремиссии и усиливали продукцию свободных радикалов в клетках пациентов с ХЛЛ второй группы. Как краткосрочное, так и долгосрочное воздействие иматиниба в концентрации, близкой к терапевтической, на клетки пациентов с В-ХЛЛ в стадии ремиссии не приводило к изменению их редокс-статуса. Инкубация лейкозных клеток второй группы с иматинибом индуцировала в них накопление АФК, причем краткосрочное воздействие приводило к более существенному сдвигу окислительно-восстановительного баланса (в сторону окислителей) в этих клетках по сравнению с долгосрочным воздействием.

Ранее было показано [16, 17], что существует связь между генерацией свободно-радикальных соединений на начальном этапе активации *in vitro* (не более часа) лимфоцитов, выделенных из периферической крови пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом, противоопухолевыми препаратами и степенью их метаболической активности на конечном этапе альтерации. В силу того, что В-ХЛЛ – это неоднородное заболевание с разнообразной клинической картиной [24], а молекулярные механизмы метаболизма исследуемых лекарственных препаратов в опухолевых клетках различны, получение через определенный промежуток времени единичного клеточного ответа о степени образования свободно-радикальных соединений, к сожалению, может не являться адекватной оценкой вклада этого процесса в реализацию программы апоптоза по внутреннему митохондриальному пути [25]. При этом стоит отметить, что проведенный корреляционный анализ выявил статистически значимую обратную зависимость (r_s от $-0,36$ до $-0,45$) между степенью образования свободно-радикальных соединений в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ в течение 2–3 ч после воздействия исследуемых лекарственных средств и процентом погибших клеток спустя 44 ч экспозиции с ними *in vitro*. Следовательно, период, в течение которого в лейкозных клетках происходит образование свободно-радикальных



соединений под влиянием воздействия исследуемых лекарственных средств (независимо от их природы), предшествует запуску процессов, приводящих к гибели лимфоцитов при хроническом В-лимфоцитарном лейкозе.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о снижении чувствительности клеток пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом к флударабелу, винкристину, дексаметазону и иматинибу после проведения полного курса химиотерапии по сравнению с клетками пациентов, не прошедших химиотерапию.

Выявлено смещение окислительно-восстановительного баланса в сторону окислителей в клетках пациентов с В-ХЛЛ до проведения химиотерапии после краткосрочного и долгосрочного воздействия винкристина (в среднем на 5–25%), дексаметазона (в среднем на 15–55%) и иматиниба (в среднем на 10–75%) по сравнению с группой пациентов после химиотерапии (стадия ремиссии). Стоит отметить, что после долгосрочного воздействия флударабела в лимфоцитах пациентов с В-ХЛЛ до проведения химиотерапии происходит сдвиг редокс-баланса в сторону антиоксидантов в среднем на 10–20% по сравнению с лимфоцитами пациентов, находящихся в стадии ремиссии.

Обнаружена значительная вариабельность индивидуальной чувствительности клеток пациентов с В-ХЛЛ при воздействии лекарственных средств в концентрациях, близких к терапевтическим, что указывает на необходимость принимать во внимание индивидуальную чувствительность *ex vivo* клеток пациентов к химиотерапевтическим воздействиям.

Выявленное изменение редокс-статуса лимфоцитов пациентов с хроническим В-лимфоцитарным лейкозом открывает возможности прогнозирования персонализированной оценки эффективности проводимого им химиотерапевтического лечения.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Svirnovski A.I. Tumor cell resistance to therapeutic factors as medicobiological problem. *Medicinskie Novosti*. 2011;9:30–38. (in Russian)
2. Svirnovski A., Pasiukov V., Kravchenko D., et al. Clonal evolution of leukemia cells and chemoresistance. *Medical and Biological Problems of Life Activity*. 2017;(1):24–28. (in Russian)
3. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020;21(7):363–383. doi: 10.1038/s41580-020-0230-3
4. D'Arena G., Seneca E., Migliaccio I., et al. Oxidative stress in chronic lymphocytic leukemia: still a matter of debate. *Leuk. Lymphoma*. 2019;60(4):867–875. doi: 10.1080/10428194.2018.1509317
5. Domka K., Goral A., Firczuk M. cROSSing the line: between beneficial and harmful effects of reactive oxygen species in B-cell malignancies. *Front. Immunol.* 2020;11:1538. doi: 10.3389/fimmu.2020.01538
6. Jitschin R., Hofmann A.D., Bruns H., et al. Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(17):2663–72. doi: 10.1182/blood-2013-10-532200
7. Achanta G., Sasaki R., Feng L., et al. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *EMBO J.* 2005;24(19):3482–3492. doi: 10.1038/sj.emboj.7600819
8. Weinberg F., Ramnath N., Nagrath D. Reactive oxygen species in the tumor microenvironment: an overview. *Cancers*. 2019;11(8):1191. doi: 10.3390/cancers11081191
9. Yosifov D.Y., Idler I., Bhattacharya N., et al. Oxidative stress as candidate therapeutic target to overcome microenvironmental protection of CLL. *Leukemia*. 2020;34(1):115–127. doi: 10.1038/s41375-019-0513-x
10. Trachootham D., Zhou Y., Zhang H., et al. Selective killing of oncogenic transformed cells through ROS-mediated mechanism by β -phenylethyl isothiocyanates. *Cancer Cell*. 2006;10(3):241–252. doi: 10.1016/j.ccr.2006.08.009
11. Trachootham D., Zhang H., Zhang W., et al. Effective elimination of fludarabine-resistant CLL cells by PEITC through. *Blood*. 2008;112(5):1912–1922. doi: 10.1182/blood-2008-04-149815
12. Nakamura H., Takada R. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Sci.* 2021;112(10):3945–3952. doi: 10.1111/cas.15068

13. Chao M.-R., Evans M.D., Hu C.-W., et al. Biomarkers of nucleic acid oxidation – A summary state-of-the-art. *Redox Biol.* 2021;42:101872. doi: 10.1016/j.redox.2021.101872
14. Picard M., Shirihai O.S. Mitochondrial signal transduction. *Cell Metab.* 2022;34(11):1620–1653. doi: 10.1016/j.cmet.2022.10.008
15. Cramer P., Hallek M. Initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.* 2016;43(2):241–250. doi: 10.1053/j.seminoncol.2016.02.005
16. Tamashevski A.V., Slobozhanina E.I., Svirnovski A.I., et al. Oxidative stress in lymphocytes at chronic lymphocytic leukemia induced by anticancer drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series.* 2010;3:62–66. (in Russian)
17. Tamashevski A.V., Harmaza Y.M., Slobozhanina E.I., Svirnovski A.I. The transport activity of P-glycoprotein upon a change of the redox balance in lymphocytes of patients with chronic B-lymphocytic leukemia. *Biophysics.* 2016;61(6):971–978. doi: 10.1134/S0006350916060257
18. Maloum K., Sutton L., Baudet S., et al. Novel flow-cytometric analysis based on BCD5+ subpopulations for the evaluation of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2002;119(4):970–975. doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03956.x
19. Ghia P., Rawstron A. Minimal residual disease analysis in chronic lymphocytic leukemia: a way for achieving more personalized treatments. *Leukemia.* 2018;32(6):1307–1316. doi: 10.1038/s41375-018-0109-x
20. Moore A., Pinkerton R. Vincristine: can its therapeutic index be enhanced? *Pediatr. Blood Cancer.* 2009;53(7):1180–1187. doi: 10.1002/psc.22161
21. Ricci F., Tedeschi A., Morra E., et al. Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2009;5(1):187–207. doi: 10.2147/tcrm.s3688
22. Baptista M.J., Muntañola A., Calpe E., et al. Differential gene expression profile associated to apoptosis induced by dexamethasone in CLL cells according to IGHV/ZAP-70 status. *Clin. Cancer Res.* 2012;18(21):5924–5933. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2771
23. Lewandowski K., Gniot M., Lewandowska M., et al. B-Cell chronic lymphocytic leukemia with 11q22.3 rearrangement in patient with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *Case Rep. Med.* 2016;9806515. doi: 10.1155/2016/9806515
24. Svirnovski A.I. Biological properties of leukemia cells and clinical phenotype in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology and transfusiology.* 2010;1:25–31. (in Russian)
25. Svirnovski A.I. Morphological, immunological and molecular genetic aspects of making diagnostic and therapeutic decisions under chronic lymphocytic leukemia. *Medical News.* 2010;9:6–12. (in Russian)



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.4.006>
УДК 577.112.825:616.151.5-074



Шашок Л.В.¹, Кабаева Е.Н.²✉, Цвирко Д.Г.²

¹ Минский клинический консультативно-диагностический центр, Минск, Беларусь

² Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения
Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

Дефицит FXII фактора свертывания (фактора Хагемана) – редкая коагулопатия или частая лабораторная находка?

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Шашок Л.В. – проведение лабораторных исследований, концепция и дизайн, систематический поиск литературы, написание текста; Кабаева Е.Н., Цвирко Д.Г. – концепция и дизайн, систематический поиск литературы, написание текста.

Подана: 04.04.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: kate_kabaeva@mail.ru

Резюме

В статье обсуждается роль фактора Хагемана (XII фактора свертывания крови, FXII) в тромбообразовании и формировании риска кровотечений при его дефиците. Представлены результаты исследования причин синдрома изолированно удлиненного активированного частично тромбопластинового времени АЧТВ (СИУ АЧТВ) и частоты выявления при этом дефицита FXII фактора. Установлено, что второй по частоте встречаемости причиной СИУ АЧТВ является дефицит FXII (25%), что говорит о недостаточности знаний истинной частоты встречаемости дефицита FXII. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в первую очередь при положительном тесте коррекции удлиненного АЧТВ (нормализация при добавлении контрольной плазмы) и при отсутствии геморрагического синдрома необходимо исключить дефицит FXII, так как он является наиболее частой причиной нарушения свертывания крови (помимо присутствия волчаночного антикоагулянта (ВА)), удлинения АЧТВ в амбулаторной практике. Полученные результаты позволили сформировать алгоритм лабораторного диагностического поиска при синдроме изолированно удлиненного АЧТВ.

Ключевые слова: FXII, фактор свертывания крови, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), синдром удлиненного АЧТВ, фактор Хагемана, дефицит FXII, тромбозы, кровотечения

Shashok L.¹, Kabayeva K.²✉, Tsvirko D.²

¹ Minsk Clinical Consulting and Diagnostic Center, Minsk, Belarus

² Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Deficiency of FXII Coagulation Factor (Hageman Factor) is a Rare Coagulopathy or a Common Laboratory Finding?

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Shashok L. – conducting laboratory research, concept and design, systematic literature search, writing the text; Kabayeva K., Tsvirko D. – concept and design, text writing, systematic literature search.

Submitted: 04.04.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: kate_kabaeva@mail.ru

Abstract

The article discusses the role of the FXII blood coagulation factor (Hageman factor) in the process of blood coagulation, its role in the formation of thrombosis and the risk of bleeding in its deficiency. The results of a study of the causes of isolated prolonged APTT syndrome (SIU APTT) and the frequency of detection of FXII factor deficiency are presented. FXII deficiency (25%) was found to be the second most common cause of IRS APTT, which indicates a lack of knowledge of the true incidence of FXII deficiency. The data obtained allow us to conclude that, first of all, with a positive test for the correction of a prolonged APTT (normalization with the addition of control plasma) and in the absence of a hemorrhagic syndrome, it is necessary to exclude FXII deficiency, since it is the most common cause, in addition to the presence of lupus anticoagulant (LA), prolongation of APTT in outpatient practice. The results obtained made it possible to develop an algorithm for laboratory diagnostic search for isolated prolonged APTT syndrome.

Keywords: coagulation factor FXII, activated partial thromboplastin time (APTT), prolonged APTT syndrome, Hageman factor, FXII factor deficiency, thrombosis, bleeding

Дефицит XII фактора – фактора Хагемана был впервые описан Оскаром Ратноффом и Джоном Колопи в 1954 г. в ходе исследования 37-летнего пациента Хагемана, которому предстояло проведение хирургического вмешательства. По результатам рутинного скрининга у пациента было выявлено значительное увеличение времени свертывания по Ли – Уайту, при этом симптомов повышенной кровоточивости у него не наблюдалось. Далее к пробе плазмы пациента были добавлены (по отдельности) все известные факторы свертывания человека, и с каждым из них не происходило коррекции времени свертывания, из чего был сделан вывод о том, что у Хагемана отсутствует неизвестный фактор свертывания, который он и назвал его именем [1]. XII фактор существует в 2 формах: профермент и активированный белок (XIIa). Переход его в активную форму осуществляется в плазме при контакте с отрицательно заряженной поверхностью: это либо чужеродные микроорганизмы (вирусы, бактерии, грибы, паразиты), либо искусственная поверхность (катетер, стекло, инородный



предмет) [2]. Фактор XII представляет собой гликопротеин 80 кДа, синтезируется в основном в печени, есть данные о синтезе фактора лейкоцитами [3]. Распространенность данного дефицита точно не установлена и составляет, по различным источникам, приблизительно 1 на 1 000 000 [4]. Согласно последним данным литературы, многие случаи остаются недиагностированными и чаще всего выявляются по случайному обнаружению удлинённого АЧТВ. Врожденный дефицит наследуется по аутосомно-рецессивному типу, в одной семье был описан случай аутосомно-доминантного наследования. Гомозиготы, как правило, имеют очень низкие или неопределяемые уровни активности фактора XII, у гетерозигот уровни активности фактора составляют 20–60% от нормы. Гетерозиготность по дефициту FXII была зарегистрирована у 1,5–3,0% здоровых доноров крови [11]. Было идентифицировано около 30 мутаций гена фактора XII. Частота полиморфизма 46С/Т фактора XII высока (73%) у японцев и китайцев, у которых уровень фактора XII ниже, чем у представителей других этнических групп (20%) [10].

Установлено, что фактор Хагемана, прекалликреин (фактор Флетчера) и высокомолекулярный кининоген (фактор Фитцджеральда) являются контактными факторами, которые инициируют «внутренний путь свертывания», контролируемый в лабораторной практике тестом АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время). Дефицит любого из этих факторов может удлинять АЧТВ, но не приводит к клинически значимым кровотечениям, так как ни один из этих факторов не является необходимым для гемостаза *in vivo*. Их дефицит протекает бессимптомно и не проявляется с детского возраста. Благодаря тому, что в организме существует еще «внешний путь свертывания», активация FXII через FVII/TF, которая приводит к образованию тромбина, принято считать, что риск периоперационного кровотечения у пациентов с дефицитом фактора FXII низкий. Швейцарские ученые, проанализировав данные 74 пациентов с дефицитом фактора FXII, пришли к выводу, что он не ассоциирован с повышенной кровоточивостью и, соответственно, не требует никакой терапии и разработки специфического препарата [4].

Таким образом, можно сделать вывод, что фактор XII не играет важной роли в остановке кровотечений. Некоторые исследования показали, что фактор XII может являться критическим инициатором тромбоза на искусственных поверхностях, таких как катетеры, которые преимущественно изготавливаются из полиуретанов, политетрафторэтилена [5]. Кроме того, FXII также может играть важную протромботическую роль в определенных группах пациентов, таких как пациенты с явными протромботическими состояниями: атеросклероз, тяжелые бактериальные инфекции [5].

Следующим вопросом, который заинтересовал ученых, было влияние протективного эффекта дефицита XII фактора на риск образования венозных и артериальных тромбозов без сопутствующих геморрагических проявлений. По данным исследований, проведенных на мышах, дефицит XII фактора, а также прекалликреина и высокомолекулярного кининогена связан со сниженным риском тромбоза без повышенной кровоточивости [6]. В эксперименте, проведенном в 2005 г. на мышах, было показано, что дефицит XII фактора защищает от образования артериальных, венозных тромбозов, а также ишемического инсульта [7]. Дефицит XII фактора уменьшает формирование тромба и в артериальных, и в венозных моделях тромбоза без очевидного эффекта на нормальный гемостаз [8]. Хотя мыши с дефицитом фактора FXII при определенных условиях эксперимента были защищены от тромбоза, было отмечено,

что люди с дефицитом фактора XII имеют более высокий риск развития ишемической болезни сердца. К настоящему времени в литературе существуют противоречивые данные о связи между дефицитом фактора XII и тромбозом.

Открытие протективного эффекта дефицита XII фактора на риск образования венозных и артериальных тромбозов без сопутствующих геморрагических проявлений послужило стимулом для разработки препарата ингибитора фактора XIIa – rNA-Infestin-4. В 2014 г. Yiming Xu et al. провели исследование применения rNA-Infestin-4 на кроликах и крысах с оценкой влияния на формирование тромба. Результатами его показано, что rNA-Infestin-4 вызывает дозозависимое и заметное уменьшение массы тромба в модели тромбоза (артериовенозный шунт), сопровождающееся минимальными геморрагическими осложнениями. Таким образом, угнетение фактора XIIa препаратом rNA-Infestin-4 может иметь выраженный антитромботический эффект без оказания влияния на гемостаз, и в дальнейшем возможно его клиническое применение, например, при лечении пациентов с длительно персистирующими центральными венозными катетерами и другими факторами риска тромбоза [9].

Дефицит FXII вызывает изолированное удлинение АЧТВ, так как он является первым фактором, который активируется, когда плазма пациента подвергается контактному воздействию активатора. Тест АЧТВ требует наличия функционирующего фактора FXII в пробирке для последующей активации FXI. При этом, по данным коагулограммы ПВ, ТВ остается в пределах нормы. В условиях лаборатории при обнаружении изолированно удлиненного АЧТВ вначале необходимо провести коррекцию АЧТВ путем смешивания плазмы пациента с нормальной плазмой в соотношении 1:1. Через 2 часа измеряется АЧТВ полученной смеси и рассчитывается ИЦА (Index of Circulating Anticoagulant, index Rosner), или индекс циркулирующего антикоагулянта (ИЦА) [12]. Расчет проводится по формуле

$$\text{ИЦА} = \frac{\text{АЧТВ сек (mix)} - \text{АЧТВ сек (норма)}}{\text{АЧТВ сек (пациента)}} \times 100\%.$$

ИЦА < 15 % – считать коррекцией = истинный дефицит факторов;

ИЦА > 15% – не считать коррекцией = ингибитор.

Диагностическая специфичность этого расчетного показателя составляет 98–100%, диагностическая чувствительность – 55–68%. Необходимо отметить, что для коррекции АЧТВ достаточно 30–50% активности факторов свертывания. Если результат корректируется до нормы, это свидетельствует о наличии дефицита факторов свертывания. Далее проводится определение фактора с использованием теста модифицированного АЧТВ с плазмой, дефицитной по фактору FXII. Прежде чем поставить диагноз дефицита фактора XII у амбулаторного пациента с синдромом изолированно удлиненного АЧТВ (СИУ АЧТВ), рекомендуется собрать индивидуальный и семейный анамнез, чтобы исключить возможность дефицита FXI, FIX, FVIII и vWF, наличие специфических ингибиторов свертывания (чаще к FVIII, FIX), наличие волчаночного антикоагулянта (ВА) и прием антикоагулянтной терапии. Низкие уровни FXII также могут определяться у пациентов с патологией печени.



Нами на базе лаборатории гемостаза Минского клинического консультативно-диагностического центра (МККДЦ) было проведено исследование образцов крови пациентов амбулаторного профиля с синдромом изолированно удлиненного АЧТВ с целью изучения причины удлинения АЧТВ и разработки алгоритма лабораторной диагностики при СИУ АЧТВ в амбулаторной практике.

В течение 3 лет для выявления причин удлинения свертывания крови (2020–2022 гг.) было исследовано 214 образцов плазмы пациентов с СИУ АЧТВ, проведено 396 исследований фактора свертывания FXII.

Были выявлены следующие причины СИУ АЧТВ: волчаночный антикоагулянт (ВА), $n=118$ (55%); дефицит FXII, $n=53$ (25%); болезнь Виллебранда, $n=14$ (7%); гемофилия А, $n=11$ (5%); гемофилия В, $n=11$ (5%); дефицит FXI, $n=7$ (3%) (рис. 1).

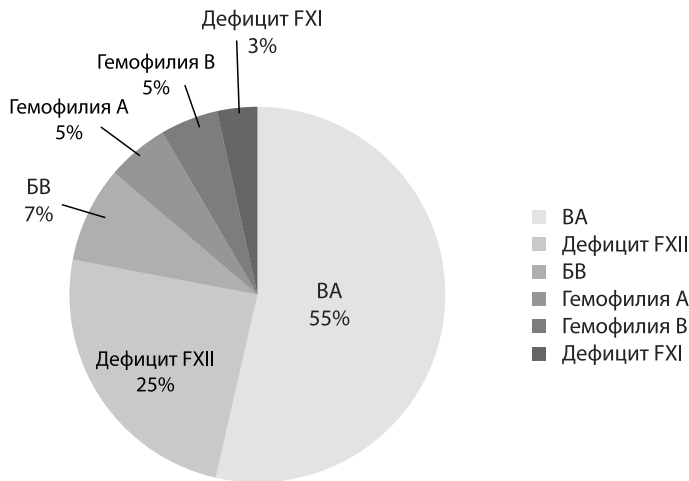


Рис. 1. Распределение по частоте выявленных причин изолированно удлиненного АЧТВ
Fig. 1. Distribution by frequency of identified causes of isolated prolonged APTT

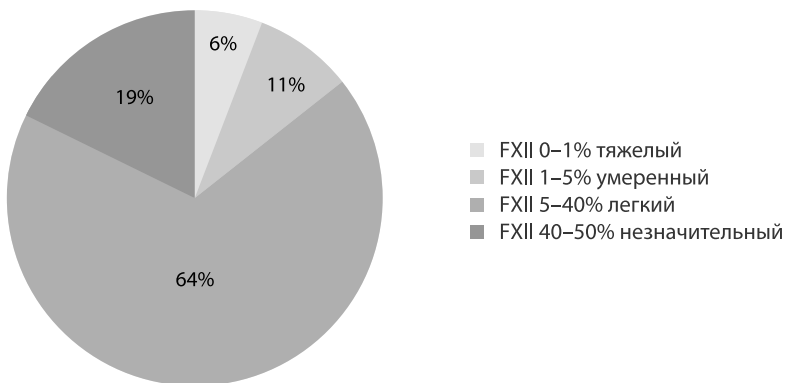


Рис. 2. Распределение по степени тяжести дефицита XII фактора свертывания
Fig. 2. Distribution by severity of clotting factor XII deficiency

Дефицит FXII фактора свертывания (фактора Хагемана) – редкая коагулопатия или частая лабораторная находка?

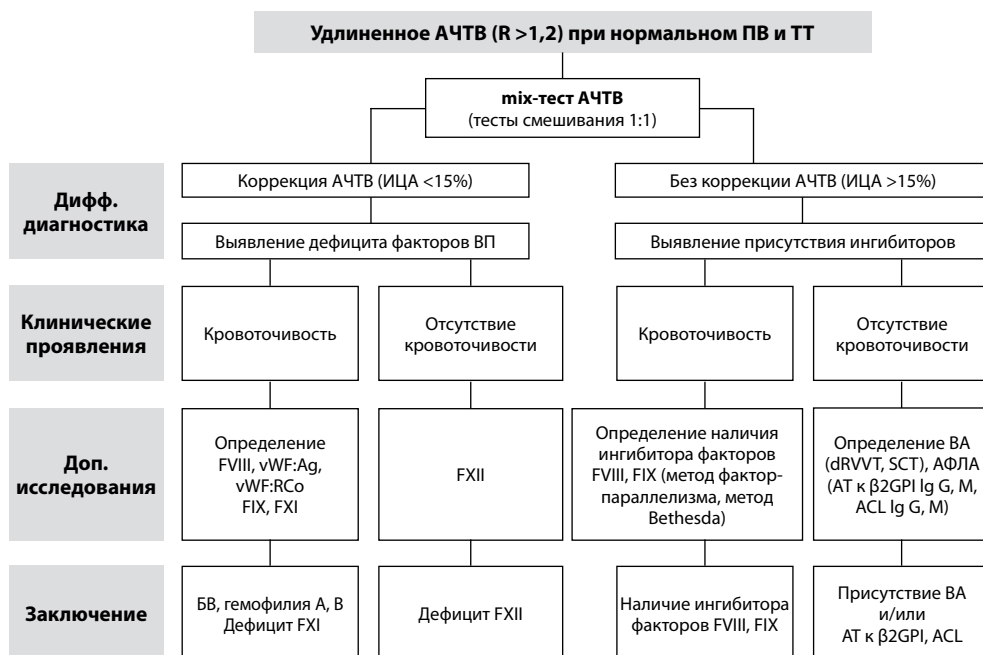


Рис. 3. Алгоритм лабораторной диагностики СИУ АЧТВ в МККДЦ: ИЦА – индекс циркулирующего антикоагулянта (расчет по формуле), ВП – внутренний путь, vWF – фактор Виллебранда, dRVVT – тесты на ВА с ядом гадюки Рассела, SCT – тесты на ВА с кремниевым активатором, ВА – волчаночный антикоагулянт, АФЛА – антифосфолипидные антитела, АТ – антитела, ACL – антитела к кардиолипину

Fig. 3. The algorithm of laboratory diagnostics of isolated prolonged APTT in the Minsk Clinical Consultative and Diagnostic Center: ICA – Index of Circulating Anticoagulant (calculated by formula), VP – internal pathway, vWF – Willebrand factor, dRVVT – tests for LA with Russell’s viper venom, SCT – tests for LA with silicon activator, LA – lupus anticoagulant, APLA – antiphospholipid antibodies, AT – antibodies, ACL – antibodies to cardiolipin

По степени тяжести дефицита ФСК FXII распределение было следующим: 0–1% (тяжелый дефицит), n=3; 1–5% (умеренный дефицит), n=6; 5–40% (легкий), n=34; незначительное снижение (40–50%) FXII выявлено у 10 человек (рис. 2).

На основании полученных данных были внесены изменения в алгоритм лабораторного диагностического поиска при изолированно удлиненном АЧТВ в Минском клиническом консультативно-диагностическом центре (рис. 3). Интерпретация значения пролонгированного АЧТВ является как лабораторной, так и клинической процедурой. Существенное значение для определения схемы дальнейшего обследования имеют такие факторы, как кровотечения в анамнезе и наличие или отсутствие кровоточивости в текущий период. Особое значение при этом имеет клиническое определение геморрагического статуса пациента (шкала ISTH (International Society on Thrombosis and Hemostasis), 2005, – балльная шкала оценки риска геморрагического синдрома согласно рекомендациям Международного общества по тромбозу и гемостазу).



■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Частота встречаемости дефицита FXII у представителей населения до конца не исследована. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в первую очередь при положительном тесте коррекции удлинённого АЧТВ (нормализация при добавлении контрольной плазмы) и при отсутствии геморрагического синдрома необходимо исключить дефицит FXII, так как он является наиболее частой причиной (помимо присутствия волчаночного антикоагулянта (ВА)) удлинённого АЧТВ в амбулаторной практике.

Решение о целесообразности внедрения специализированных алгоритмов диагностики в каждом конкретном ЛПУ должно быть основано на анализе собственной статистики. Применение таких алгоритмов позволяет ставить предварительный диагноз «из одной пробирки» и избегать направления пациента на повторную сдачу анализов, что повышает эффективность диагностики и к тому же экономит время и средства.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ratnoff O.D., Colopy J.E. A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *J Clin Invest.* 1955;34:602–13. PMID: 14367514
2. Colman R.W., Schmaier A.H. Contact activation: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood.* 1997;90:3819–43. PMID: 9354649
3. Stavrou E.X., Fang C., Bane K.L., Long A.T., Naudin C., Kucukal E., Gandhi A., Brett-Morris A., Mumaw M.M., Izadmehr S., Merkulova A., Reynolds C.C., Alhalabi O., Nayak L., Yu W.-M., Qu C.-K., Meyerson H.J., Dubyak G.R., Gurkan U.A., Nieman M.T., Gupta A.S., Renné T., Schmaier A.H. Factor XII and uPAR upregulate neutrophil functions to influence wound healing. *J Clin Invest.* 2018;128:944–59. PMID: 29376892
4. Lämmle B., Wuillemin W.A., Huber I., Krauskopf M., Zürcher C., Pflugshaupt R., Furlan M. Thromboembolism and bleeding tendency in congenital factor XII deficiency – a study on 74 subjects from 14 Swiss families. *ThrombHaemost.* 1991;65(2):117–21. PMID: 1905067
5. Yau J.W., Stafford A.R., Liao P., Fredenburgh J.C., Roberts R., Weitz J.I. Mechanism of catheter thrombosis: comparison of the antithrombotic activities of fondaparinux, enoxaparin, and heparin in vitro and in vivo. *Blood.* 2011;118(25):6667–74. PMID: 21937693
6. Renné T., Pozgajová M., Grüner S., Schuh K., Pauer H.-U., Burfeind P., Gailani D., Nieswandt B. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med.* 2005;202:271–81. PMID: 16009717
7. Merkulov S., Zhang W.-M., Komar A.A., Schmaier A.H., Barnes E., Zhou Y., Lu X., Iwaki T., Castellino F.J., Luo G., McCrae K.R. Deletion of murine kininogen gene 1 (mKng1) causes loss of plasma kininogen and delays thrombosis. *Blood.* 2008;111:1274–81. PMID: 18000168
8. Revenko A.S., Gao D., Crosby J.R., Bhattacharjee G., Zhao C., May C., Gailani D., Monia B.P., MacLeod A.R. Selective depletion of plasma prekallikrein or coagulation factor XII inhibits thrombosis in mice without increased risk of bleeding. *Blood.* 2011;118(19):5302–11. PMID: 21821705
9. Florinsky D.B., Zharkov P.A. Rare coagulopathy. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology.* 2020;7(3):54–63.
10. David Gailani., Allison P. Wheeler., and Anne T. Neff. Rare coagulation factor deficiencies. *Blood.* 2018;137(7):2034–2050.
11. Miguel A. Escobar MD. Less Common Congenital Disorders of Hemostasis. *Consultative Hemostasis and Thrombosis.* 2019;4(4):59–79.
12. Kumano O., Ieko M., Naito S., Yoshida M., Takahashi N., Aoki T. Index of circulating anticoagulant cut-off value establishment in activated partial thromboplastin time mixing test for lupus anticoagulant diagnosis. *J Thromb Haemost.* 2013;11:1919–22.



Зуховицкая Е.В.¹, Кабаева Е.Н.²✉, Цвирко Д.Г.²

¹Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

²Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения
Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура: этиопатогенез, диагностика и терапия (обзор)

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Зуховицкая Е.В. – концепция и дизайн, систематический поиск литературы, написание текста; Кабаева Е.Н. – концепция и дизайн, систематический поиск литературы, написание текста; Цвирко Д.Г. – концепция и дизайн, редактирование статьи, написание резюме.

Подана: 04.04.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: kate_kabaeva@mail.ru

Резюме

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура – одна из тромботических микроангиопатий. В основе патогенеза заболевания лежат наследственный или, чаще, приобретенный дефицит плазменной металлопротеиназы ADAMTS-13, накопление гигантских мультимеров фактора Виллебранда, активация тромбоцитарного тромбообразования, блокада микроциркуляции в органах, тромбоцитопения потребления, микроангиопатическая гемолитическая анемия.

Лабораторная диагностика тромботической тромбоцитопенической пурпуры наряду с оценкой клинической симптоматики, выявлением тромбоцитопении и лабораторных маркеров внутрисосудистого гемолиза неиммунного генеза базируется на обнаружении дефицита ADAMTS-13, наличия и титра его иммунного ингибитора.

Терапия заболевания базируется на применении плазмообмена в сочетании с иммуносупрессивной терапией глюкокортикостероидами и ритуксимабом, а также на применении препаратов, блокирующих взаимодействие тромбоцитов с фактором Виллебранда.

Ключевые слова: тромботические микроангиопатии, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, ADAMTS-13, плазмообмен, иммуносупрессивная терапия



Zukhovitskaya H.¹, Kabayeva K.²✉, Tsvirko D.²

¹Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

²Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Etiopathogenesis, Diagnosis and Therapy (A Review)

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Zukhovitskaya H. – concept and design, systematic literature search, writing the text; Kabayeva K. – concept and design, systematic literature search, text writing; Tsvirko D. – the concept and design, editing the article, writing an abstract.

Submitted: 04.04.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: kate_kabaeva@mail.ru

Abstract

Thrombotic thrombocytopenic purpura is one of the thrombotic microangiopathies. The pathogenesis of the disease is based on hereditary or more often acquired deficiency of plasma metalloproteinase ADAMTS-13, accumulation of giant von Willebrand factor multimers, activation of platelet thrombus formation, blockade of microcirculation in organs, consumption thrombocytopenia, microangiopathic hemolytic anemia. The diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura, along with the assessment of clinical symptoms, the detection of thrombocytopenia and laboratory markers of non-immune intravascular hemolysis, is based on the detection of ADAMTS-13 deficiency, the presence and titer of its immune inhibitor. Therapy of the disease is based on the use of plasma exchange in combination with immunosuppressive therapy with glucocorticosteroids and rituximab, as well as on the use of drugs that block the interaction of platelets with von Willebrand factor.

Keywords: thrombotic microangiopathy, thrombotic thrombocytopenic purpura, ADAMTS-13, plasma exchange, immunosuppressive therapy

■ ВВЕДЕНИЕ

Тромботические микроангиопатии (ТМА) представляют собой гетерогенную группу заболеваний, имеющих различный патогенез, но сходные клинические проявления: неиммунная микроангиопатическая гемолитическая анемия (МАГА), тромбоцитопения потребления и ишемические повреждения органов, связанные с поражением сосудов микроциркуляторного русла (чаще всего – почек и головного мозга, реже – сердца, легких, печени, поджелудочной железы, кишечника, а также кожи и глаз) с возможностью развития полиорганной недостаточности [1].

Актуальность проблемы ТМА обусловлена ростом распространенности этой формы патологии в мире, неблагоприятным прогнозом при естественном течении (тяжелое или катастрофическое течение с быстрым развитием терминальной почечной или полиорганной недостаточности). ТМА в акушерской практике ассоциирована с высокой материнской и перинатальной смертностью. ТМА – основная

причина острого повреждения почек во время беременности и в послеродовом периоде и характеризуется неблагоприятным почечным прогнозом (75% пациенток, перенесших ТМА, в течение года достигают терминальной ХПН и гемодиализа) [2]. Немаловажный негативный фактор – недостаточная информированность врачей (по данным немецкого регистра, своевременная диагностика атипичного гемолитико-уремического синдрома (аГУС) – менее недели – была у 30% пациентов) [3].

ТМА – группа заболеваний, объединенных общностью клинических проявлений и гистологической картиной поражения микроциркуляторного русла, различающихся по патогенетическим механизмам [2, 3].

Клинические проявления ТМА: микроангиопатическая гемолитическая анемия неиммунного генеза (механический гемолиз) с высоким уровнем активности (содержания) ЛДГ, низким уровнем гаптоглобина, шизоцитозом; ишемическое поражение внутренних органов как результат блокады микроциркуляции (поражение почек, ЦНС, сердца, кишечника); тромбоцитопения потребления и кровоточивость.

Гистологическая картина ТМА состоит в повреждении эндотелия в виде отека эндотелиальных клеток, их отслойке от базальной мембраны, расширении субэндотелиального пространства и отложении в нем детрита и фибрина; в артериолах и капиллярах образуются тромбы – вплоть до полной их окклюзии. Морфологические изменения неспецифичны и одинаковы при различных формах ТМА [1, 2].

ТМА классифицируют на первичные и вторичные.

Тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП), в основе которой лежит тромбообразование в микроциркуляторном русле органов и тканей, опосредованное сверхкрупными мультимерами фактора фон Виллебранда (ФВ) в условиях дефицита металлопротеиназы ADAMTS-13 (активность <10%). Первичная ТТП может быть наследственной (синдром Апшоу – Шульмана) – результат генетически детерминированного дефицита ADAMTS-13 (5% от всех случаев ТТП) – и приобретенной. Приобретенная ТТП – это иммуноопосредованная форма вследствие выработки антител к металлопротеиназе ADAMTS-13 [4].

К первичным ТМА также относят типичный гемолитико-уремический синдром (ГУС), который может быть вызван кишечной инфекцией, так называемый STEC-ГУС – наиболее частая форма, на долю которой приходится почти 90% случаев заболевания [4, 5]. Другой вариант ГУС – это атипичный гемолитико-уремический синдром, в основе которого лежит неконтролируемая активация системы комплемента.

Вторичные ТМА связаны с беременностью и родами (преэклампсия/эклампсия, HELLP-синдром), аутоиммунными заболеваниями (антифосфолипидный синдром, системная красная волчанка); злокачественными опухолями, инфекциями (ВИЧ, грипп А (H1N1), SARS-CoV-2, сепсис, септический шок), трансплантацией органов и тканей, лекарственной терапией (противоопухолевые препараты и иммунодепрессанты, пероральные контрацептивы, антитромбоцитарные препараты и др.) [5, 6].

■ ТРОМБОТИЧЕСКАЯ ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКАЯ ПУРПУРА

Эпидемиология ТТП

Первичная заболеваемость ТТП составляет от 2 до 6 случаев на 1 млн в год в общей популяции. Пик заболеваемости приходится на возраст 30–50 лет, первый эпизод ТТП редко встречается у лиц моложе 18 лет (около 10%), женщины заболевают чаще, особенно афроамериканки (соотношение мужчин к женщинам 1:3,5).



Предрасполагающими факторами являются также ожирение, HLA-DRB1*11. Летальность при своевременной и современной терапии (терапевтический плазмообмен, глюкокортикостероиды и ритуксимаб) снизилась с 90% до 10–20%. Риск рецидива заболевания составляет 40% [7].

Патогенез ТТП

Функция металлопротеиназы ADAMTS-13 состоит в расщеплении гигантских мультимеров фактора Виллебранда (ФВ), обладающих высокой тромбоцитарной активностью и тромбогенной активностью, на более мелкие фрагменты, циркулирующие в крови. На фоне дефицита ADAMTS-13 происходит накопление гигантских мультимеров ФВ и неконтролируемое тромбоцитарное тромбообразование с блокадой микроциркуляторного русла, ишемическими повреждениями тканей и органов, развитием тромбоцитопении потребления и повреждением эритроцитов в заблокированных микротромбах сосудах (рис. 1).

ADAMTS-13 поступает в кровоток из печени, кроме того, синтезируется в эндотелиальных клетках, подоцитах и клетках глии. Время полужизни составляет 2–3 дня. Концентрация его в плазме 0,7–1,4 мг/л. Субстратом ADAMTS-13 является только ФВ. В норме активность ADAMTS-13 составляет 80–100%. Для связывания ФВ с ADAMTS-13 необходимо, чтобы молекула ADAMTS-13 развернулась, а это происходит только в микрососудах с высокой скоростью кровотока (мозг, сердце). ADAMTS-13 инактивируется тромбином и фактором XI. Снижение активности ADAMTS-13 <10% наблюдается при приобретенной ТТП, его снижение <5% – при синдроме Апшоу – Шульмана. Снижение ADAMTS-13 <50% наблюдается при сепсисе, опухолях, трансплантации, остром панкреатите, ДВС крови, циррозе печени, аутоиммунных заболеваниях [7].

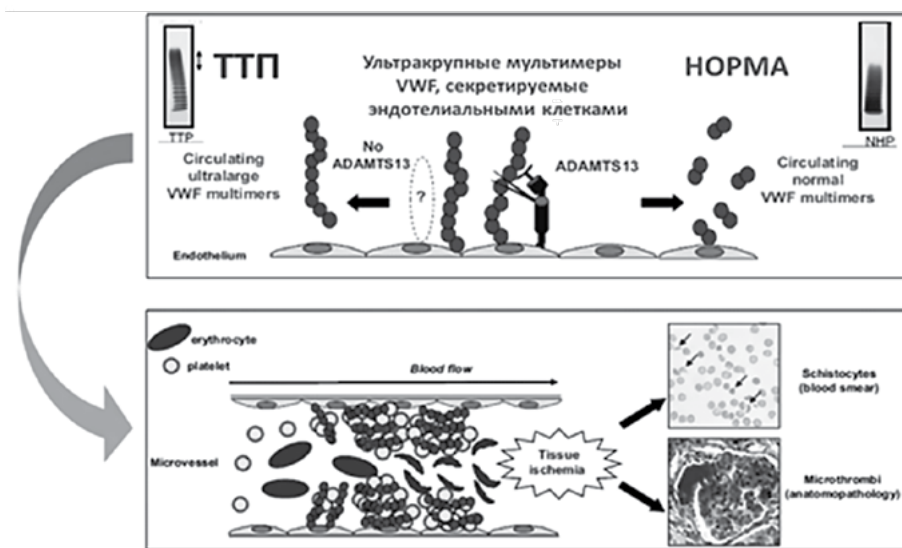


Рис. 1. Патогенез ТТП
Fig. 1. Pathogenesis of TTP

В основе тяжелого дефицита ADAMTS-13 лежит образование антител к ADAMTS-13 (иммунная ТТП) или мутации гена, кодирующего ADAMTS-13. По данным французского регистра, включающего 772 взрослых пациентов с ТТП, идиопатическая ТТП составила 49%, а 51% – вторичная ТТП, вызванная разными причинами. Из них на долю инфекций как провоцирующего фактора пришлось 12%, аутоиммунных заболеваний – 11,5%, беременности – 9%, онкологии – 8%, трансплантации органов и костного мозга – 3,5%, ВИЧ – 3% и лекарственных препаратов – 1,5%. Одним из механизмов развития ТТП является увеличение секреции ФВ из эндотелиоцитов. К числу факторов, усиливающих секрецию ФВ, относят активные формы кислорода и тромбин [7, 8]. При ТТП поражение происходит прежде всего в тех органах, где есть высокая скорость кровотока (напряжение сдвига), к ним относятся сердце и головной мозг, именно в этих органах с высокой скоростью кровотока происходит раскрытие конформационной структуры молекулы ADAMTS-13 и взаимодействие с ней ингибиторных антител.

Формы ТТП

Врожденная форма ТТП, или синдром Апшоу – Шульмана, – генетически детерминированное аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное мутациями гена ADAMTS-13.

Иммуноопосредованная ТТП – это приобретенная форма ТТП, в основе патогенеза которой лежит появление антител к ADAMTS-13.

Первичная иммуноопосредованная ТТП – приобретенная форма ТТП, при которой не находят заболеваний или причин, вызвавших образование аутоантител к ADAMTS-13.

Вторичная иммуноопосредованная ТТП – приобретенная форма ТТП, при которой не выявляются заболевания (системная красная волчанка, ВИЧ, инфекция и др.) или причины (беременность, препараты и др.), приведшие к образованию антител к ADAMTS-13 [9, 10].

ТТП и беременность

Во время беременности отмечено снижение активности ADAMTS-13, наиболее выраженное во 2–3-м триместре. К концу беременности активность ADAMTS-13 составляет в среднем 52%. В исследовании на популяции здоровых беременных женщин было показано, что активность ADAMTS-13 после 36 недель может составлять 22–29% [10].

Именно поэтому в 80% случаев ТТП развивается во II–III триместрах (медиана 23 нед.), что связано с максимально высокими в этих сроках гестации показателями ФВ (200–500%) и минимальными значениями активности ADAMTS-13 (50%). Причем врожденная форма ТТП (синдром Апшоу – Шульмана) зачастую впервые проявляется на фоне беременности в условиях физиологического дефицита ADAMTS-13 [11].

Во французском исследовании было показано, что среди 67 беременных пациенток с подтвержденной ТТП синдром Апшоу – Шульмана встречался в 37%, а у первобеременных в 45%, это говорит о том, что генетический дефект может проявляться впервые только во время беременности [12].

Известно, что сниженная в I триместре активность ADAMTS-13 (<30%) в 3 раза повышает риск осложненного течения беременности и в 1,5 раза повышает риск



Таблица 1
Физиологическое снижение активности ADAMTS-13 при беременности

Table 1
Physiological decrease in ADAMTS-13 activity during pregnancy

Период	ADAMTS-13, % Среднее (разброс)	Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$ Среднее (разброс)
Небеременные женщины	74 (36–114)	282 (165–461)
6–11 нед.	47 (50–123)	282 (157–447)
12–16 нед.	72 (30–116)	255 (83–537)
17–23 нед.	65 (28–83)	252 (80–584)
24–28 нед.	61 (30–88)	271 (140–541)
29–35 нед.	65 (28–95)	285 (156–559)
36–40 нед.	68 (29–87)	277 (182–444)
Ранний послеродовый	52 (22–89)	292 (92–507)
Поздний послеродовый	102 (67–161)	301 (138–592)

выкидыша. Наличие анти-ADAMTS-13 антител повышает в 6,6 раза риск осложненного течения беременности, включая преэклампсию, и в 4,1 раза – риск выкидыша [12, 13]. У беременных с ТТП чаще по сравнению с небеременными с ТТП возникают неврологические осложнения и поражение сердца, выше риск летальности в 3,5 раза [12].

ТТП и сепсис

Самым частым провоцирующим фактором ТТП в исследованиях была инфекция, возбудителями которой были *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*. Описаны случаи сепсиса, вызванного *Acinetobacter baumannii*, осложнившегося ТТП, где активность ADAMTS-13 была низкой (<50%). Это связано со снижением синтеза ADAMTS-13 у септических пациентов, с одной стороны, и системным и постоянным выделением гигантских мультимеров ФВ под влиянием провоспалительных цитокинов, приводящим к потреблению ADAMTS-13, – с другой. При этом было показано, что активность ADAMTS-13 обратно коррелирует с тяжестью сепсиса [13].

В ретроспективном французском исследовании 165 пациентов с различными формами ТМА (ГУС, аГУС, ТТП) у 69% из них развитию ТМА предшествовала инфекция [14]. В этом исследовании авторы сделали вывод о том, что наиболее частой причиной ТМА с умеренным дефицитом ADAMTS-13 (11–40%) является сепсис. Умеренный дефицит ADAMTS-13 ассоциируется с плохим прогнозом и является маркером активности заболевания.

Диагностика ТТП

Диагностика ТТП основана на клинических и лабораторных данных (рис. 2).

В клинической картине ТТП главными являются микроангиопатический гемолиз (повышение активности либо содержания ЛДГ, ретикулоцитов, появление шизоцитов и снижение гаптоглобина при наличии отрицательной пробы Кумбса) и тромбоцитопения потребления. Классическая пентада (лихорадка, анемия, тромбоцитопения, неврологические нарушения и почечное повреждение) встречается только в 5%, а спектр поражения органов-мишеней и степень тяжести этого поражения

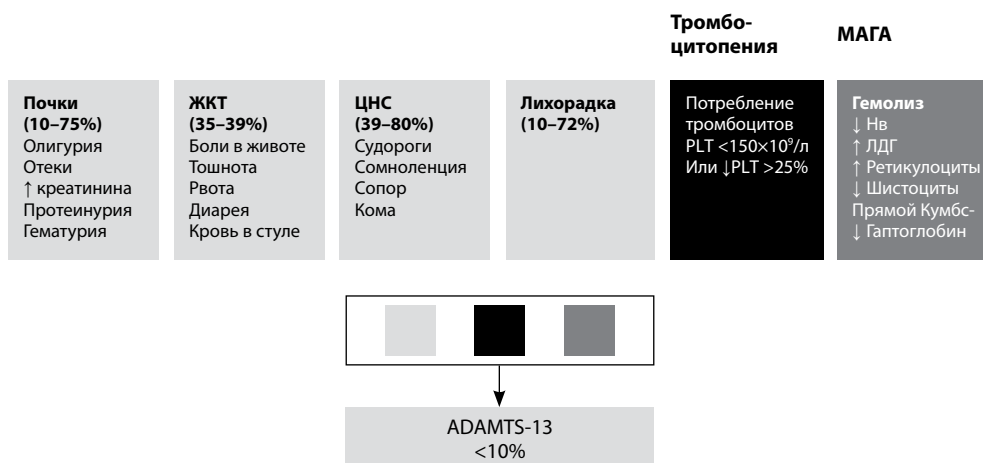


Рис. 2. Диагностика тромботической тромбоцитопенической пурпуры
Fig. 2. Diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura

чрезвычайно вариабельны. Обнаружение снижения активности ADAMTS-13 <10% позволяет подтвердить диагноз ТТП [8, 9].

Анемия, тромбоцитопения, геморрагический синдром встречаются при ТТП в 100% случаев. Выраженность геморрагического синдрома прежде всего связана с активностью ADAMTS-13. Чем ниже активность ADAMTS-13, тем более выражен геморрагический синдром. При ТТП поражаются органы с высокой скоростью кровотока, там, где создается высокое напряжение сдвига, необходимое для раскрытия конформационной структуры ADAMTS-13 [9]. Поражение сердца встречается в 100% случаев ТТП и прежде всего в виде увеличения тропонина, которое выявляется, по данным французских авторов, у 60% пациентов, появление жизнеугрожающих аритмий, ишемических повреждений миокарда [13]. Так же часто появляются неврологические нарушения: нарушение сознания (ступор и кома), появление галлюцинаций, судорог, афазии, выявление при МРТ ишемических инсультов, на фоне тромбоцитопении – геморрагических инсультов. Тяжесть неврологических нарушений связана с активностью ADAMTS-13.

Повреждение почек наблюдается у большинства пациентов, однако это повреждение редко достигает терминальной стадии почечной недостаточности.

При подозрении на ТТП прежде всего необходимо подтвердить неиммунный характер гемолиза (шизоцитоз, снижение гаптоглобина, обязательно отрицательная проба Кумбса) и нормальные показатели скрининговой коагулограммы. Необходим ежедневный контроль указанных параметров. Шизоциты – это фрагменты эритроцитов, подтверждающие микроангиопатический характер гемолиза, имеют размеры меньше, чем эритроциты, форму в виде полумесяца, шлема (каска), треугольника. Референсные значения шизоцитов при визуальном подсчете (глазами) 0–0,27%.

Кроме того, в ситуациях, когда нет возможности определения активности ADAMTS-13, для быстрой оценки клинической вероятности ТТП были созданы балльные шкалы (наиболее известны французская шкала и шкала PLASMIC), которые



Таблица 2
Диагностика ТТП
Table 2
Diagnosis of TTP

Параметры	French Score	Plasmic score	Баллы
Тромбоциты	<30×10 ⁹ /л	<30×10 ⁹ /л	+1
Креатинин сыворотки	<2,25 мг/дл	<2,0 мг/дл	+1
Гемолиз	*		+1
Непрямой билирубин	*	>34,2 мкмоль/л (2 мг/дл)	
Ретикулоцитоз	*	>2,5%	
Гаптоглобин	*	Не определяется	
Средний объем эритроцитов (MCV)	*	<9×10 ⁻¹⁴ /л (90 fl)	+1
МНО	*	<1,5	+1
Нет лечения от рака в течение последнего года	*	Да	+1
Нет трансплантации органов или ТГСК	*	Да	+1
Вероятность ADAMTS-13 <10% 0 баллов – 2% 1 балл – 70% 2 балла – 94% 0–4 балла – 0–4% 6 баллов – 5–24% 6–7 баллов – 62–82%			

включают несколько клинико-лабораторных параметров, оценка которых позволяет косвенно судить о наличии у пациента дефицита ADAMTS-13 <10% (табл. 2).

Основные принципы диагностики ТТП

Предположительный диагноз ТТП устанавливают на основании клинической картины микроангиопатической гемолитической анемии, тромбоцитопении потребления и поражения внутренних органов. Для ТТП характерны выраженная тромбоцитопения без тяжелого нарушения функции почек, повышение сывороточной концентрации ЛДГ, отрицательная прямая проба Кумбса, сниженное содержание гаптоглобина, шизоцитоз. При отсутствии какого-либо маркера обследование необходимо повторить через 24 ч.

Диагноз ТТП подтверждается при выявлении снижения активности ADAMTS-13 <10%. При активности ADAMTS-13 10–20% необходимо повторить обследование. Образцы плазмы на исследование должны быть взяты до начала трансфузий плазмы или плазмообмена.

Следующий этап – необходимо определение ингибитора ADAMTS-13. Для этого проводится тест смешивания, который можно выполнить в любой лаборатории. Тест смешивания – определение ингибитора в единицах Бетезда (BU). Одна единица Бетезда определяет содержание ингибитора в плазме крови пациента, который приводит к 50%-му снижению активности ADAMTS-13 в смеси равных объемов плазмы донора и реципиента после 2 часов инкубации при температуре 37 °С (норма <0,4 BU/мл). Используется также иммуноферментный метод определения антител класса

IgG к ADAMTS-13. Причем нужно помнить об отсутствии корреляции между содержанием антител к ADAMTS-13 и титром ингибитора ADAMTS-13.

Однако наличие антител к ADAMTS-13 не исключает наличия генетически детерминированной формы ТТП. Во французском исследовании, в котором участвовали 42 беременные с подтвержденной ТТП, у каждой четвертой наряду со снижением активности ADAMTS-13 определялась гетерозиготная мутация металлопротеиназы ADAMTS-13 [14]. Поэтому даже при наличии ингибитора ADAMTS-13, доказанной иммуноопосредованной формы ТТП, необходимо обследование пациентов на мутации гена ADAMTS-13 [14].

Варианты результатов и их интерпретация:

1. Нормальный уровень активности ADAMTS-13 ($\geq 68\%$) и отрицательный ингибитор ADAMTS-13 ($\leq 0,4$ IU): нет лабораторных доказательств ТТП.
2. Умеренное или легкое снижение активности ADAMTS-13 (30–67%) и отрицательный ингибитор ADAMTS-13 ($\leq 0,4$ IU): сомнительно наличие идиопатической ТТП по лабораторным данным и вероятно вторичная ТТП по другим клиническим причинам. Однако, если есть четкие клинические данные за идиопатическую ТТП, необходимо исследование аутоантител.
3. Легкое снижение ингибитора активности ADAMTS-13 (30–67%) и положительный ингибитор ADAMTS-13 ($\geq 0,4$ IU): подтверждает диагноз идиопатической ТТП или это эффект от терапии у пациентов с ТТП.
4. Снижение активности ADAMTS-13 ($< 30\%$) и положительный ингибитор ADAMTS-13 ($\geq 0,4$ IU): диагноз идиопатической ТТП.
5. Снижение активности ADAMTS-13 ($< 30\%$) и отрицательный ингибитор ADAMTS-13 ($\leq 0,4$ IU) – необходимо последующее исследование аутоантител к ADAMTS-13:
 - a) Положительный тест на аутоантитела к ADAMTS-13 (> 18 U/ml): диагноз идиопатической ТТП.
 - b) Отрицательный тест на аутоантитела к ADAMTS-13 (< 18 U/ml): можно предположить врожденный характер ТТП (нарушение структуры ADAMTS-13 носит генетически детерминированный характер и подтверждается генетическим исследованием).

Лечение ТТП

Достаточным основанием для начала терапии ТТП, не требующим подтверждения выявления дефицита ADAMTS-13, является подозрение на наличие заболевания (рис. 3).

Лечение ТТП начинается с пульс-терапии глюкокортикостероидами и плазмообмена (ПО). Именно ПО является тем краеугольным камнем, который поменял прогноз при ТТП. Это первый эффективный метод лечения, который на 80% увеличил выживаемость пациентов с ТТП. Механизмы действия ПО при ТТП [15]: удаление тромбогенных молекул, восполнение активности ADAMTS-13, восполнение дефицита естественных антикоагулянтов, в т. ч. ADAMTS-13, удаление крупных мультимеров ФВ, ингибиторов ADAMTS-13, свободного гемоглобина.

Но выполнение только ПО не приводит к выздоровлению, и у пациентов сохраняются различные расстройства [16] (табл. 3).

Как видно, у трети пациентов при применении только ПО наблюдается рецидив заболевания и у большинства пациентов активность металлопротеиназы остается

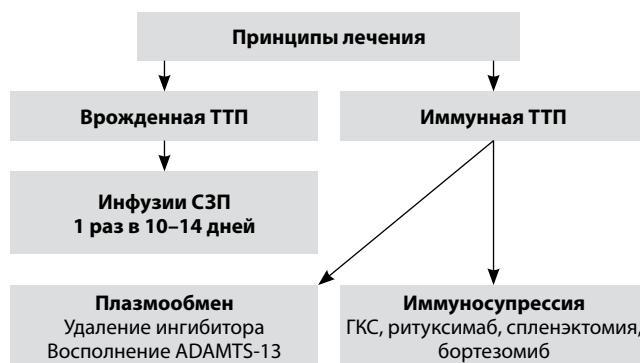


Рис. 3. Принципы лечения ТТП
Fig. 3. Principles of TTP treatment

Таблица 3
Расстройства, сохраняющиеся после проведения сеансов плазмообмена у пациентов с ТТП
(34 исследования из 11 стран, 1182 пациента с 1982 по 2013 г.)

Table 3
Disorders persisting after plasma exchange sessions in patients with TTP (34 studies from 11 countries, 1182 patients from 1982 to 2013)

Проявления	Частота
Артериальная гипертензия	2–45%
Умеренные нарушения СКФ	20%
Потребность в диализе	3–24%
Презеклампсия	24%
Ишемический инсульт	10–12%
Судороги	32%
Различные когнитивные нарушения	40–52%
Депрессии	52%
Рецидивы заболевания	8–37%
Активность ADAMTS-13 <10%	16–100%

низкой. Сохраняющаяся низкая активность ADAMTS-13 является фактором риска рецидива заболевания [17]. Для достижения длительной ремиссии необходимо назначать ритуксимаб 375 мг/м² 1 раз в неделю № 4 [17]. Ритуксимаб – это моноклональные антитела IgG против CD20 В-лимфоцитов. Ритуксимаб не является препаратом для лечения острой фазы ТТП. Основное назначение ритуксимаба – это предотвращение рецидивов. Ритуксимаб должен вводиться на фоне плазмообмена, но медиана уменьшения концентрации ритуксимаба после проведения ПО составляет 65%, поэтому дозу последнего надо увеличивать на 30%. Медиана времени элиминации ритуксимаба после окончания терапии составляет 5 мес. Среднее время достижения эффекта ПО в сочетании с ритуксимабом составляет 12 дней. При неэффективности ритуксимаба в качестве альтернативы может быть использован бортезомиб 1 мг/м² в 1, 4, 8, 11-й дни.

Однако, несмотря на ПО и иммуносупрессию, сохраняются риски тромботических осложнений (инфаркт миокарда, ишемический инсульт, ишемическое повреждение почек и т. д.), частота внезапной смерти может достигать 20%, вероятность непрогнозируемой рефрактерности к лечению до 42%, непрогнозируемых обострений – до 50% [17].

К настоящему времени зарегистрирован новый препарат для лечения ТТП – каплацизумаб – это моноклональное гуманизованное антитело, которое предотвращает дальнейшее образование микротромбов при ТТП за счет ингибирования связывания тромбоцитов с A1-доменом фактора Виллебранда через рецепторы тромбоцитов GP1ba [18]. Данный препарат вызывает более быстрое разрешение эпизода ТТП со значительно более коротким временем достижения ответа со стороны количества тромбоцитов, клинически значимое уменьшение частоты случаев смерти, связанных с ТТП, обострений ТТП или значимых тромбоэмболических явлений. В исследовании HERCULES было показано, что препарат позволяет значительно уменьшить частоту выполнения ПО и продолжительность нахождения в отделениях интенсивной терапии, снизить частоту рецидивов ТТП при продлении лечения основного заболевания до его разрешения при хорошем профиле безопасности препарата [18].

В отношении бессимптомного течения ТТП при остающейся низкой активности ADAMTS-13 после острого эпизода рекомендуется применение ритуксимаба профилактически 1 раз в 2 месяца вне беременности, а во время беременности – проведение профилактических ПО для предотвращения рецидива заболевания в период беременности [10, 11].

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Scully M. Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. *J Thromb Haemost.* 2017;15(2):312–322.
2. Azoulay E. Expert statement on the ICU management of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Intensive Care Med.* 2019;45:1518–1549.
3. Gavriliaki E, Anagnostopoulos A., Mastellos D.C. Complement in thrombotic microangiopathies: unrevealing Ariadne's thread into labyrinth of complement therapeutics. *Front Immunol.* 2019;10:337. doi: 10.3389/fimmu.2019.00337.
4. Besbas N. A classification of hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura, and related disorders. European Paediatric Research Group for HUS. *Kidney International.* 2006;70:423–431.
5. Aigner C. An updated classification of thrombotic microangiopathies and treatment of complement gene variant-mediated thrombotic microangiopathy. *Clinical Kidney Journal.* 2019;12(3):333–337. doi: 10.1093/ckj/sfz040.
6. Praga M., Cordoba R. Secondary atypical hemolytic uremic syndrome in the era of complement blockade. *Kidney Int.* 2019;95:1298–1300. doi: 10.1016/j.kint.2019.01.043*10.1016/j.kint.2019.01.043.
7. Reese J.A. Children and adults with thrombotic thrombocytopenic purpura associated with severe acquired Adams 13 deficiency comparison of incidence, demographic and clinical features. *J Thromb Haemost.* 2019;60:1432–1445.
8. Saha M., McDaniel J.K., Zheng X.L. Thrombotic thrombocytopenic purpura: pathogenesis, diagnosis and potential novel therapeutics. *J Thromb Haemost.* 2017;15:1889–1900.
9. Joly B.S., Coppo P., Veyradier A. An update on pathogenesis and diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Expert Rev Hematol.* 2019;12:383–395.
10. Zheng X.L. ISTH guidelines of diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2020;18:2486–2495. doi: 10.1111/ith.15006.
11. Rottenstreich A. Pregnancy and non-pregnancy related immune thrombotic thrombocytopenic purpura in women of reproductive age. *J Thromb Thrombolys.* 2021;51(1):187–193. doi: 10.1007/s11239-020-02133-4.
12. Sanchez-Luseros A. Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS 13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb Haemost.* 2004;92:1320–1336.
13. Coppo P. Predictive features of severe acquired ADAMTS 13 deficiency in idiopathic thrombotic microangiopathies: the French TMA reference center experience. *PLoS One.* 2010;5:e10208.
14. Moatti-Cohen M. Unexpected frequency of Upshaw – Schulman syndrome in pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2012;119:5888–5897.
15. Coppo P., Cuker A., George J.N. Thrombotic thrombocytopenic purpura: toward targeted therapy and precision medicine. *Res Pract Thromb Haemost.* 2019;3:26–37.
16. Falter T., Alber K.J., Scharer I. Long term outcome and sequelae in patients after acute thrombotic thrombocytopenic purpura episodes. *Hamostaseologie.* 2013;33(1):113–120.
17. Falter T. Relapse rate in survivors of acute autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura treated with or without rituximab. *Thromb Haemost.* 2018;118:1743–1752.
18. Scully M. Caplacizumab for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 2019;380:335–364.



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.4.008>
УДК 612.11:616-006



Соболева О.Е.^{1,2}✉, Тихонович О.Г.¹, Жогаль С.М.³, Шепетько М.Н.^{1,3}, Пашкевич С.Г.¹

¹ Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

² Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

³ Минский городской клинический онкологический центр, Минск, Беларусь

Оценка гематологических показателей крови у лабораторных мышей – опухоленосителей аденокарциномы Эрлиха

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: дизайн исследования, сбор материала – Соболева О.Е.; обсуждение и интерпретация материала – Жогаль С.М.; статистическая обработка материала – Тихонович О.Г.; концепция, написание текста – Шепетько М.Н.; редактирование – Пашкевич С.Г.

Подана: 05.04.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: soboleva.olga@iboch.by

Резюме

Введение. Разработка новых подходов к лечению онкологических заболеваний с использованием мышей – опухоленосителей аденокарциномы Эрлиха актуальна, поскольку данный аспект исследования позволяет получить адекватные, воспроизводимые результаты, имеющие перспективы применения в клинической практике. Однако анализ сведений из источников доступной научной литературы показал недостаточную изученность изменения гематологических показателей крови у лабораторных мышей-опухоленосителей.

Цель. Оценка особенностей изменения морфологической картины крови мышей – опухоленосителей карциномы Эрлиха при разных, удовлетворяющих требованиям проведения эксперимента, ее биологических моделях.

Материалы и методы. Исследование осуществлено на самках аутбредных мышей ICR и самцах инбредных мышей линии Af 2–3-месячного возраста, массой $20,0 \pm 2,0$ г. Экспериментальные группы были сформированы следующим образом: группа 1 – моделирование АКЭ проводили внутривентральным введением клеток аденокарциномы Эрлиха (в/в) самкам аутбредных мышей ICR ($n=20$); группа 2 – моделирование СКЭ проводили подкожным введением клеток аденокарциномы Эрлиха (п/к) самкам аутбредных мышей ICR ($n=20$); группа 3 – моделирование СКЭ проводилось подкожным введением клеток аденокарциномы Эрлиха (п/к) самцам инбредных мышей Af ($n=20$). Для перевивки опухоли был использован гипердиплоидный штамм аденокарциномы Эрлиха. Кровь забирали из лицевой вены мышей. Гематологические показатели определяли на автоматическом анализаторе URIT VET3000 Plus. Для подсчета лейкоцитарной формулы окрашенные по Романовскому – Гимзе мазки крови просматривали на световом микроскопе LEICA DM2500. Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Вилкоксона для зависимых выборок. Результаты между независимыми выборками анализировали с помощью критерия Манна – Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. В исследовании установлены гематологические критерии развития опухолевого процесса в период 14 суток после ксенотрансплантации клеток аденокарциномы Эрлиха в объеме 0,2 мл в количестве 2×10^6 морфологических единиц. В эксперименте на животных созданы модели асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) и ее солидной формы (СКЭ) у самок мышей линии ICR и самцов мышей линии Af. Кровь забирали из лицевой вены мышей два раза: первый раз до прививки опухоли и второй раз на 14-е сутки развития опухолевого процесса. Выделены зависимые и независимые ни от вида, ни от пола, ни от способа инокуляции клеток аденокарциномы Эрлиха изменения параметров морфологической картины крови экспериментальных животных.

Заключение. Ксенотрансплантация аденокарциномы Эрлиха мышам к 14-м суткам сопровождается следующими изменениями: в распределении эритроцитов по объему; среднем объеме тромбоцитов, распределении тромбоцитов по объему, количестве лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов и не оказывает влияния на уровень базофилов крови. Количественные показатели крови мышей-опухоленосителей перспективны для обоснования выбора тест-систем и сопоставления эффективности потенциальных противоопухолевых субстанций, способных повлиять на систему крови.

Ключевые слова: мыши, биомодели, асцитная карцинома Эрлиха, солидная карцинома Эрлиха, гематологические показатели крови, общее количество лейкоцитов, дифференциальные формы лейкоцитов

Soboleva O.^{1,2}✉, Tikhonovich O.¹, Zhogal S.³, Shapetska M.^{1,3}, Pashkevich S.¹

¹ Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

² Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

³ Minsk City Clinical Oncology Center, Minsk, Belarus

The Evaluation of Hematological Blood Parameters in Laboratory Mice Tumor Ehrlich's Adenocarcinoma Carrier

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study design, collection of material – Soboleva O.; discussion and interpretation of the material – Zhogal S.; statistical processing of the material – Tikhonovich O.; concept, writing of the text – Shapetska M.; editing – Pashkevich S.

Submitted: 05.04.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: soboleva.olga@iboch.by

Abstract

Introduction. The study of new approaches in the treatment of oncological diseases using Ehrlich adenocarcinoma mice is relevant and allows obtaining adequate, reproducible results that have prospects for application in clinical practice. However, the analysis of the sources of scientific literature showed a poor study of hematological blood parameters in laboratory mice-tumor carriers.



Purpose. Evaluation of the peculiarities of changes in the morphological picture of blood of Ehrlich carcinoma tumor-bearing mice under different, satisfying the requirements of the experiment, its biological models.

Materials and methods. The work was performed on female outbred ICR mice and male inbred Af mice aged 2–3 months, weighing 20.0 ± 2.0 g. The experimental groups were formed as follows: group 1 – EAC modeling was performed by intraperitoneal injection of Ehrlich adenocarcinoma cells to female outbred ICR mice ($n=20$); group 2 – ESC modeling was performed by subcutaneous injection of Ehrlich adenocarcinoma cells to female outbred ICR mice ($n=20$); group 3 – ESC modeling was performed by subcutaneous injection of Ehrlich adenocarcinoma cells to male inbred Af mice ($n=20$). A hyperdiploid strain of Ehrlich's adenocarcinoma was used for tumor transplantation. Blood was taken from the facial vein of mice. Hematological parameters were determined on an automatic analyzer URIT VET3000 Plus. To calculate the leukocyte count, Romanovsky – Giemsa-stained blood smears were examined using a LEICA DM2500 light microscope. Statistical processing was performed using the Wilcoxon t-test for dependent samples. The results between independent samples were analyzed using the Mann – Whitney test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results. Hematological criteria of the tumor process development in the period of 14 days after xenotransplantation of 0,2 ml Erlich adenocarcinoma cells in the amount of 2×10^6 morphological units were established in the research. We modeled Ehrlich ascites carcinoma (EAC) and its solid form (ESC) in female ICR mice and male ICR mice. Blood was collected from the facial vein of mice twice: the first time before tumor inoculation and the second time on the 14th day of tumor development. We distinguished the changes of the internal environment parameters which were dependent on neither species, nor sex, nor the way of Ehrlich adenocarcinoma cell inoculation.

Conclusion. Xenotransplantation of adenocarcinoma of Ehrlich into mice by 14 days is accompanied by the following changes in: red blood cell volume distribution; average volume of platelets, distribution of platelets by volume, the number of lymphocytes, neutrophils, eosinophils, and has no effect on the level of blood basophils. Quantitative blood indicators of tumor-bearing mice are promising for justifying the choice of test system and the effectiveness of the strategy for the effectiveness of antitumor substances capable of indicators in the blood system.

Keywords: mice, biomodels, Ehrlich ascitic carcinoma, Ehrlich solid carcinoma, hematological blood counts, total leukocyte counts, differential leukocyte forms

■ ВВЕДЕНИЕ

Обоснование применения субстанций или новых способов лечения онкологических заболеваний во многом основывается на адекватно выбранных биомоделях. Экстраполяция данных от животных к человеку часто подвергается критике; вместе с тем это один из важных этапов, позволяющих в перспективе разработать новые подходы к лечению. Поскольку срок жизни лабораторных животных, как правило, меньший, чем у человека, а скорость метаболизма выше, при обосновании выбора

биомодели руководствуются состоянием целевых физиологических или функциональных систем организма животного, а также жизненно важных органов, тканей, клеток, формирующих органы. Наиболее удобными в качестве биомоделей и для содержания в условиях вивариев являются крысы и мыши. К тому же хорошо известна их восприимчивость и способность к межвидовому переносу значительного количества заболеваний, встречающихся в популяции людей.

Для оценки течения онкологической патологии в эксперименте биомодель должна обладать следующими характеристиками: 1) иметь морфометрические показатели, сходные с показателями человека; 2) проявлять подобные физиологические и системные эффекты в ответ на различные виды воздействия; 3) включать гены и биохимические пути на всех стадиях развития опухолевого процесса аналогично человеческим; 4) клеточный ответ на противоопухолевую терапию у экспериментальных животных должен соответствовать таковому у человека [1]. В частности, Дж. Биттнер установил, что у некоторых млекопитающих эукринные и паракринные факторы, влияющие на развитие клеток рака молочной железы, имеют одинаковое происхождение, и в качестве примера приводится их схожая природа у мышей и человека [2]. Следовательно, мышинные модели продолжают оставаться наиболее подходящими для изучения процесса возникновения, развития, течения онкологического процесса, а также противоопухолевого воздействия различных субстанций. Асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ), которую выделили из спонтанного рака молочной железы мыши, является наиболее приемлемой экспериментальной опухолью для подобных исследований (солидную форму получили Эрлих и Аполант в 1905 г., а асцитную – Левенталь и Ян в 1932 г.) [3].

Для развития асцитных форм используют внутрибрюшинное введение перевиваемых культур опухолевых клеток, что сопровождается накоплением в брюшной полости экссудата, содержащего активно пролиферирующие опухолевые клетки и продукты их метаболизма. Для формирования солидной опухоли применяют подкожное введение перевиваемых культур опухолевых клеток. Исходный цитологический материал представлен клетками аденокарциномы молочной железы мыши [4].

В настоящее время для целей биомоделирования этот вид рака прививают мышам любой линии, в том числе беспородным, как внутрибрюшинно, так и подкожно. При этом прививаемость приближается к 100%. Случаев спонтанного исчезновения АКЭ с течением времени, как правило, не отмечается. Латентный период первых признаков манифестации составляет 4–6 сут., продолжительность жизни особи после прививки АКЭ составляет 7–16 сут. Известны данные о том, что экспериментальные животные с солидной формой карциномы Эрлиха живут дольше, чем с АКЭ. Число хромосом в клетках модального класса 44–46, при этом в клетках обнаруживаются маркерные хромосомы, типичные для АКЭ [5].

Следовательно, описанная выше биомодель может быть применена для изучения: свойств избирательной цитотоксичности традиционных и новых фармакологических агентов; уточнения особенностей их токсического воздействия, влияния на общий тканевой метаболизм; роли в дисрегуляции физиологических и функциональных систем организма, подавлении иммунитета; развития химиорезистентности, ассоциированной с высокой степенью злокачественности. Тем более известно,



что негативные побочные влияния химиопрепаратов иногда настолько превосходят базовый лечебный эффект, что приводят к лимитированию их применения [6].

Продемонстрированы перспективы применения в качестве противоопухолевой субстанции антагониста E-простаноидного рецептора 1 (EP1), SC19220, отдельно или в комбинации с ингибитором циклооксигеназы-2 – целекоксоб (СХВ) у мышей с солидной карциномой Эрлиха (СКЭ) – это сочетание предложено в качестве нового направления терапии рака молочной железы [7]. Показано, что продигиозины (красный внутриклеточный пигмент, образуемый граммотрицательными неспорообразующими энтеробактериями рода *Serratia*) обладают противоопухолевой активностью в отношении СКЭ, а в сочетании с 5-фторурацилом усиливают его ингибирующее действие на опухоль [8]. С использованием СКЭ установлены кардиопротекторные и противораковые эффекты карведилола в нанокapsулированном виде по отношению и к самой опухоли, и к противоопухолевому препарату – доксорубину, который повреждает сердце и может вызвать лекарственную устойчивость [9].

Следует отметить, что экспериментальное воспроизведение аденокарциномы Эрлиха используется не только для моделирования рака молочной железы. Для воспроизведения симптомов онкологических процессов легочной ткани и разработки новых стратегий лечения рака подкожно инокулируют $2,5 \times 10^6$ раковых клеток. В данной модели выявили, что комбинированное применение доксорубина и ингибитора аутофагии (хлорохин) частично предотвращает нарушение альвеолярной структуры, в том числе за счет снижения окислительного стресса [10].

Таким образом, реализация новых подходов в лечении онкологических заболеваний с использованием мышей – опухоленосителей аденокарциномы Эрлиха актуальна и позволяет получить адекватные, воспроизводимые результаты, имеющие перспективы применения в клинической практике.

Анализ источников научной литературы продемонстрировал недостаточную изученность гематологических показателей самок мышей ICR при моделировании СКЭ. В работе впервые выполнена оценка гематологических показателей мышечамцов высокораковой линии Af, у которых для подкожной инокуляции карциномы Эрлиха использовали свежезабранный асцит брюшной полости мышей – опухоленосителей аденокарциномы Эрлиха. Следует отметить, что линия Af характеризуется тем, что во второй половине жизни у интактных животных возникают спонтанные опухоли легких, число которых увеличивается под действием мутагенных и канцерогенных факторов.

Исследования направлены не только на уточнение диапазона нормальных значений параметров крови, но и анализ факторов, позволяющих обосновать новые подходы к применению и разработке новых биомоделей. В доступной научной литературе отсутствуют сведения о нормальном диапазоне гематологических показателей для выбранных групп животных. Кроме того, есть достаточно веские причины полагать значимым влияние условий содержания и использования кормов на данные показатели.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка особенностей изменения морфологической картины крови мышей – опухоленосителей карциномы Эрлиха при разных, удовлетворяющих требованиям проведения эксперимента, ее биологических моделях.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу выполнили на самках аутбредных мышей ICR разведения вивария Института биоорганической химии НАН Беларуси и самцах инбредных мышей линии Af 2–3-месячного возраста, массой $20,0 \pm 2,0$ г с соблюдением принципов биоэтики [11–13]. Животные находились в стационарных условиях вивариев при температуре $22 \pm 1,0$ °C со свободным доступом к воде и пище.

Для перевивки использовали гипердиплоидный штамм аденокарциномы Эрлиха [14]. Количество клеток вычисляли в камере Горяева [15].

Экспериментальные группы сформировали следующим образом:

- группа 1 – половозрелые (2–2,5 месяца, масса тела $20 \text{ г} \pm 10\%$) самки аутбредных мышей ICR. Моделирование АКЭ проводили внутрибрюшинным введением клеток аденокарциномы Эрлиха (в/б), $n=20$;
- группа 2 – половозрелые (2–2,5 месяца, масса тела $20 \text{ г} \pm 10\%$) самки аутбредных мышей ICR. Моделирование СКЭ проводили подкожным введением клеток аденокарциномы Эрлиха (п/к), $n=20$;
- группа 3 – половозрелые (2–2,5 месяца, масса тела $20 \text{ г} \pm 10\%$) самцы инбредных мышей Af. Моделирование СКЭ проводили путем подкожной инъекции клеток аденокарциномы Эрлиха (п/к), $n=20$.

Поддержание опухолевой линии осуществляли на мышах линии ICR путем перевивки неразведенного асцита, забранного от животного-донора и инокулируемого животному-реципиенту с интервалом в 9–11 сут. Инокуляцию опухоли мышам групп № 1–2 проводили в разведенном до концентрации 2×10^6 клеток виде, вводили в объеме 0,2 мл стерильного 0,9%-го изотонического раствора натрия хлорида (Институт биоорганической химии НАН Беларуси). Для группы № 3 асцит получали из брюшной полости мышей прошлой генерации опухолей после ее внутрибрюшинной прививки в дозе 6 млн клеток на мышь. Асцит забирали от животных на 12-е сутки роста опухоли. Полученный биоматериал перевивали подкожно в подлопаточную область спины мышей Af путем введения 2×10^6 клеток опухолевой взвеси в объеме 0,2 мл, свежезабранной из брюшной полости (Институт физиологии НАН Беларуси).

Кровь забирали из лицевой вены мышей в пробирки с ЭДТА К2: первый раз до инокуляции клеток аденокарциномы Эрлиха (у интактных животных); второй раз (точка «после») – у этих же животных на 14-е сутки после начала биомоделирования патологического процесса. Гематологические показатели определяли на автоматическом анализаторе URIT VET3000 Plus (URIT Medical Electronic Group Co., Ltd, Китай). Гематологический статус оценивали по следующим показателям: количество лейкоцитов (WBC); количество эритроцитов (RBC); концентрация гемоглобина (HGB); гематокрит (HCT); среднеклеточный объем эритроцита (MCV); среднеклеточный объем гемоглобина (MCH); среднеклеточная концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC); распределение эритроцитов по объему (RDW_CV); распределение эритроцитов по объему, стандартное отклонение (RDW_SD); количество тромбоцитов (PLT); MPV – средний объем тромбоцитов; распределение тромбоцитов по объему (PDW); тромбоцитокрит (PCT); коэффициент больших/крупных тромбоцитов (P_LCR); количество больших/крупных тромбоцитов (P_LCC).

Для подсчета лейкоцитарной формулы окрашенные по Романовскому – Гимзе [16] мазки крови просматривали на световом микроскопе LEICA DM2500 (Leica



Microsystems CMS GmbH, Германия). Изучали количество лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов, палочкоядерных нейтрофилов, эозинофилов, базофилов.

Данные анализировали в Excel, статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Statistica. Нормальность распределения выборки определяли критерием Шапиро – Уилка. Поскольку данные имели непараметрическое распределение, статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Вилкоксона для зависимых выборок. Результаты между независимыми выборками (группы 1–2) анализировали с помощью критерия Манна – Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 и 2 представлены данные, полученные после обработки гематологических показателей мышей экспериментальных групп. В модели АКЭ у самок мышей через 14 суток после инокуляции клеток аденокарциномы Эрлиха наблюдали достоверные отличия следующих гематологических показателей: RBC, HGB, HCT, MCHC, RDW_CV, PLT, MPV, PDW (табл. 1). Через 14 суток после моделирования СКЭ у самок мышей ICR отметили достоверные изменения в уровнях MCV, MCHC, RDW_CV, MPV, PDW, P_LCR и P_LCC (табл. 1), а у самцов мышей Af: MCV, MCH, MCHC, RDW_CV, MPV, PDW и PCT (табл. 2).

Сравнительный анализ количества эритроцитов (RBC) и концентрации гемоглобина (HGB) позволил установить достоверное их снижение на 14-е сутки в модели АКЭ в среднем в 1,3 раза ($p < 0,05$) у самок мышей. В случае моделирования СКЭ подобного эффекта в этот же временной период не установлено. Следует отметить, что и ксенотрансплантация аденокарциномы Эрлиха в модели СКЭ у самцов другой линии также не сопровождалась влиянием на уровень эритроцитов.

У самок мышей-опухоленосителей в модели АКЭ отмечено достоверное снижение гематокрита (HCT) в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с моделью СКЭ. У самцов линии Af на 14-е сутки после подкожного применения аденокарциномы Эрлиха также отсутствовали значимые изменения уровня гематокрита.

Среднеклеточные объемы эритроцитов (MCV) на 14-е сутки после ксенотрансплантации СКЭ как у самок, так и у самцов мышей значительно снижались. В модели АКЭ у самок мышей отмечена тенденция к изменению данного показателя.

У самок аутбредных мышей инокуляция опухоли на 14-е сутки не приводила к изменениям среднеклеточного объема гемоглобина (MCH), в то время как у инбредных самцов зарегистрировали значимое его снижение в модели СКЭ (с $17,08 \pm 0,25$ Пг до $16,45 \pm 0,60$ Пг, $p < 0,05$).

К 14-м суткам в модели СКЭ у самцов мышей зарегистрировали снижение ($p < 0,05$) среднеклеточной концентрации гемоглобина в эритроцитах (MCHC), а у самок в моделях АКЭ и СКЭ, наоборот, фиксировали значимый прирост данного показателя ($p < 0,05$).

Распределение эритроцитов по объему (RDW_CV) у самок мышей к 14-м суткам после моделирования АКЭ и СКЭ имело достоверные превышения по отношению к интактному контролю. При этом в модели СКЭ этот показатель был значительно ниже, чем в модели АКЭ. Для самцов мышей-опухоленосителей RDW_CV также возрастал (с $11,76 \pm 0,52\%$ до $12,59 \pm 0,60\%$, $p < 0,05$).

К 14-м суткам в модели АКЭ количество тромбоцитов (PLT) снижалось ($p < 0,05$), при этом в модели СКЭ показатель был близок к норме как у самок ICR, так и у самцов Af.

Средний объем тромбоцитов (MPV) и распределение тромбоцитов по объему (PDW) в исследуемый период развития опухолевого процесса значимо возрастали во всех трех экспериментальных группах ($p < 0,05$). При этом тромбоцитокрит (PCT) к 14-м суткам превышал норму интактных только в крови самцов мышей линии Af в модели СКЭ.

Коэффициенты отношения объема крупных тромбоцитов ко всему объему тромбоцитов (P_LCR) и количество крупных тромбоцитов (P_LCC) достоверно повышались ($p < 0,05$) на 14-е сутки регистрации у самок мышей только при СКЭ.

К 14-м суткам в модели АКЭ количество тромбоцитов (PLT) снижалось ($p < 0,05$), при этом в модели СКЭ показатель был близок к норме как у самок ICR, так и у самцов Af.

Средний объем тромбоцитов (MPV) и распределение тромбоцитов по объему (PDW) в исследуемый период развития опухолевого процесса значимо возрастали во всех трех экспериментальных группах ($p < 0,05$). При этом тромбоцитокрит (PCT) к 14-м суткам превышал норму интактных только в крови самцов мышей линии Af в модели СКЭ.

Таким образом, установлена зависимость изменений гематологических показателей крови у самок мышей-опухоленосителей от способа ксенотрансплантации

Таблица 1
Оценка гематологических показателей мышей-самок ICR до (интактные) и через 14 суток после внутрибрюшинной (АКЭ) или подкожной (СКЭ) инокуляции клеток аденокарциномы Эрлиха
Table 1

Evaluation of hematological parameters of female ICR mice before (intact) and 14 days after intraperitoneal (EAC) or subcutaneous (ESC) inoculation of Ehrlich adenocarcinoma cells

Показатель	Ед. изм.	Интактные	АКЭ на 14-е сутки	Интактные	СКЭ на 14-е сутки
		n=20		n=20	
RBC	10 ¹² /л	10,09±0,43	7,24±1,25*	9,65±0,80	9,58±0,95 [#]
HGB	г/л	159,33±9,03	121,44±20,34*	161,64±10,52	159,07±13,10 [#]
HCT	%	58,97±3,57	41,16±7,57*	58,26±3,96	56,45±4,96 [#]
MCV	Фл	58,52±3,28	57,89±3,16	60,59±3,65	58,97±3,46*
MCH	Пг	16,20±0,66	16,77±0,94	16,75±1,16	16,60±1,03
MCHC	г/л	271,00±3,28	295,56±6,31*	274,51±5,53	282,51±11,95*, [#]
RDW_CV	%	11,51±0,93	13,27±1,48*	11,70±1,04	12,32±1,19*, [#]
RDW_SD	Фл	32,22±1,60	33,44±1,85	33,17±2,38	32,65±2,19
PLT	10 ⁹ /л	1170,22±133,27	966,67±72,71*	1193,87±189,13	1142,74±244,58 [#]
MPV	Фл	4,62±0,25	5,32±0,49*	4,71±0,33	4,98±0,48*, [#]
PDW	Фл	5,37±0,30	6,09±0,48*	5,48±0,49	5,90±0,83*
PCT	%	0,52±0,05	0,52±0,07	0,55±0,08	0,56±0,11
P_LCR	%	1,69±1,01	3,42±1,08	2,02±1,04	3,00±1,87*
P_LCC	10 ⁹ /л	20,00±16,19	32,67±9,66	22,39±10,05	32,46±20,59*

Примечания: * различия статистически значимы в сравнении с соответствующими показателями у данных животных до инокуляции АКЭ ($p < 0,05$, t-критерий Вилкоксона); [#] различия статистически значимы между независимыми группами (критерий Манна – Уитни, $p < 0,05$).



Таблица 2

Оценка гематологических показателей мышей-самцов линии Af до (интактные) и через 14 суток подкожной (СКЭ) инокуляции клеток аденокарциномы Эрлиха

Table 2

Evaluation of hematological parameters of Af male mice before (intact) and after 14 days of subcutaneous (ESC) inoculation of Ehrlich adenocarcinoma cells

Показатель	Ед. изм.	Интактные мыши	СКЭ на 14-е сутки
		n=20	
RBC	10 ¹² /л	9,96±0,74	9,97±1,28
HGB	г/л	170,60±13,39	164,80±24,58
HCT	%	57,48±4,74	56,28±7,86
MCV	Фл	57,70±0,92	56,43±1,26*
MCH	Пг	17,08±0,25	16,45±0,60*
MCHC	г/л	296,50±3,53	292,10±3,37*
RDW_CV	%	11,76±0,52	12,59±0,60*
RDW_SD	Фл	31,64±1,07	31,67±1,48
PLT	10 ⁹ /л	1117,50±135,19	1268,90±305,91
MPV	Фл	5,24±0,39	5,40±0,38*
PDW	Фл	6,15±1,03	6,66±0,75*
PCT	%	0,57±0,07	0,67±0,13*
P_LCR	%	5,10±1,73	5,05±1,63
P_LCC	10 ⁹ /л	56,05±18,39	59,90±12,56

Примечание: * различия статистически значимы в сравнении с соответствующими показателями у данных животных до инокуляции АКЭ (p<0,05, t-критерий Вилкоксона).

аденокарциномы Эрлиха. Отмечены независимые от пола и вида животных изменения показателей клеточного состава крови на 14-е сутки после моделирования СКЭ: MCV, RDW_CV, MPV, PDW. Выделены независимые ни от вида, ни от пола, ни от способа инокуляции клеток аденокарциномы Эрлиха изменения исследуемых параметров внутренней среды организма: RDW_CV, MPV, PDW.

Выполнили анализ общего количества лейкоцитов и их дифференциальных форм в трех экспериментальных группах. Результаты суммированы в табл. 3 и 4.

Более чем в три раза (p<0,05) количества лейкоцитов у самок в модели АКЭ и в 1,5 раза (p<0,05) в модели СКЭ и отсутствие значимого эффекта у самцов в модели СКЭ свидетельствуют о большей чувствительности к ксенотрансплантации аденокарциномы Эрлиха у самок мышей линии ICR (табл. 3, 4).

Прирост количества лейкоцитов в модели АКЭ произошел вследствие резкого – в три раза (p<0,05) повышения уровня нейтрофилов на фоне значимого падения количества лимфоцитов (табл. 3). Причем сегментоядерные нейтрофилы становились преобладающей фракцией (p<0,05) к 14-м суткам развития АКЭ, прирост палочкоядерных нейтрофилов менее выражен, но имел статистическую значимость (p<0,05, табл. 3). В случае моделирования СКЭ уровень лейкоцитов повысился вследствие увеличения числа моноцитов в 1,5 раза (p<0,05, табл. 3).

В модели СКЭ у самцов линии Af к 14-м суткам развития опухолевого процесса снизилось число лимфоцитов, возросло количество нейтрофилов, особенно среди их палочкоядерной фракции, а также повысился уровень эозинофилов (p<0,05, табл. 4).

Таблица 3

Оценка общего количества лейкоцитов и их дифференциальных форм у мышей-самок ICR до (интактные) и через 14 суток после внутрибрюшинной (АКЭ) или подкожной (СКЭ) инокуляции клеток аденокарциномы Эрлиха

Table 3

Evaluation of the total number of leukocytes and their differential forms in female ICR mice before (intact) and 14 days after intraperitoneal (EAC) or subcutaneous (ESC) inoculation of Ehrlich adenocarcinoma cells

Показатель	Ед. изм.	Интактные	АКЭ на 14-е сутки	Интактные	СКЭ на 14-е сутки
		n=20		n=20	
Лейкоциты	10 ⁹ /л	8,66±2,73	28,46±5,49*	10,72±2,60	15,73±4,62*.*
Лимфоциты	%	61,00±9,54	18,00±9,42*	62,51±11,28	62,38±11,12 [‡]
	10 ⁹ /л	5,19±1,62	4,97±2,32	6,72±2,19	9,82±3,46*.*
Моноциты	%	6,44±4,36	5,78±2,33	4,95±3,07	7,59±4,81*
	10 ⁹ /л	0,51±0,35	1,67±0,81*	0,52±0,32	1,18±1,01*.*
Нейтрофилы	%	23,89±12,40	73,67±9,04*	25,84±11,56	23,10±8,91 [‡]
	10 ⁹ /л	2,18±1,55	21,12±5,02*	2,77±1,44	3,60±1,84*.*
Сегментоядерные нейтрофилы	%	20,22±9,90	68,00±11,81*	21,13±9,99	17,79±7,55 [‡]
	10 ⁹ /л	1,87±1,32	19,58±5,55*	2,26±1,23	2,79±1,53*
Палочкоядерные нейтрофилы	%	3,67±2,50	5,67±6,86	4,70±3,42	5,31±3,38
	10 ⁹ /л	0,31±0,22	1,54±1,74*	0,51±0,40	0,80±0,53*
Эозинофилы	%	8,67±4,44	2,56±1,24*	6,69±4,02	6,93±4,04 [‡]
	10 ⁹ /л	0,77±0,50	0,69±0,31	0,72±0,47	1,13±0,81*
Базофилы	%	0	0	0	0
	10 ⁹ /л	0	0	0	0

Примечания: * различия статистически значимы в сравнении с соответствующими показателями у данных животных до инокуляции АКЭ (p<0,05, t-критерий Вилкоксона); [‡] различия статистически значимы между независимыми группами (критерий Манна – Уитни, p<0,05).

Таблица 4

Оценка общего количества лейкоцитов и их дифференциальных форм у мышей-самцов линии Af до (интактные) и через 14 суток подкожной (СКЭ) инокуляции клеток аденокарциномы Эрлиха

Table 4

Evaluation of the total number of leukocytes and their differential forms in Af male mice before (intact) and after 14 days of subcutaneous (ESC) inoculation of Ehrlich adenocarcinoma cells

Показатель	Ед. изм.	Интактные мыши	СКЭ на 14-е сутки
		n=20	
Лейкоциты	10 ⁹ /л	8,10±2,41	9,62±2,77
Лимфоциты	%	64,65±8,77	45,85±17,87*
	10 ⁹ /л	5,29±1,73	4,18±1,75*
Моноциты	%	5,05±3,30	3,80±2,88
	10 ⁹ /л	0,42±0,36	0,35±0,28
Нейтрофилы	%	27,80±7,24	46,05±19,10*
	10 ⁹ /л	2,18±0,79	4,70±3,06*
Сегментоядерные нейтрофилы	%	20,75±6,45	22,45±18,54
	10 ⁹ /л	1,61±0,62	2,37±2,33
Палочкоядерные нейтрофилы	%	7,05±1,96	23,60±7,96*
	10 ⁹ /л	0,57±0,24	2,32±1,31*
Эозинофилы	%	2,50±1,67	4,25±2,83
	10 ⁹ /л	0,21±0,16	0,39±0,26*
Базофилы	%	0	0
	10 ⁹ /л	0	0

Примечание: * различия статистически значимы в сравнении с соответствующими показателями у данных животных до инокуляции АКЭ (p<0,05, t-критерий Вилкоксона).



Таким образом, ксенотрансплантация аденокарциномы Эрлиха мышам независимо от пола, вида животного и от способа моделирования (АКЭ или СКЭ) сопровождается изменением количества лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов и не влияет на уровень базофилов (табл. 3, 4).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка гематологических показателей крови у лабораторных мышей – опухоленосителей аденокарциномы Эрлиха имеет важное значение в обосновании биомоделей опухолевых процессов для разработки адекватных способов лечения, выбора лекарственных субстанций, способных повлиять на систему крови. Приведены гематологические показатели, включающие развернутую лейкоцитарную формулу, мышей разных полов и видов, а также вне зависимости от способа инокуляции клеток аденокарциномы Эрлиха. Подытоживая результаты, следует отметить, что исследуемая агрессивная опухоль при ксенотрансплантации к 14-м суткам развития ее у мышей влияет на: распределение эритроцитов по объему, средний объем тромбоцитов, распределение тромбоцитов по объему, количество лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов – и не оказывает влияния только лишь на уровень базофилов в крови.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kholodenko I., Doronin I., Kholodenko R. Tumor models in the study of cancer. *Immunology*. 2013;5:282–286. (in Russian)
2. Pobyarzhin V., Pashinskaya Ye., Goncharov A. Methodological aspects of setting up oncological models in experimental conditions. *Bulletin of Vitebsk State Medical University*. 2018;17(6):32–45. (in Russian)
3. Ozaslan M., Karagoz I.D., Guldur M.E. Ehrlich ascites carcinoma. *Afr. J. Biotech.* 2011;10(13):2375–2378.
4. Gol'dberg V., Matyash M. Modern achievements of drug therapy of malignant neoplasms. *Biul. SO RAMN*. 2004;2:36–40.
5. Imbasy S., Elkholi Sh.E., Faisal S., Elaidy S.M. The GSTP1/MAPKs/BIM/SMAC modulatory actions of nitazoxanide: Bioinformatics and experimental evidence in subcutaneous solid Ehrlich carcinoma-inoculated mice. *Life Sci*. 2023;319:121496. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121496.
6. Pozdnyak L., Chernov A., Potkin V. Comparative evaluation of the cytotoxic effects of 4,5-dichloroisothiazole-3-carboxylic acid, cisplatin and their combination on Ehrlich's ascitic carcinoma cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. *Medical Sciences Series*. 2014;1:46–51. (in Russian)
7. El-Ashmawy N.E., El-Zamarany E.A., Khedr N.F. Blocking of The Prostaglandin E2 Receptor as a Therapeutic Strategy for Treatment of Breast Cancer: Promising Findings in a Mouse Model. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2022;23(11):3763–3770. doi: 10.31557/APJCP.2022.23.11.3763
8. Hassan E.S.E., Abdelfattah M.S., Moneim A.E.A. Evaluation of the antineoplastic property of prodigiosins and 5-fluorouracil in restraining the growth of Ehrlich solid tumors in mice. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022;29(55):83723–83732. doi: 10.1007/s11356-022-21678-w.
9. Zidan A., El Saadany A.A., Hedy S.E. Potential cardioprotective and anticancer effects of carvedilol either free or as loaded nanoparticles with or without doxorubicin in solid Ehrlich carcinoma-bearing mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2023;465:116448. doi: 10.1016/j.taap.2023.116448
10. Utkusavas A., Gurevin E.G., Armutak E.I. Effects of combined administration of doxorubicin and chloroquine on lung pathology in mice with solid Ehrlich ascites carcinoma. *Biotech Histochem*. 2022;97(8):555–566. doi: 10.1080/10520295.2022.2036369.
11. Lipatov V., Severinov D., Saakyan A. Ethical and legal aspects of conducting experimental biomedical research in vivo. Part I. *Russian Biomedical Bulletin named after Academician I.P. Pavlova*. 2019;27(1):80–92. doi: 10.23888/PAVLOVJ201927180-92 (in Russian)
12. Lipatov V., Severinov D., Saakyan A. Ethical and legal aspects of conducting experimental biomedical research in vivo. Part II. *Russian Biomedical Bulletin named after Academician I.P. Pavlova*. 2019;27(2):245–257. doi: 10.23888/PAVLOVJ201927245-257 (in Russian)
13. Makarov V., Shestakov V. *Consultant GLP-Planet 2022. Opinion of the pharmaceutical industry*. St. Petersburg: NPO "HOUSE OF PHARMACY"; 2022. 248 p. (in Russian)
14. Pogoyants Ye., Kiselova N. Transplantable tumor strains created in the USSR and maintained at the Institute of Experimental and Clinical Oncology of the USSR Academy of Medical Sciences. *Issues of oncology*. 1963;9(8):103–106. (in Russian)
15. Men'shikova V. *Laboratory research methods in the clinic. Directory*. M., Medicine; 1987. 368 p. (in Russian)
16. Giemsa G. A simplification and perfection of my methylene azure-methylene blue-eosin staining method to achieve Romanowsky-Nocht chromatin staining. *Centralbl f Bakt etc: magazine*. 1904;37:308–311. (in German)



Hameed O.✉, Maktoof Z., Al-Marashi A., Al-Tae R.
University of Basrah, Basrah, Iraq

Myofibroma in the Oral Cavity: A Case Report

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Hameed O. – conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing – original draft, writing – review, editing, visualization; Maktoof Z. – conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing – original draft, writing – review, editing, visualization, supervision, project administration; Al-Marashi A. – validation, resources, data curation, writing – original draft, writing – review, editing, visualization; Al-Tae R. – validation, investigation, resources, data curation, writing – original draft.

The article is published in the author's edition.

Подана: 13.06.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: medicalresearch602@yahoo.com

Abstract

Myofibroma is a solitary or multicentric benign neoplasm of unknown etiology composed of myofibroblasts; it has a predisposition to the region of the head and neck however it is rarely seen in the oral cavity mostly the mandible as the most common intraoral location, younger patients and children are affected more often with a slight predilection to males. We described a case of myofibroma in the oral cavity as rare presentation.

In this report, it was seen in a 14-years-old healthy male complaining from Right sided painless firm mass for 6 months with no history of trauma. CBCT revealed a presence of a poorly defined bordered hypodense lesion, located in the angle of the mandible causing perforation of the buccal and the lingual cortical plates. Then an incisional biopsy from the mass was submitted to the histopathological analysis which revealed features of a benign spindle cell tumor consistent with myofibroma and it was confirmed by immunohistochemistry.

The current case report is better understand the tumor characteristics clinically and histo-pathologically and the treatment options and the outcome of the tumor. The use of Immunohistochemical examination for the diagnosis confirmation is mandatory.

Keywords: myofibroma, myofibroblasts, oral cavity, immunohistochemistry, incisional biopsy



Хамид О.✉, Мактуф З., Аль-Мараши А., Аль-Таи Р.
Университет Басры, Басра, Ирак

Миофиброма полости рта: клинический случай

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Хамид О. – концепция, методология, анализ и обработка данных, проведение исследования, текст – первоначальный вариант, обзор литературы, редактирование, визуализация; Мактуф З. – концепция, методология, анализ и обработка данных, проведение исследования, научное руководство, текст – первоначальный вариант, обзор литературы, редактирование, визуализация; Аль-Мараши А. – проверка содержания, курирование данных, текст – первоначальный вариант, обзор литературы, редактирование, визуализация; Аль-Таи Р. – проверка содержания, проведение исследования, обработка данных, текст – первоначальный вариант.
Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 13.06.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: medicalresearch602@yahoo.com

Резюме

Исследован 14-летний здоровый молодой человек с жалобами на правостороннее безболезненное твердое образование в полости рта, выявленное 6 мес. назад. Согласно анамнестическим сведениям, травм не было. Клинико-инструментальное исследование позволило установить наличие гиподенсивного поражения с нечеткими границами, расположенного в углу нижней челюсти, вызывающего перфорацию щечной и язычной кортикальных пластинок. Биоптаты ткани опухоли были подвергнуты гистопатологическому анализу, который выявил признаки доброкачественной веретенноклеточной опухоли, соответствующей миофиброме, что было подтверждено иммуногистохимическим исследованием.

Выявленный клинический случай позволяет лучше понять клинические и гистопатологические характеристики опухоли, а также варианты лечения и исходы заболевания. Для подтверждения диагноза обязательно проведение иммуногистохимического исследования.

Ключевые слова: миофиброма, миофибробласты, ротовая полость, иммуногистохимия, инцизионная биопсия

■ INTRODUCTION

Myofibroma is a solitary or multicentric benign neoplasm composed of myofibroblasts and originates from soft tissues, bones, and internal organs and rarely in the intracranial area but there is a predisposition to the head and neck region however it is rarely found in the oral cavity mostly the mandible as the most common oral location followed by the tongue, and in the younger age groups, it shows a predilection for bone involvement [1].

Younger patients and children are affected more often with a slight predilection to males, clinically intraoral myofibroma presented as a painless swelling that grows slowly but sometimes it shows a rapid growth pattern and in such cases, it may be misdiagnosed as a sarcoma [2].

The etiology of this tumor in the head and neck region is uncertain since there were few documented cases of it but it is believed that myofibroma may have a pattern for

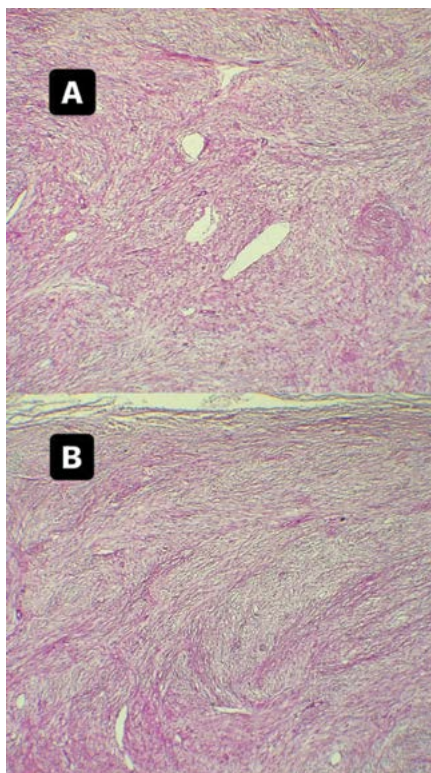
myofibromatosis familial inheritance or it could be caused in response to trauma that stimulates myofibroblasts proliferation [3].

It is rare to find myofibroma in the maxilla and its diagnosis my confused with other mesenchymal lesions or low-grade malignant spindle cell neoplasms; therefore it is essential to perform an accurate diagnosis with the aid of clinical and radiographical data besides the microscopical and immunohistochemical feature [4].

The present case report purpose to better understand the tumor characteristics clinically and histopathologically, and also discuss the treatment options and the prognosis of this tumor. And the use of immunohistochemical examination for the diagnosis confirmation.

■ A CASE REPORT

A 14-years-old healthy male has been referred to the department of oral medicine at the College of Dentistry, University of Basrah. He had a chief complaint of right sided painless firm mass extend from midline to the angle of mandible for 6 months duration with no history of a trauma and covered with normal mucosa, the mass causing displacement of teeth, the extraoral examination showed no palpable lymph nodes.



The histopathological examination from the mass: A – Fascicles of bland looking spindle cell proliferation arranged in hyper and hypo cellular areas; B – Irregularly branching blood vessels similar in appearance to those associated with hemangiopericytoma and areas of ulcerated overlying epithelium



Radiographic evaluation was made by panoramic radiograph and confirmed by Cone-beam computed tomography (CT). The radiograph shows missing of lower 1st and 2nd molar and super eruption of opposing teeth, a unilocular lesion was evident on lower right mandible extending from 2nd premolar to 3rd molar region, the radiodensity of the lesion gives a hint about the presence of a mass rather than having a cystic cavity, The lesion on C.B.CT exhibit buccal and lingual expansion, having some osseous discontinuity on the area of alveolar crest. The shadow of inferior dental nerve was completely obliterated by the lesion which possibly justifies the paresthesia reported by the patient; no cortication was evident on the radiograph which suggests a rapid growth of the lesion.

An incisional biopsy from the mass was submitted to histopathological analysis, reveals features of benign spindle cell tumor consistent with Myofibroma which was confirmed by immunohistochemistry. The histopathological examination reveals fascicles of bland looking spindle cell proliferation arranged in hyper and hypo cellular areas with irregularly branching blood vessels similar in appearance to those associated with hemangiopericytoma and areas of ulcerated overlying epithelium (Figure). Immunohistochemical Examination: For tumor cells. Positive Stains for Vimentin, and pan-actin. Negative stains for S100, CD117, beta-Catenin, desmin, and CD34.

Then treated by wide surgical excision with safe margin to prevent recurrence in which on gross examination revealed part of mandible with tooth and mass surround the body and angle of the mandible measure (10×8×6 cm), the mass firm in consistency on cut sections gray white in color.

■ DISCUSSION

The purpose of this report was to present a case of Myofibroma in the 14 years old male which is rare case in Basrah city with lack of reports regard it.

Myofibroma is a mesenchymal tumor that rarely impact tissues and organs but occur more commonly in the head and neck region, it is composed of proliferating benign myofibroblasts [5].

It is of unknown etiology but trauma can be a provoking agent or inherited as an autosomal dominant [6], but in this case the patient has no history of trauma, this indicates the genetic nature of the lesion.

Clinically in this case Myofibroma presented as a painless firm mass extend from midline to the angle of mandible in the right side with displacement of the teeth, so the diagnosis was challenging since it is similar to other bony lesions but the symptoms were mentioned in many other reports of Myofibroma in the mandible as described by many authors [4, 7].

Cone-beam computed tomography revealed the presence of a poorly defined borders hypodense lesion, located in the angle of mandible causing perforation of buccal and lingual cortical plates, that direct the provisional diagnosis toward the sarcomas and incisional biopsy was taken to confirm the correct diagnosis.

The differential diagnosis of Myofibroma histopathologically must include all the tumors of muscular, neural origin and certain tumors like desmoplastic fibroma, fibromatosis, and low-grade fibrosarcoma, the immunopositivity with S100 lesions aids in exclusion of the neural origin since it is absent in Myofibroma, moreover the reactivity for desmin of leiomyoma and leiomyosarcoma is beneficial in this situation beside these lesions are rare in bone, also leiomyosarcomas possess considerably more cellular

pleomorphism and higher mitotic rate [7]. Our case the Histopathological examination showed fascicles of bland looking spindle cell proliferation arranged in hyper and hypo cellular areas and Immunohistochemical Examination for tumor cells was positive to Vimentin, and pan-actin. And negative for S100, CD117, beta-Catenin, desmin, and CD34, this confirms the diagnosis of Myofibroma.

■ CONCLUSION

Myofibroma is a rare spindle cell neoplasm and in this case report it presented as a solitary lesion in 14 years old healthy male involving the mandible with no history of trauma and it considered rare case in Basrah city with lack of reports regard it, histopathological diagnosis confirmed by immunohistochemistry which differentiate it from other benign spindle cell neoplasm and treated by surgical excision.

■ REFERENCES

1. Series C. Oral Myofibroma. *Clinical Case Report*. 2020;3(7):8–10.
2. Atarbashi-Moghadam S., Lotfi A., Shahrabi-Farahani S., et al. Myofibroma as a Rapidly Growing Gingival Mass in a 4-year-old Boy: a Case Report. *J Dent*. 2018;19(2):164–7.
3. Cannon S., Hammad Y., Schlieve T. Intraosseous myofibroma of the mandible: A case report and review of the literature. *Oral Maxillofac Surg Cases [Internet]*. 2021;7(4):100234. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.omsc.2021.100234>
4. Cunha J.L.S., Rodrigues-Fernandes C.I., Soares C.D., et al. Aggressive Intraosseous Myofibroma of the Maxilla: Report of a Rare Case and Literature Review. *Head Neck Pathol [Internet]*. 2021;15(1):303–10. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12105-020-01162-y>
5. González J.L., Reyes Escalera J.O., Cuevas González J.C., et al. Intraosseous Myofibroma of the Mandible: A Case Report. *Int J Odontostomatol*. 2013;7(3):339–42.
6. Kaur P., Chowalta R., Lata J. Central myofibroma of the maxilla. *Contemp Clin Dent*. 2016;7(1):71–4.
7. Sundaravel S., Anuthama K., Prasad H., et al. Intraosseous myofibroma of mandible: A rarity of jaws: With clinical, radiological, histopathological and immunohistochemical features. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2013;17(1):121–5.



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.4.010>



Бахритдинов Б.Р.✉, Алиев М.А., Мардиева Г.М.

Самаркандский государственный медицинский университет, Самарканд, Узбекистан

Дифференциальная диагностика опухолей головного мозга различной этиологии, основанная на установлении особенностей их биохимического состава методом воксельной магнитно-резонансной спектроскопии

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, статистическая обработка данных, анализ и интерпретация результатов, написание текста, редактирование – Бахритдинов Б.Р.; сбор материала – Бахритдинов Б.Р., Алиев М.А., Мардиева Г.М.

Подана: 14.04.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: t-a-u-r-o@mail.ru

Резюме

Введение. Магнитно-резонансная спектроскопия (МРС) – технология исследования, допускающая возможность неинвазивного изучения морфологических и биохимических изменений в тканях организма пациентов. Использование ее с целью дифференциальной диагностики опухолевых образований головного мозга имеет первостепенное значение для решения ряда сложных диагностических задач. Перспективность использования МРС во многом определяется неинвазивностью оценки биохимического и морфологического состава тканей обследуемого организма в условиях *in vivo*.

Цель. Оценить особенности биохимического состава опухолей головного мозга разной этиологии и установить лабораторные критерии их дифференциальной диагностики методом магнитно-резонансной спектроскопии.

Материалы и методы. Обследовано 48 пациентов с опухолями головного мозга методом магнитно-резонансной спектроскопии на томографе Optima MR450w GEM (1,5 Tl) с последующей гистологической верификацией операционного материала в зависимости от степени анаплазии (Grade). В группу исследования вошли пациенты с наиболее часто встречающимися типами опухолей головного мозга, среди которых глиальные опухоли головного мозга – 33 (68,8%), менингиомы – 10 (20,8%), метастатическое поражение головного мозга – 5 (10,4%).

Результаты. Многовоксельную МРС по водороду выполняли всем пациентам сразу после проведения традиционной МРТ. Наиболее значимыми изменениями у пациентов с глиальными опухолями головного мозга по сравнению с неизменным веществом головного мозга контралатеральной стороны стали: снижение доли N-ацетиласпартата (NAA), увеличение доли холина (Cho) и лактата (Lac). Было отмечено, что чем выше степень анаплазии глиальной опухоли головного мозга, тем достоверно выше значения соотношений холестерин/креатинин, лактат/креатинин (Cho/Cr и Lac/Cr). При активных пролиферативных процессах в ткани менингиом и глиальных опухолей происходит повреждение базальных мембран клеток протеолитическими ферментами и высвобождение Cho, повышенное содержание

которого регистрируется в МР-спектре. Содержание NAA в опухолях менингосудистого ряда было минимальным или отсутствовало. Среди наиболее значимых относительных (к общему количеству) метаболитов констатировано выраженное снижение доли NAA, увеличение доли Cho и наличие аланина (Ala), который определялся в опухолях менингосудистого ряда в 92% случаев, в глиальных опухолях головного мозга не выявлялся. Злокачественные менигиомы в отличие от доброкачественных характеризовались умеренно выраженным увеличением содержания Lac и непостоянным содержанием Ala (в 40% пик аланина не определялся). В отличие от опухолей глиального ряда, при менигиомах выявлялось выраженное снижение доли NAA до 1–2% (при глиальных опухолях – 8–18%), появление пика Ala.

Заключение. МРС целесообразно использовать не только с целью дифференциальной диагностики опухолей различных типов, но и в ситуациях, когда данные традиционной МРТ не соответствуют клиническим проявлениям заболевания, а также для уточнения степени анаплазии опухолей глиального ряда. Использование многовоксельной МРС позволяет определить зону с наибольшей пролиферацией. Контрольные МР-спектроскопические исследования рекомендованы для оценки прогрессирования глиомы в динамике.

Ключевые слова: магнитно-резонансная спектроскопия, головной мозг, глиальные опухоли, менигиомы, метаболиты

Bekzod R. Bakhritdinov✉, Mansur A. Aliev, Gulshod M. Mardieva
Samarkand State Medical University, Samarkand, Uzbekistan

Differential Diagnosis of Brain Tumors of Various Etiologies Based on Establishing the Characteristics of Their Biochemical Composition Using Voxel Magnetic Resonance Spectroscopy

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: research concept and design, statistical processing of data, analysis and interpretation of results, writing the text, editing – Bekzod R. Bakhritdinov; collection of material – Bekzod R. Bakhritdinov, Mansur A. Aliev, Gulshod M. Mardieva.

Submitted: 14.04.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: t-a-u-r-o@mail.ru

Abstract

Introduction. Magnetic resonance spectroscopy (MRS) is a research technology that allows for the non-invasive study of morphological and biochemical changes in patient tissues. Its use for the purpose of differential diagnosis of brain tumors is of paramount importance for solving a number of complex diagnostic problems. The prospects for using MRS are largely determined by the non-invasive assessment of the biochemical and morphological composition of the tissues of the examined organism under in vivo conditions.

Purpose. To evaluate the features of the biochemical composition of brain tumors of various etiologies and establish laboratory criteria for their differential diagnosis. by magnetic resonance spectroscopy.



Materials and methods. 48 patients with brain tumors were examined using magnetic resonance spectroscopy on an Optima MR450w GEM tomograph (1.5 Tl), followed by histological verification of the surgical material depending on the degree of anaplasia (Grade). The study group included patients with the most common types of brain tumors, including: glial brain tumors – 33 (68.8%), meningiomas 10 (20.8%), metastatic brain lesions 5 (10.4%).

Results. Multivoxel hydrogen MRS was performed in all patients immediately after conventional MRI. The most significant changes in patients with glial tumors of the brain compared to the unchanged brain substance of the contralateral side were: a decrease in the proportion of N-acetylaspartate (NAA), an increase in the proportion of choline (Cho) and lactate (Lac). It was noted that the higher the degree of anaplasia of a glial brain tumor, the significantly higher the values of the cholesterol/creatinine and lactate/creatinine ratios (Cho/Cr and Lac/Cr). During active proliferative processes in the tissue of meningiomas and glial tumors, damage to the basal membranes of cells by proteolytic enzymes occurs and Cho is released, an increased content of which is recorded in the MR spectrum. The NAA content in meningovascular tumors was minimal or absent. Among the most significant relative ones (to the total number of metabolites), a pronounced decrease in the proportion of NAA, an increase in the proportion of Cho and the presence of alanine (Ala), which was detected in meningovascular tumors in 92% of cases, was not detected in glial brain tumors. Malignant meningiomas, unlike benign ones, were characterized by a moderate increase in Lac content and variable Ala content (in 40% the alanine peak was not detected). Unlike glial tumors, in meningiomas there was a pronounced decrease in the proportion of NAA to 1–2% (in glial tumors – 8–18%), and the appearance of an Ala peak.

Conclusion. It is advisable to use MRS not only for the purpose of differential diagnosis of tumors of various types, but also in situations where traditional MRI data do not correspond to the clinical manifestations of the disease, as well as to clarify the degree of anaplasia of glial tumors. The use of multivoxel MRS allows us to determine the area with the greatest proliferation. Control MR spectroscopic studies are recommended to assess the dynamics of glioma progression.

Keywords: magnetic resonance spectroscopy, brain, glial tumors, meningiomas, metabolites

■ ВВЕДЕНИЕ

Технический прогресс, приведший к созданию новейшей аппаратуры, и развитие программного обеспечения позволили существенно продвинуться в понимании этиологии и патогенеза многих патологических состояний, а также заметно улучшить результаты проводимого лечения. В последние несколько десятилетий отмечается бурное развитие диагностического направления медицины. Достигнутые успехи в лабораторно-диагностическом исследовании пациентов стали возможны лишь с появлением новых высокотехнологичных методов лучевой визуализации. Возможность неинвазивного изучения морфологических изменений, происходящих в организме пациента, кардинально изменила представление о целом ряде медицинских

специальностей [1, 3, 5, 9]. Так, при введении в клиническую практику магнитно-резонансной спектроскопии (МРС) появилась возможность переосмыслить существующие диагностические алгоритмы. Использование МРС с целью дифференциальной диагностики опухолевых образований головного мозга имеет первостепенное значение для ряда сложных диагностических задач [3, 5, 6, 10]. Перспективность МРС определена возможностью распознавания функциональных сдвигов, лежащих на биохимическом уровне, а также неинвазивностью определения биохимического состава тканей обследуемого организма *in vivo* [2, 4, 7, 8, 11, 12].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить особенности биохимического состава опухолей головного мозга разной этиологии и установить лабораторные критерии их дифференциальной диагностики методом магнитно-резонансной спектроскопии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 48 пациентов с опухолями головного мозга методом магнитно-резонансной спектроскопии на томографе Optima MR450w GEM (1,5 Tl) с последующей гистологической верификацией операционного материала в зависимости от степени анаплазии (Grade). В группу исследования вошли пациенты с наиболее часто встречающимися типами опухолей головного мозга: глиальные опухоли головного мозга – 33 (68,8%), менингиомы – 10 (20,8%), метастатическое поражение головного мозга – 5 (10,4%).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исследования проводили анализ МРТ-характеристик опухолей головного мозга. Акцентировали внимание на изменении интенсивности МР-сигнала, структуры опухоли, наличии или отсутствии перифокального отека, дислокации желудочковой системы, наличии кровоизлияния, кист и обызвествлений. Далее оценивали характер накопления контрастного вещества в опухолевой ткани.

Астроцитомы с низкой степенью анаплазии (Grade II) отмечены у 8 пациентов. На нативных МР-томограммах эти опухоли характеризовались пониженным МР-сигналом на T1-ВИ (взвешенном изображении) и повышенным – на T2-ВИ преимущественно гомогенной структуры, без перифокального отека, некрозов, кровоизлияний. При контрастировании накопление парамагнитного контрастного вещества в опухолях в большинстве не определялось. В основном выявлялась деформация желудочков со смещением срединных структур.

На МР-томограммах опухоли нейроэктодермальной ткани (Grade III), т. е. анапластические астроцитомы, выявлены у 14 пациентов. Эти опухоли на T1-ВИ и T2-ВИ представляли собой образования, имеющие выраженный гетерогенный сигнал, с нечеткими и неровными контурами. Иногда на T1-ВИ определялись патологические участки смешанной изо- и гипоинтенсивности сигнала, а на T2-ВИ – гетерогенное повышение интенсивности. У всех пациентов с анапластическими астроцитомами выявлялся перифокальный отек и «масс-эффект». При контрастированном исследовании анапластических астроцитом (МРТ) он чаще имел диффузно-очаговый характер, реже по кольцевидному типу.



Опухоли нейроэктодермальной ткани Grade IV, т. е. глиобластомы, были дифференцированы у 11 пациентов. На срезах при МРТ отмечалось гетерогенное изменение интенсивности МР-сигнала. Эти опухоли характеризовались множественными очагами некроза, кровоизлияний. Строма опухоли богато васкуляризирована, с нечеткими и неровными контурами. Определялся перифокальный отек с деформацией желудочков и со смещением срединных структур. При введении контраста его накопление было по кольцевидному, иногда по диффузно-очаговому типу.

В зависимости от расположения и размеров опухоли на следующем этапе исследования использовали многовоксельную спектроскопию с оценкой вокселей, которые содержали только опухолевую ткань, т. е. без участков отека, некроза, а также кровоизлияний. Количество вокселей в среднем составило 3. Значения вокселей в каждом отдельном случае усредняли. Полученные спектры идентифицировали сопоставлением со спектрами противоположной (здоровой) стороны мозга.

Известно, что прорастание опухоли в окружающие здоровые ткани, интравазация и экстравазация опухолевых клеток в большинстве ситуаций обеспечиваются экспрессируемыми атипичными клетками протеаз. Эти энзимы вызывают разрушение внеклеточного матрикса, подвергая протеолитическому распаду всевозможные структуры внеклеточного матрикса. Тем самым протеазы как бы прокладывают дорогу мигрирующим атипичным клеткам в толщу окружающих тканей.

При глиальных опухолях головного мозга происходит разрушение нейронов, аксонов, дендритов с формированием недостаточности ферментной системы, участвующей в ацетилировании аспартата. Это приводит к понижению содержания N-ацетиласпартата (NAA).

Кроме того, при глиальных опухолях головного мозга происходит разрушение клеточных мембран с высвобождением и увеличением содержания холина (Cho), замещенные фосфаты которого создают структурную основу фосфолипидов.

С учетом активной клеточной пролиферации образующегося АТФ оказывается недостаточно для покрытия потребности опухолей в энергии. Поэтому в дополнение к образованию энергии в цикле Кребса более активно проявляют себя вспомогательные пути образования АТФ – анаэробный гликолиз и серинолиз. Конечным продуктом этого пути метаболизма является образование лактата (Lac).

Сравнение показателей МРС при глиальных опухолях выявило особенно выраженное снижение доли NAA и увеличение доли Cho и Lac (табл. 1).

Регистрация повышенного содержания холина в спектре обусловлена более активным протеолитическим разрушением базальных мембран пресинаптических клеточных окончаний, разрывом связи холина с белками при клеточной пролиферации, характерным при прогрессировании степени анаплазии.

Известно, что клеточная пролиферация требует большого количества энергии. Чем выше степень анаплазии и скорость клеточной пролиферации, тем активнее дополнительные процессы получения энергии – анаэробный гликолиз и серинолиз с образованием Lac. Кроме того, при высокозлокачественных опухолях наибольший вклад Lac приносят участки некроза.

При анализе результатов отмечено, что значения соотношений Cho/Cr и Lac/Cr выше у глиальных опухолей с высокой степенью анаплазии (Grade II–IV) (рис. 1, 2).

На сравнительных спектрограммах при фибриллярно-протоплазматической астроцитоме в левой лобной доле (рис. 1) определяется снижение содержания NAA,

Таблица 1
Сравнение показателей МРС при глиальных опухолях
Table 1
Comparison of MRS indicators in glial tumors

Метаболиты	Показатели пиков глиальных опухолей	Показатели пиков неизмененного вещества головного мозга
NAA	12,59	44,13
Cho	43,91	28,21
Cr	21,04	27,54
Lac	19,55	0,0

незначительное снижение уровня креатинина (Cr) и показателей соотношения NAA/Cr (0,58), появление Lac, увеличение численных значений соотношений Cho/Cr (1,56) и Lac/Cr (0,51).

На спектрах и изображениях цветного картирования глиобластомы (рис. 2) определено снижение содержания NAA, незначительное уменьшение содержания Cr, значительное увеличение содержания Lac, снижение соотношений NAA/Cr (0,68), а также увеличение соотношения Cho/Cr (2,7) и увеличение соотношения Lac/Cr (2,82).

Опухоли менингососудистого ряда, выявленные у 10 (20,8%) пациентов, образуются из паутинной, реже мягкой мозговой оболочки или из стромы сосудистого сплетения. Из характерных признаков менингиом при МРТ выделены: широкое основание опухоли, прилежащее к твердой мозговой оболочке; наличие участка гиперостоза или прорастания кости опухолью. Менингиомы, как правило, характеризуются гомогенной структурой. Однако при наличии очагов обызвествления или кровоизлияний, множественных мелких питающих сосудов, кистозных полостей иногда наблюдалась и гетерогенная структура менингиом. Большинство менингиом на T2-ВИ характеризовались изоинтенсивным или умеренно гиперинтенсивным сигналом, на T1-ВИ – изо- или гипоинтенсивным сигналом.

Для злокачественных же менингиом отмечены отсутствие четких контуров между опухолью и мозговой тканью, гетерогенность структуры и интенсивности МР-сигнала, наличие множественных кистозных участков, небольшие зоны геморрагического пропитывания по периферии, неравномерное накопление контрастного вещества. Сосуды в строме опухоли и на ее капсуле визуализировались в виде точечных или линейных, извитых участков пониженной интенсивности МР-сигнала на T1- и T2-ВИ. Однако лучше они видны на T2-ВИ на фоне яркого сигнала от перифокального отека. При больших размерах менингиом на МР-томограммах выявлялись ветви питающих артерий, расположенные как в строме, так и на поверхности опухоли. На T1- и T2-ВИ они визуализировались в виде участков снижения интенсивности МР-сигнала извитой, линейной формы, идущих в виде лучей от матрикса опухоли.

Следует подчеркнуть, что четкие границы на МРТ не являются специфичными только для менингиом. Они наблюдаются и при метастазах, глиобластомах, невриномах и других опухолях. Как правило, при менингиомах отмечается наличие перифокального отека, имеющего выраженный гиперинтенсивный МР-сигнал на T2-ВИ. При использовании методики контрастного усиления практически все менингиомы характеризовались гомогенным и интенсивным накоплением контраста.

При менингиомах, так же как и при глиальных опухолях, при активных пролиферативных процессах опухолевой ткани происходит повреждение базальных

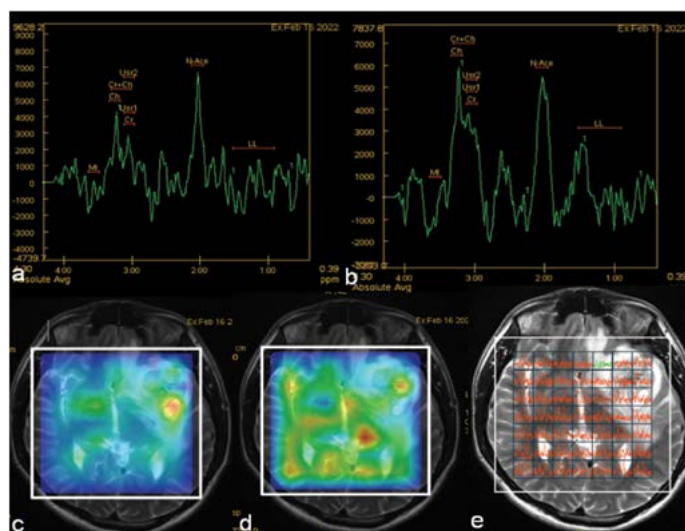


Рис. 1. Спектр и изображения цветного картирования при фибриллярно-протоплазматической астроцитоме левой лобной доли: а – спектр от неизмененного вещества головного мозга контралатеральной стороны; б, с, d, е – спектр и изображения цветного картирования опухоли
Fig. 1. Spectrum and color mapping images in fibrillar-protoplasmic astrocytoma of the left frontal lobe: а – spectrum from the unchanged brain substance of the contralateral side and images of color mapping of the tumor

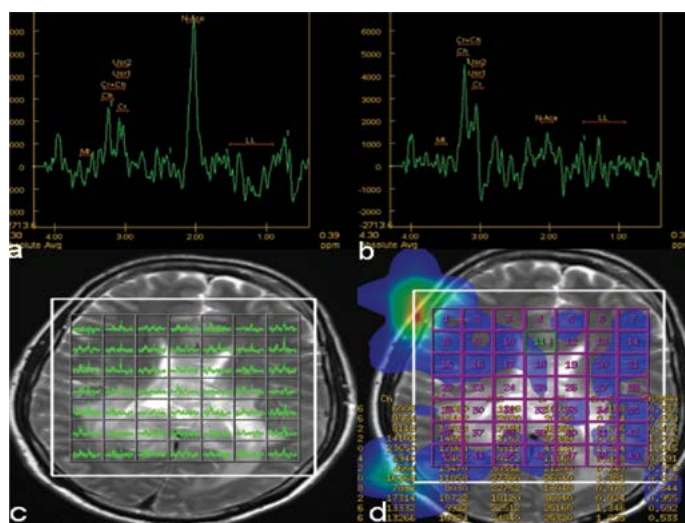


Рис. 2. Спектр и изображения цветного картирования при глиобластоме в левой теменной доле: а – спектр от неизмененного вещества головного мозга контралатеральной стороны; б, с, d – спектр и изображения цветного картирования опухоли
Fig. 2. Spectrum and color mapping images in glioblastoma in the left parietal lobe: а – spectrum from the unchanged brain substance of the contralateral side; б, с, d – spectrum and images of color mapping of the tumor

мембран клеток протеолитическими ферментами и высвобождение Cho, повышенное содержание которого регистрировали в МР-спектре.

Содержание NAA в опухолях менингососудистого ряда было минимальным или отсутствовало, так как это соединение присутствует преимущественно в глиальных тканях, в двигательных нервных окончаниях и лишь в минимальной концентрации может содержаться в других тканях.

В менингиомах в условиях достаточной оксигенации формируется глюкозо-аланиновый цикл, при котором происходит образование аланина (Ala) и α -кетоглутарата из пировиноградной кислоты путем трансаминирования с глутаматом.

Таблица 2
Сравнение показателей МРС при опухолях менингососудистого ряда
Table 2
Comparison of MRS indicators in meningovascular tumors

Метаболиты	Показатели пиков менингиом	Показатели пиков неизмененного вещества головного мозга
NAA	1,29	44,13
Cho	48,27	28,21
Ala	17,63	0,0
Cr	21,31	27,54
Lac	0,06	0,0

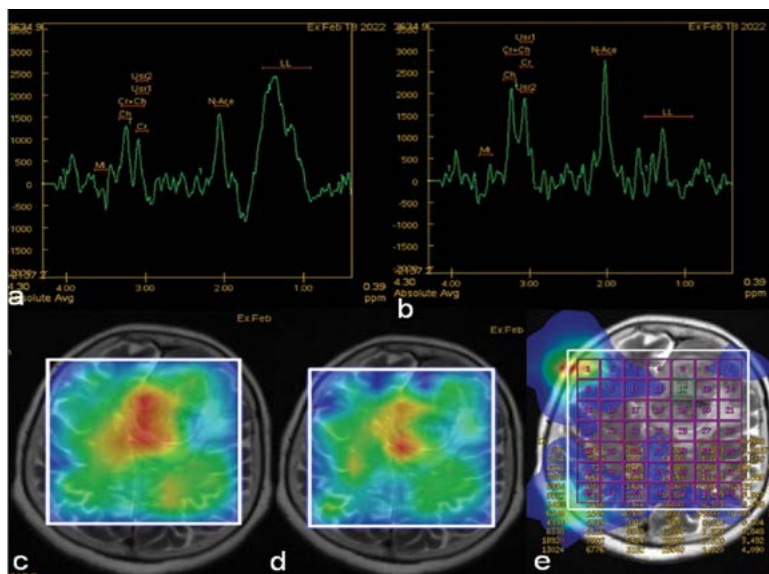


Рис. 3. Спектр и изображения цветного картирования при менингиоме правой теменной доли: а – спектр от неизмененного вещества головного мозга контралатеральной стороны; б, с, d, e – спектр и изображения цветного картирования опухоли

Fig. 3. Spectrum and color mapping images in meningioma of the right parietal lobe: a – spectrum from the unchanged brain substance of the contralateral side; b, c, d, e – spectrum and images of color mapping of the tumor



Из всех определяемых метаболитов наиболее выраженные изменения состояли в достоверно выраженном снижении доли NAA, увеличении доли Cho и наличии Ala (табл. 2).

Метаболит Ala определялся в опухолях менингосудистого ряда в 92% случаев, но в глиальных опухолях головного мозга не выявлялся (рис. 3). На спектре и изображениях цветного картирования для менингиомы по сравнению со спектром от неизмененного вещества головного мозга с контралатеральной стороны характерно отсутствие содержания NAA, увеличение содержания Cho, увеличение соотношения Cho/Cr (до 2,89), появление Ala.

Злокачественные менингиомы в противовес доброкачественным идентифицировались умеренно выраженным повышением содержания Lac и непостоянным содержанием Ala (в около 40% наблюдений пик Ala на спектре не определялся). При менингиомах отмечено выраженное снижение доли NAA до 1–2% в отличие от опухолей глиального ряда – до 8–18%, а также появление пика Ala.

При сравнении изменений содержания метаболитов в ткани менингиомы, метастаза и глиобластомы установлено, что для менингиом (рис. 4) характерно отсутствие NAA, увеличение содержания Cho, появление пика Ala; для метастазов –

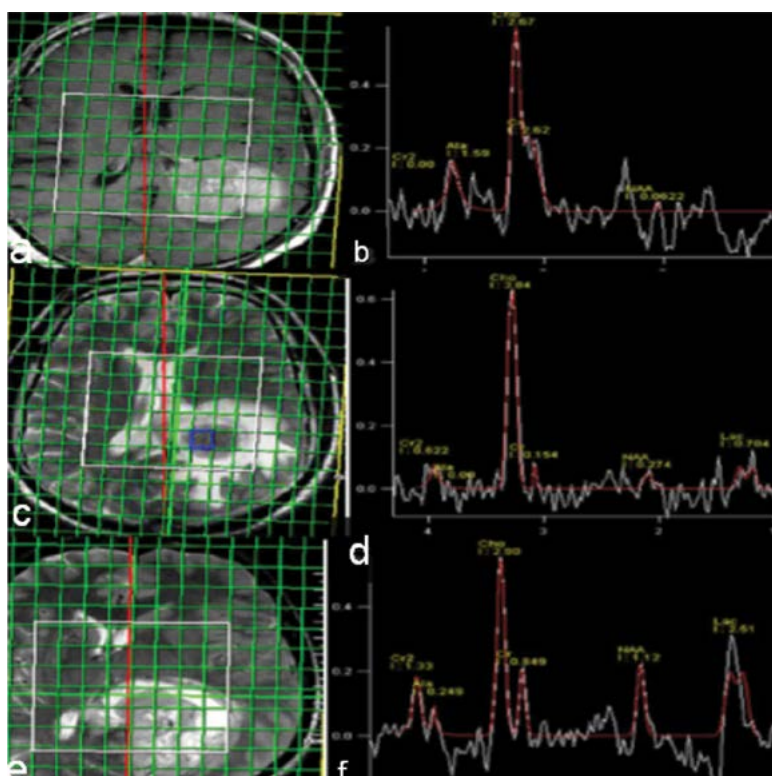


Рис. 4. Изменения содержания метаболитов в менингиоме (a, b), метастазе (c, d) и глиобластоме (e, f)
Fig. 4. Changes in the content of metabolites in meningioma (a, b), metastasis (c, d) and glioblastoma (e, f)

минимальное содержание NAA и Cr, значительное увеличение содержания Cho; для глиобластом – патогномонично значительное снижение NAA, умеренно выраженное снижение Cr, значительное увеличение содержания Cho и Lac.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные исследования показывают, что технологию МР-спектроскопии по водороду целесообразно использовать в диагностическом алгоритме исследования пациентов с опухолями головного мозга как для дифференциации, так и для уточнения степени анаплазии опухолей глиального ряда. Использование многовоксельной МРС позволяет определить зону с наибольшей пролиферацией, характеризующейся наибольшим содержанием Cho и соотношением Cho/Cr, что важно при выборе участка для биопсии. Контрольные МР-спектроскопические исследования рекомендованы для оценки в динамике прогрессирования глиомы, характеризующегося повышением уровня Cho более 45%. В непрогрессирующих опухолях уровень Cho уменьшается, остается неизменным или увеличивается менее чем на 35%.

Проведение статистического анализа данных, полученных при МРС, позволило определять характерные для менингиом минимальные значения доли NAA по сравнению с глиомами, а также наличие метаболита Ala. Опухоли же глиального ряда характеризовались промежуточными значениями долей NAA, Cr, а также отсутствием содержания Ala.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение МРС служит существенным дополнением к решению задач в области дифференциальной диагностики новообразований головного мозга и окружающих тканей. Оценка опухолей головного мозга с использованием многовоксельной МРС в сопоставлении с гистологическими особенностями позволяет повысить качество дифференциальной диагностики на этапе дооперационного обследования пациентов. МРС позволяет неинвазивно контролировать в динамике проводимого лечения течение заболевания на биохимическом уровне. Полученная информация может использоваться для определения целей лучевой терапии с мониторингом эффективности, а также для определения точки биопсии. Использование МР-спектроскопии весьма актуально, и дальнейшее целенаправленное изучение этой технологии исследования открывает широкую перспективу получения новых данных о структуре и составе опухолей, что имеет большое значение для повышения эффективности лечения и прогноза течения заболеваний.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kitayev VM. *Radiation diagnosis of brain diseases*. Moscow: MEDpress-inform; 2018. 136 p. (in Russian)
2. Trofimova TN. *Radiology of cerebral gliomas: diagnosis and monitoring*. Moscow: Foliant; 2020. 564 p. (in Russian)
3. Trufanov AG, Litvinenko IV, Tarumov DA, et al. *Magnetic resonance spectroscopy: a textbook*. Kazan: Buk; 2018. 150 p. (in Russian)
4. Kholin AV. *Magnetic resonance imaging in diseases and injuries of the central nervous system*. Moscow: MEDpress-inform; 2019. 256 p. (in Russian)
5. Špero M, Vavro H. *Neuroradiology – Images vs Symptoms*. Cham: Springer; 2021. 227 p.
6. Kermer P, Rohkamm R. *Die neurologische Untersuchung*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2021. 384 p.
7. Hermans R. *Head and Neck Cancer Imaging*. Cham: Springer; 2021. 517 p.
8. Ramakrishna R, Magge RS, Baaj AA, Knisely JPS. *Central Nervous System Metastases*. Cham: Springer; 2020. 734 p.
9. Dierckx RAJO, Otte A, de Vries EJJ, van Waarde A, Leenders KL. *PET and SPECT in Neurology*. Cham: Springer; 2021. 1289 p.
10. Davis SF, Kaye AD. *Principles of Neurophysiological Assessment, Mapping, and Monitoring*. Cham: Springer; 2020. 316 p.
11. Mallick S, Giridhar P, Rath GK. *Evidence-based practice in neuro-oncology*. Singapore: Springer; 2021. 432 p.
12. Moritani T, Capizzano AA. *Diffusion-Weighted MR Imaging of the Brain, Head and Neck, and Spine*. Cham: Springer; 2021. 928 p.



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.4.011>
УДК 616.314.17-002-036-078.088.7



Полуян О.С.✉, Костюк С.А., Мельникова Т.Ю., Юдина Н.А.
Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения
Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

Полиморфизмы генов коллагена и рецептора витамина D как молекулярно-генетические факторы риска формирования воспалительных заболеваний периодонта

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Полуян О.С., Костюк С.А.; сбор материала – Мельникова Т.Ю., Юдина Н.А.; обработка материала, написание текста – Полуян О.С.; редактирование – Костюк С.А.

Подана: 28.03.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: olga.poluyan@mail.ru

Резюме

Цель. Установить молекулярно-генетические факторы риска формирования воспалительных заболеваний периодонта на основании изучения полиморфизмов генов коллагена и рецептора витамина D.

Материалы и методы. В исследование включено 123 образца биологического материала (соскоб клеток эпителия ротовой полости), в которых с использованием усовершенствованного метода ПЦР в реальном времени проводили выявление полиморфизмов Sp1 (G1546T) гена COL1A1, TaqI (+61968 T>C) и Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR. Для установления значимости различий исходов в зависимости от воздействия фактора риска использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса. Для оценки силы связи между фактором риска и исходом использовали критерий ϕ . Для сравнения исследуемых групп по частоте выявления факторов риска развития заболевания использовали расчет относительного риска и отношения шансов со сведением данных в таблицу 2x2. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p < 0,05$.

Результаты. Проведены молекулярно-генетические исследования по определению полиморфных вариантов Sp1 (G1546T) гена COL1A1, TaqI (+61968 T>C) гена VDR и Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR. Установлено разнообразие распределения исследуемых генов в зависимости от нозологической формы воспалительного заболевания периодонта. Осуществлен статистический анализ полученных результатов, на основании которого определены молекулярно-генетические факторы риска формирования хронического гингивита, хронического периодонтита, хронического сложного периодонтита и сложного агрессивного периодонтита.

Заключение. Риск формирования хронического гингивита увеличивается при выявлении в биологическом материале пациента T-аллеля и tt-генотипа TaqI (+61968 T>C) гена VDR, а также G-аллеля и GG-генотипа Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR. Риск развития хронического периодонтита связан с наличием у пациента G-аллеля и GG-генотипа

Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR. Риск развития хронического сложного периодонтита возрастает при выявлении G-аллеля и GG-генотипа Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR. Выявление в содержимом зубодесневого кармана T-аллеля и tt-генотипа TaqI (+61968 T>C) гена VDR, а также G-аллеля и GG-генотипа Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR увеличивает риск развития у пациента сложного агрессивного периодонтита.

Ключевые слова: ПЦР, ген α -1 цепи коллагена 1-го типа, ген рецептора витамина D, полиморфизм, аллель, генотип, относительный риск

Poluyan O.✉, Kostiuk S., Melnikova T., Yudina N.

Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Polymorphisms of Collagen and Vitamin D Receptor Genes as Molecular Genetic Risk Factors for the Inflammatory Periodontal Diseases Formation

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and design of the study – Poluyan O., Kostiuk S.; collection of material – Melnikova T., Yudina N.; material processing, text writing – Poluyan O.; editing – Kostiuk S.

Submitted: 28.03.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: olga.poluyan@mail.ru

Abstract

Purpose. To establish molecular genetic risk factors for the inflammatory periodontal diseases formation based on the study of polymorphisms of collagen and vitamin D receptor genes.

Materials and methods. The study included 123 samples of biological material (scraping of the epithelial cells of the oral cavity), in which polymorphisms Sp1 (G1546T) of the COL1A1 gene, TaqI (+61968 T>C) and Cdx2 (-3731 A>G) of the VDR gene were detected using an improved real-time PCR method. To establish the significance of the differences in outcomes depending on the impact of the risk factor, the χ^2 Pearson criterion was used. To assess the strength of the relationship between the risk factor and the outcome, the criterion ϕ was used. To compare the studied groups by the frequency of detection of risk factors for the development of the disease, the calculation of relative risk and odds ratio was used with the data being summarized in a 2x2 table. The critical level of significance when testing statistical hypotheses is assumed to be $p < 0.05$.

Results. Molecular genetic studies were carried out to determine polymorphic variants of Sp1 (G1546T) of the COL1A1 gene, TaqI (+61968 T>C) of the VDR gene and Cdx2 (-3731 A>G) of the VDR gene. The diversity of the distribution of the studied genes has been established depending on the nosological form of inflammatory periodontal disease. A statistical analysis of the results obtained was carried out, on the basis of which the molecular genetic risk factors for the formation of chronic gingivitis, chronic periodontitis, chronic complex periodontitis and complex aggressive periodontitis were determined.



Conclusion. The risk of developing chronic gingivitis increases when the T-allele and tt-genotype TaqI (+61968 T>C) of the VDR gene, as well as the G-allele and GG-genotype Cdx2 (-3731 A>G) of the VDR gene are detected in the patient's biological material. The risk of developing chronic periodontitis is associated with the presence in the patient of the G-allele and GG genotype Cdx2 (-3731 A>G) of the VDR gene. The risk of developing chronic complex periodontitis increases when the G-allele and GG-genotype Cdx2 (-3731 A>G) of the VDR gene are detected. Detection of the T-allele and tt-genotype TaqI (+61968 T>C) of the VDR gene in the contents of the dentoalveolar pocket, as well as the G-allele and GG-genotype Cdx2 (-3731 A>G) of the VDR gene increases the risk of developing complex aggressive periodontitis in the patient.

Keywords: PCR, type 1 collagen α -1 gene, vitamin D receptor gene, polymorphism, allele, genotype, relative risk

■ ВВЕДЕНИЕ

Распространенность изменений минеральной плотности зубов и периодонта составляет 80%, а у людей в возрасте старше 40 лет изменения выявляются в 100% случаев [12]. Встречаемость патологии твердых тканей зубов и периодонта увеличивается с возрастом. Существенный «прирост» данной патологии отмечен у женщин в пре- и постменопаузальном периоде [2]. После 45 лет частота заболеваний периодонта у женщин составляет 58,7% по сравнению с 26,6% в возрасте 20–30 лет [3]. Исследованиями стоматологов и остеологов определена роль гипоэстрогемии у женщин в постменопаузальном периоде в развитии системного остеопороза и патологических процессов в зубочелюстной системе [4].

К настоящему времени выделена группа генов-кандидатов, отвечающих за снижение минеральной плотности костей, к перечню которых отнесен и ген α -1 цепи коллагена 1-го типа (COL1A1). Мутации в генах, участвующих в образовании коллагена, могут быть причиной структурно-функциональных изменений основного компонента соединительной ткани и приводить к развитию ряда заболеваний, в том числе остеопороза. Одной из таких мутаций является полиморфизм Sp1 в гене COL1A1 (rs1800012), который приводит к увеличению соотношения α -1 и α -2 цепей коллагена и в конечном итоге к ухудшению костной микроархитектуры [5].

Ген α 1-цепи коллагена 1-го типа (COL1A1) расположен на 17-й хромосоме в области q21.3-22. В первом интроне гена COL1A1 существует сайт узнавания для транскрипционного фактора Sp1, в котором обнаружена замена гуанина на тимин (1546G>T; af017178), приводящего к возникновению Col1A1*s аллеля, функциональная активность которого составляет не более 16% по сравнению с Col1A1*S аллелем [6].

Влияние полиморфизма Sp1 гена COL1A1, а также уровней экспрессии данного гена на минеральную плотность костной ткани изучалось и ранее. Однако имеющиеся данные свидетельствуют о противоречивости полученных результатов. Кроме того, проводимые ранее немногочисленные [7, 8] исследования по определению роли структурного и функционального состояния гена альфа-1 цепи коллагена 1 в развитии нарушений минеральной плотности тканей не позволяют в достаточной мере раскрыть накопившиеся вопросы и сделать достаточно обоснованные выводы.

Витамин D является стероидным соединением, обладающим такими биологическими эффектами, как участие в фосфорно-кальциевом обмене, влияние на дифференцировку клеток костной ткани, процессы остеосинтеза и резорбции, регуляция костного метаболизма [9]. Рецептор витамина D входит в суперсемейство стероидных ядерных рецепторов и обязателен для реализации большинства известных биологических эффектов витамина D [9, 10]. В гене рецептора витамина D (VDR) существует более 200 однонуклеотидных замен, обуславливающих функциональное состояние рецептора.

Известно, что рецепторы витамина D кодируются одноименным геном VDR (также известным как NR111), локализованным на хромосоме 12q12-q14. Для данного гена характерен полиморфизм, то есть существование различных аллельных вариантов этого гена в популяции [11]. Наиболее значимые полиморфизмы гена VDR, участвующие в развитии заболеваний: Cdx2 (расположен в 1-м экзоне), BsmI и ApaI (расположены в 8-м интроне), FokI (расположен во 2-м экзоне), TaqI (расположен в 9-м экзоне) [11]. Во многих исследованиях была установлена связь полиморфизма гена VDR с такими заболеваниями, как сахарный диабет, остеопороз, уролитиаз, псориаз, почечная остеодистрофия, различные новообразования, заболевания периодонта, а также различные сердечно-сосудистые заболевания [11, 12].

Полиморфные генотипы гена VDR, с одной стороны, играют важную роль в минерализации кости и метаболизме костной ткани. Доказано, что кинетика кальция и темпы накопления минерала в кости в пубертатный период связаны с полиморфными вариантами гена VDR [9, 13]. Частота гиперкальциурии была выше у носителей аллеля t и генотипа tt TaqI VDR [9, 14].

При этом роль полиморфизма гена VDR в процессах метаболизма костной ткани остается неоднозначной. Из четырех полиморфизмов (BsmI, FokI, ApaI и TaqI) гена VDR, исследованных у 395 детей из Польши в возрасте 6–18 лет, только «a»-аллель ApaI VDR был ассоциирован с более высокими показателями костной минеральной плотности и содержания минерала в кости, причем только в группе детей, у которых показатель костной минеральной плотности (BMD Z-score) находился в промежутке от -1,1 до -2,0 SD [9, 15]. В исследовании, выполненном в Нидерландах, изучалась роль BsmI-, ApaI-, TaqI-полиморфных генотипов гена VDR в костном метаболизме у 148 детей и молодых взрослых на протяжении 4-летнего периода. Не было выявлено роли каждого полиморфизма по отдельности, но комбинированный гаплотип bAT, содержащий аллель T TaqI-VDR, оказывал влияние на линейный рост и размеры позвонков. В свою очередь, увеличение числа аллелей риска в гаплотипе было ассоциировано с задержкой линейного роста ($p=0,006$) и задержкой размера позвонков ($p=0,001$) [9, 16]. В датском исследовании, в которое были включены 223 девочки в возрасте 11–12 лет, не было выявлено влияния FokI и TaqI VDR-полиморфизмов на минерализацию кости и ее метаболизм. Только ff-генотип был ассоциирован с большим линейным ростом, роль TaqI-полиморфных генотипов в этом исследовании осталась невыясненной [9, 17]. В близнецовых исследованиях Австралии ($n=3906$) и Нидерландов ($n=1689$) не было обнаружено влияния BsmI-, FokI-, TaqI- и (-1521) VDR-полиморфных генотипов на линейный рост [9, 18]. У носителей аллеля G (Cdx2) VDR транскрипционная активность гена снижена до 70% от уровня носителей аллеля A. В работах по изучению данного полиморфизма также было отмечено, что наличие мутантного аллеля A обеспечивает устойчивость носителя к потере минеральной плотности костной ткани в условиях сниженного потребления кальция [19, 20].



Изучение влияния молекулярно-генетических факторов на риск развития тяжелых форм воспалительных заболеваний периодонта является основой современной персонифицированной медицины, поскольку дает возможность прогнозировать развитие заболевания, характер течения и риск возможных осложнений.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить молекулярно-генетические факторы риска формирования воспалительных заболеваний периодонта на основании изучения полиморфизмов генов коллагена и рецептора витамина D.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве биологического материала для установления структурного полиморфизма генов COL1A1 и VDR использовали содержимое периодонтального кармана 108 пациенток с заболеваниями периодонта, проходивших амбулаторное лечение на базе кафедры общей стоматологии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», а также 15 практически здоровых женщин, составивших группу контроля.

На основании установленного этиологического диагноза были сформированы следующие группы пациентов с заболеваниями периодонта: группа 1 (n=26) – пациентки с хроническим гингивитом; группа 2 (n=22) – пациентки с хроническим периодонтитом; группа 3 (n=35) – пациентки с хроническим сложным периодонтитом; группа 4 (n=25) – пациентки со сложным агрессивным периодонтитом; группа 5 (n=15) – контрольная группа.

Выделение ДНК из образцов биологического материала, основанное на принципе связывания нуклеиновых кислот с силикатными сорбентами в присутствии хаотропных солей и их последующей элюции в низкосолевого буфера, проводили с использованием наборов реагентов «АртДНК MiniSpin» (производитель «АртБиоТех», Республика Беларусь).

Для определения концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводили спектрофотометрические исследования (NanoDrop 1000, ThermoScientific, США), при этом определяли отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A₂₆₀/A₂₈₀).

В качестве мишеней для дизайна специфических олигонуклеотидных праймеров выбраны ген, кодирующий α-1 цепь коллагена 1-го типа (COL1A1), и ген рецептора витамина D (VDR).

Для выявления полиморфизма Sp1 (G1546T) гена COL1A1 использовали следующие пары специфических олигонуклеотидных праймеров:

C-01-F 5'-CCAATCAGCCGCTCCCATTC-3';

C-01-R 5'-CATCGGGAGGGCAGGCTC-3'.

Для выявления полиморфизмов TaqI (+61968 T>C) и Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR использовали следующие пары специфических олигонуклеотидных праймеров:

Taq-F 5'-GACCTAGGTCTGGATCCTAA-3';

Taq-R 5'-GTCCTAGTCAGGAGATCTCA-3' (для выявления TaqI (+61968 T>C));

Cdx-F 5'-ACTCTCTTATTTATGTTCCAGA-3';

Cdx-R 5'-GGAАCTTATATATATTCCTGAGTAAACTA-3' (для выявления Cdx2 (-3731 A>G)).

Состав реакционной смеси для выявления полиморфизма Sp1 (G1546T) гена COL1A1: 1 мкл геномной ДНК (100 мг/л), 0,4 мкл каждого праймера (5 мМ), 0,2 мкл Taq-полимеразы (1 Ед/мкл), 5 мкл Master-Mix, 13,0 мкл воды, обработанной диэтилпи-рокарбонатом (DEPC); конечный объем – 20 мкл. Условия термоциклирования для выявления полиморфизма Sp1 (G1546T) гена COL1A1: 94 °С 4 мин. (горячий старт); 35 циклов – 94 °С 45 с. (денатурация), 57 °С 45 с. (отжиг), 72 °С 5 с. (элонгация); 72 °С 1 мин. Амплификат, наработанный при ПЦР полиморфного локуса гена COL1A1, под-вергали ферментативному гидролизу с использованием рестриктазы VseNI (к 20 мкл амплификата добавляли 5 ед. активности рестриктазы и инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 12 часов). Полиморфизм Sp1 (G1546T) гена COL1A1 характеризовался наличием нуклеотидной замены G→Т в позиции 1546, для выяв-ления которой ПЦР-продукт предварительно обрабатывался рестриктазой VseNI. Детекцию полученных результатов проводили электрофоретически в 3%-ном ага-розном геле.

Состав реакционной смеси для выявления полиморфизма TaqI (+61968 T>C) гена VDR: 1 мкл геномной ДНК (60 мг/л), 0,4 мкл каждого праймера (5 мМ), 0,2 мкл Taq-полимеразы (1 Ед/мкл), 5 мкл Master-Mix, 13,0 мкл воды, обработанной диэтилпи-рокарбонатом (DEPC); конечный объем – 20 мкл. Условия термоциклирования для выявления полиморфизма TaqI (+61968 T>C) гена VDR: 94 °С 5 мин. (горячий старт); 40 циклов – 94 °С 30 с. (денатурация), 62 °С 40 с. (отжиг), 72 °С 10 с. (элонгация); 72 °С 1 мин. Амплификат, наработанный при ПЦР полиморфного локуса TaqI гена VDR, под-вергали ферментативному гидролизу с использованием рестриктазы TaqI (к 5 мкл амплификата добавляли 8 мкл дистиллированной воды, 1,5 мкл 10×SE-буфера Y с BSA, 0,5 мкл рестриктазы и инкубировали при температуре 65 °С в течение 16 часов). Полиморфизм TaqI (+61968 T>C) гена VDR характеризовался наличием нуклеотидной замены T→С в позиции 61968, для выявления которой ПЦР-продукт предвари-тельно обрабатывался рестриктазой TaqI. Детекцию полученных результатов проводили электрофоретически в 3%-ном агарозном геле.

Состав реакционной смеси для выявления полиморфизма Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR: 1 мкл геномной ДНК (65 мкг/мкл), 0,4 мкл каждого праймера (5 мМ), 0,2 мкл Taq-полимеразы (1 Ед/мкл), 5 мкл Master-Mix, 13,0 мкл воды, обработанной диэтилпи-рокарбонатом (DEPC); конечный объем – 20 мкл. Условия термоциклирования для выявления полиморфизма Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR: 95 °С 5 мин. (горячий старт); 45 циклов – 95 °С 30 с. (денатурация), 60 °С 30 с. (отжиг), 72 °С 10 с. (элонгация); 72 °С 1 мин. Амплификат, наработанный при ПЦР полиморфного локуса Cdx2 гена VDR, под-вергали ферментативному гидролизу с использованием рестриктазы Bst4C I (к 5 мкл амплификата добавляли 8 мкл дистиллированной воды, 1,5 мкл 10×SE-буфера Y, 0,5 мкл рестриктазы и инкубировали при температуре 65 °С в течение 16 часов). По-лиморфизм Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR характеризовался наличием нуклеотидной замены A→G в позиции 3731, для выявления которой ПЦР-продукт предвари-тельно обрабатывался рестриктазой Bst4C I. Детекцию полученных результатов проводили электрофоретически в 3%-ном агарозном геле.

Определение генотипов (установление спектров гомо- и гетерозигот) полиморф-ных вариантов генов проводили с применением метода анализа кривых плавления продуктов ПЦР высокого разрешения (high resolution melting analysis – HRM-анализ) с использованием интеркалирующего красителя EvaGreen. В пробирки вносили: 10 мкл



SsoFast EvaGreen, 2 мкл прямого праймера, 2 мкл обратного праймера, 6 мкл выделенной ДНК. Общий объем пробы составил 20 мкл. Пробы помещали в амплификатор. Программировали прибор по следующей программе: 98 °С – 3 мин. (активация фермента); 40 циклов 98 °С – 5 сек. (денатурация), 55 °С – 5 сек. (отжиг/элонгация). Снятие кривых плавления, представляющее собой повышение температуры от 75 °С до 95 °С с регистрацией интенсивности флуоресценции, проводили с шагом 0,5 °С (5 сек. на шаг).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием онлайн-калькулятора – <https://medstatistic.ru>. Для установления значимости различий исходов в зависимости от воздействия фактора риска использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса. Для оценки силы связи между фактором риска и исходом использовали критерий ϕ . Для сравнения исследуемых групп по частоте выявления факторов риска развития заболевания использовали расчет относительного риска и отношения шансов со сведением данных в таблицу 2x2. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Учет данных проведенных молекулярно-генетических исследований по распределению аллельных вариантов (табл. 1), а также по определению генотипного профиля (табл. 2) проводили в контексте групп исследования.

Таблица 1
Распределение аллельных вариантов в зависимости от группы исследования
Table 1
Distribution of allelic variants depending on the study group

Полиморфизм Sp1 (G1546T) гена COL1A1				
Группа исследования	Аллель S		Аллель s	
	n	%	n	%
Пациентки с хроническим гингивитом (n=26)	36	69,23	16	30,77
Пациентки с хроническим периодонтитом (n=19)	24	63,16	14	36,84
Пациентки с хроническим сложным периодонтитом (n=35)	42	60,00	28	40,00
Пациентки со сложным агрессивным периодонтитом (n=25)	27	54,00	23	46,00
Контрольная группа практически здоровых женщин (n=15)	22	73,33	8	26,67
Полиморфизм TaqI (+61968 T>C) гена VDR				
Группа исследования	Аллель T		Аллель t	
	n	%	n	%
Пациентки с хроническим гингивитом (n=26)	39	75,00	13	25,00
Пациентки с хроническим периодонтитом (n=19)	22	57,89	16	42,11
Пациентки с хроническим сложным периодонтитом (n=35)	44	62,86	26	37,14
Пациентки со сложным агрессивным периодонтитом (n=25)	10	20,00	40	80,00
Контрольная группа практически здоровых женщин (n=15)	15	50,00	15	50,00
Полиморфизм Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR				
Группа исследования	Аллель G		Аллель A	
	n	%	n	%
Пациентки с хроническим гингивитом (n=26)	38	73,08	14	26,92
Пациентки с хроническим периодонтитом (n=22)	35	79,55	9	20,45
Пациентки с хроническим сложным периодонтитом (n=35)	42	60,00	28	40,00
Пациентки со сложным агрессивным периодонтитом (n=25)	33	66,00	17	34,00
Контрольная группа практически здоровых женщин (n=15)	10	33,33	20	66,67

Примечание: n – количество пациентов.

При анализе генетической структуры пациентов с воспалительными заболеваниями периодонта была установлена неравномерность распределения аллельных вариантов исследуемых генов в зависимости от нозологической формы заболевания.

При анализе данных молекулярно-генетических исследований по изучению полиморфизма Sp1 (G1546T) гена COL1A1 нами не было выявлено статистически значимых ($p > 0,05$) достоверных факторов риска формирования воспалительных заболеваний периодонта.

Анализ данных, полученных при исследовании полиморфизма TaqI (+61968 T>C) гена VDR, позволил установить, что частота выявления аллельного варианта T (а также генотипного профиля TT) статистически значимо ($p < 0,05$) отличалась для группы пациентов с хроническим гингивитом (0,75 и 0,62 соответственно)

Таблица 2
Распределение генотипов в зависимости от группы исследования
Table 2
Distribution of genotypes depending on the study group

Полиморфизм Sp1 (G1546T) гена COL1A1						
Группа исследования	Генотип GG		Генотип GT		Генотип TT	
	n	%	n	%	n	%
Пациентки с хроническим гингивитом (n=26)	18	69,23	–		8	30,77
Пациентки с хроническим периодонтитом (n=19)	11	57,89	2	10,53	6	31,58
Пациентки с хроническим сложным периодонтитом (n=35)	19	54,29	4	11,43	12	34,28
Пациентки со сложным агрессивным периодонтитом (n=25)	13	52,00	1	4,00	11	44,00
Контрольная группа практически здоровых женщин (n=15)	11	73,33	–		4	26,67
Полиморфизм TaqI (+61968 T>C) гена VDR						
Группа исследования	Генотип TT		Генотип tt		Генотип Tt	
	n	%	n	%	n	%
Пациентки с хроническим гингивитом (n=26)	16	61,54	3	11,54	7	26,92
Пациентки с хроническим периодонтитом (n=19)	7	36,84	4	21,05	8	42,11
Пациентки с хроническим сложным периодонтитом (n=35)	14	40,00	5	14,29	16	45,71
Пациентки со сложным агрессивным периодонтитом (n=25)	1	4,00	16	64,00	8	32,00
Контрольная группа практически здоровых женщин (n=15)	2	13,33	2	13,33	11	73,34
Полиморфизм Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR						
Группа исследования	Генотип AA		Генотип GG		Генотип AG	
	n	%	n	%	n	%
Пациентки с хроническим гингивитом (n=26)	3	11,54	15	57,69	8	30,747
Пациентки с хроническим периодонтитом (n=22)	–		13	59,09	9	40,91
Пациентки с хроническим сложным периодонтитом (n=35)	5	14,28	12	34,29	18	51,43
Пациентки со сложным агрессивным периодонтитом (n=25)	3	6,00	11	44,00	11	44,00
Контрольная группа практически здоровых женщин (n=15)	6	40,00	1	8,67	8	53,33



по сравнению с другими группами, в частности с группой контроля. Обращает на себя внимание и факт достоверно ($p < 0,05$) более частой встречаемости аллеля *t* и генотипа *tt* в группе пациентов со сложным агрессивным периодонтитом (0,80 и 0,64 соответственно) по сравнению с другими группами.

Проведенный анализ данных показал наиболее широкое разнообразие частоты встречаемости аллельных вариантов и генотипного профиля полиморфизма *Cdx2* (-3731 A>G) гена *VDR* в исследуемых группах. Частота выявления аллеля *G* и генотипа *GG* статистически значимо ($p < 0,05$) различалась между всеми группами пациентов с воспалительными заболеваниями тканей периодонта по сравнению с контрольной группой.

На основании полученных данных нами было выдвинуто предположение о влиянии аллельных вариантов и генотипного профиля полиморфизмов *TaqI* (+61968 T>C) и *Cdx2* (-3731 A>G) гена *VDR* на риск формирования воспалительных заболеваний периодонта. Анализ значимости различий по частоте встречаемости признаков проводили с помощью критерия χ^2 в таблице сопряженности 2×2 .

При хроническом гингивите для *T*-аллеля *TaqI* (+61968 T>C) гена *VDR* критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 4,234 ($p = 0,040$), критерий $\phi = 0,254$ (средняя сила связи), относительный риск $OR = 1,556$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,011–2,393), отношение шансов $ОШ = 3,000$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,158–7,772). Для *tt*-генотипа χ^2 с поправкой Йейтса составил 7,706 ($p = 0,006$), критерий $\phi = 0,520$ (относительно сильная сила связи), относительный риск $OR = 2,286$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,252–4,172), отношение шансов $ОШ = 12,571$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 2,187–72,270). Для *G*-аллеля *Cdx2* (-3731 A>G) гена *VDR* критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 10,798 ($p = 0,002$), критерий $\phi = 0,398$ (средняя сила связи), относительный риск $OR = 1,923$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,254–2,974), отношение шансов $ОШ = 5,429$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 2,046–14,400). Для *GG*-генотипа χ^2 с поправкой Йейтса составил 7,648 ($p = 0,006$), критерий $\phi = 0,646$ (сильная сила связи), относительный риск $OR = 2,813$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,107–7,147), отношение шансов $ОШ = 30,000$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 2,580–348,787).

При хроническом периодонтите для *G*-аллеля *Cdx2* (-3731 A>G) гена *VDR* критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 13,073 ($p < 0,001$), критерий $\phi = 0,550$ (относительно сильная сила связи), относительный риск $OR = 2,506$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,425–4,408), отношение шансов $ОШ = 7,778$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 2,708–22,336). Для *GG*-генотипа χ^2 с поправкой Йейтса составил 4,158 ($p = 0,042$), критерий $\phi = 0,348$ (относительно сильная сила связи), относительный риск $OR = 1,754$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,095–2,810), отношение шансов $ОШ = 11,556$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,223–109,190).

При хроническом сложном периодонтите для *G*-аллеля *Cdx2* (-3731 A>G) гена *VDR* критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 4,962 ($p = 0,026$), критерий $\phi = 0,245$ (средняя сила связи), относительный риск $OR = 1,385$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,053–1,820), отношение шансов $ОШ = 3,000$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,223–7,358). Для *GG*-генотипа χ^2 с поправкой Йейтса составил 4,266 ($p = 0,039$), критерий $\phi = 0,514$ (относительно сильная сила связи), относительный риск $OR = 2,031$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,043–3,953), отношение шансов $ОШ = 14,400$ (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,359–152,533).

При сложном агрессивном периодонтите для T-аллеля TaqI (+61968 T>C) гена VDR критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 6,520 ($p=0,011$), критерий $\phi=0,313$ (средняя сила связи), относительный риск ОР=1,818 (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,095–3,018), отношение шансов ОШ=4,000 (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,477–10,832). Для tt-генотипа χ^2 с поправкой Йейтса составил 6,943 ($p=0,009$), критерий $\phi=0,490$ (относительно сильная сила связи), относительный риск ОР=2,111 (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,216–3,666), отношение шансов ОШ=11,000 (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,952–62,001). Для G-аллеля Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR критерий χ^2 с поправкой Йейтса составил 6,788 ($p=0,010$), критерий $\phi=0,317$ (средняя сила связи), относительный риск ОР=1,670 (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,135–2,458), отношение шансов ОШ=3,882 (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,489–10,124). Для GG-генотипа χ^2 с поправкой Йейтса составил 5,469 ($p=0,020$), критерий $\phi=0,612$ (сильная сила связи), относительный риск ОР=2,750 (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,075–7,037), отношение шансов ОШ=22,000 (нижняя – верхняя границы 95% ДИ 1,261–1,857).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных молекулярно-генетических исследований по определению полиморфизмов Sp1 (G1546T) гена COL1A1, TaqI (+61968 T>C) гена VDR и Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR установлено, что различные нозологические формы воспалительных заболеваний периодонта характеризуются разнообразием полиморфных вариантов указанных генов.

В ходе исследования выявлена тенденция увеличения риска формирования хронического гингивита в 1,56 раза при выявлении в биологическом материале пациента T-аллеля TaqI (+61968 T>C) гена VDR; в 2,29 раза – при выявлении tt-генотипа TaqI (+61968 T>C) гена VDR. При выявлении G-аллеля Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR тенденция риска развития данного заболевания увеличивается в 1,92 раза, при выявлении GG-генотипа – в 2,81 раза.

Риск развития хронического периодонтита связан с наличием у пациента G-аллеля (риск увеличивается в 2,51 раза) и GG-генотипа (риск увеличивается в 1,75 раза) Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR.

Риск развития хронического сложного периодонтита возрастает в 1,39 раза при выявлении в биологическом материале пациента G-аллеля Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR и в 2,03 раза при выявлении GG-генотипа Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR.

Выявление в содержимом зубодесневого кармана T-аллеля TaqI (+61968 T>C) гена VDR увеличивает риск развития у пациента сложного агрессивного периодонтита в 1,82 раза, tt-генотипа TaqI (+61968 T>C) гена VDR – в 2,11 раза; выявление G-аллеля Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR – в 1,67 раза, GG-генотипа Cdx2 (-3731 A>G) гена VDR – в 2,75 раза.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Arutyunov S.D., Pleskanovskaya N.V., Naumov A.V. Periodontal disease and "systemic diseases": the known past. promising future. *Parodontologiya*. 2009;1:3–6. (in Russian)
2. Atrushkevich V.G. Osteoporosis and periodontitis. *Periodontitis: monograph*. Moscow: MedPress. 2004:350–355. (in Russian)
3. Udovitskaya E.V. *Endocrinological aspects of dentistry*. Moscow: Meditsina. 1975; 192 p. (in Russian)
4. Povoroznyuk V.V., Mazur I.P. Osteoporosis and periodontal diseases. *Zdorov'ye Ukrainy*. 2003;7:3–7. (in Russian)



5. Dytfeld J., Marcinkowska M., Drwęska-Matelska N. Association analysis of the COL1A1 polymorphism with bone mineral density and prevalent fractures in Polish postmenopausal women with osteoporosis. *Arch. Med. Sci.* 2016;12(2):288–294. doi: 10.5114/aoms.2016.59253
6. Berg J.P., Lehmann E.H., Stakkestad J.A. The Sp1 binding site polymorphism in the collagen type I alpha 1 (COL1A1) gene is not associated with bone mineral density in healthy children, adolescents, and young adults. *Eur J Endocrinol.* 2000;143:261–265. doi: 10.1530/eje.0.1430261
7. Khusainova R.I., Selezneva L.I., Valiev R.R. Study of the molecular genetic basis for the development of postmenopausal osteoporosis in the Volga-Ural region. *Meditsinskaya genetika.* 2009;5:12–19. (in Russian)
8. Dehghan M., Pourahmad-Jaktaji R. Sp1 binding site polymorphism of a collagen gene (rs 1800012) in women aged 45 and over and its association with bone density. *Turk. J. Med. Sci.* 2015;45(3):644–650. doi: 10.3906/sag-1405-80
9. Gabrusskaya T.V., Kostik M.M., Nasykhova Yu.A. Influence of TaqI-genetic polymorphism of the vitamin D receptor gene on the state of bone metabolism in children with inflammatory bowel diseases. *Pediatrics.* 2017;3(8):111–119. doi: <https://doi.org/10.17816/PED83111-119>. (in Russian)
10. Xue L.N., Xu K.Q., Zhang W. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and crohn's disease: a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(1):54–60. doi: 10.1002/ibd.22966
11. Holick M.F., Binkley N.C., Bischoff-Ferrari H.A. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911–1930. doi: 10.1210/jc.2011-0385
12. Uitterlinden A.G., Fang Y., Van Meurs J.B. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms: Review. *Gene.* 2004;338:143–156. doi: 10.1016/j.gene.2004.05.014
13. Abrams S.A., Griffin I.J., Hawthorne K.M. Vitamin D receptor FokI polymorphisms affect calcium absorption, kinetics, and bone mineralization rates during puberty. *J Bone Miner Res.* 2005;20:945–953. doi: 10.1359/JBMR.050114
14. Seyhan S., Yavascaoglu I., Kilicarslan H. Association of vitamin D receptor gene Taq I polymorphism with recurrent urolithiasis in children. *Int J Urol.* 2007;14:1060–1062. doi: 10.1111/j.1442-2042.2007.01899.x
15. Jakubowska-Pietkiewicz E., Młynarski W., Klich I. Vitamin D receptor gene variability as a factor influencing bone mineral density in pediatric patients. *Mol Biol Rep.* 2012;16. doi: 10.1007/s11033-012-1444-z
16. van der Sluis I.M., de Muinck Keizer-Schrama S.M., Krenning E.P. Vitamin D receptor gene polymorphism predicts height and bone size, rather than bone density in children and young adults. *Calcif Tissue Int.* 2003;73:332–338. doi: 10.1007/s00223-002-2130-2
17. Cusack S., Molgaard C., Michaelsen K.F. Vitamin D and estrogen receptor- α genotype and indices of bone mass and bone turnover in Danish girls. *J Bone Miner Metab.* 2006;24:329–336. doi: 10.1007/s00774-006-0691-2
18. Macgregor S., Hottenga J.J., Lind P.A. Vitamin D receptor gene polymorphisms have negligible effect on human height. *Twin Res Hum Gen.* 2008;11:488–494. doi: 10.1375/twin.11.5.488
19. Palshina A.M., Palshina S.G., Safonova S.L. Note to the clinician: a modern view on vitamin D metabolism and vitamin D receptor gene polymorphism. *Vestnik Severo-Vostochnogo federal'nogo universiteta im. M.K. Ammosova. Seriya: Meditsinskiye nauki.* 2018;3(12):34–42. doi: 10.25587/SVFU.2018.3(13).18855. (in Russian)
20. Zhang L., Yin X., Wang J. Associations between VDR Gene Polymorphisms and Osteoporosis Risk and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: A systematic review and Meta-Analysis. *Sci Rep.* 2018;8(1):981. doi: 10.1038/s41598-017-18670-7



Коваленя Т.А.¹, Кирко С.Н.², Белоновская Е.Б.², Кузьмицкая И.А.², Лапшина Е.А.¹,
Островская О.Б.³, Заводник И.Б.¹✉

¹ Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

² Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Беларусь

³ Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Протекторный эффект флавоноида нарингина при алкогольной кардиомиопатии у крыс

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Коваленя Т.А. – дизайн исследования; Лапшина Е.А. – обзор литературы, редактирование; Заводник И.Б. – концепция исследования, редактирование; Белоновская Е.Б. – дизайн исследования; Кирко С.Н. – дизайн исследования; Кузьмицкая И.А. – дизайн исследования; Островская О.Б. – дизайн исследования.

Подана: 05.06.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: zavodnik_il@mail.ru

Резюме

Введение. Алкогольная кардиомиопатия, развивающаяся в результате длительного потребления алкоголя, представляет серьезную медико-социальную проблему.

Цель. Оценить роль митохондриальной дисфункции в развитии алкогольной кардиомиопатии у крыс и выяснить возможный кардиопротекторный эффект флавоноида нарингина при алкогольной кардиомиопатии *in vivo*.

Материалы и методы. Алкогольную интоксикацию крыс-самцов линии Вистар вызывали путем длительного введения этанола (8 недель, 4 г/кг массы) в/ж, нарингин вводили ежедневно в дозе 40,0 мг/кг массы животного. Структуру митохондрий кардиомиоцитов анализировали методом электронной микроскопии, респираторную активность изолированных митохондрий сердца крыс определяли методом полярографии, биохимические параметры сыворотки крови регистрировали, используя тест-наборы НТПК «АНАЛИЗ Х» (Беларусь, Минск).

Результаты. Длительное введение этанола вызывало выраженный цитолиз клеток печени, что регистрировали по возрастанию активности маркерных ферментов в сыворотке крови, накоплению билирубина и триглицеридов, нарушению респираторной активности, диссипации митохондриального мембранного потенциала, повышению чувствительности митохондрий кардиомиоцитов к кальций-индуцируемому формированию пор высокой проницаемости. Введение флавоноида нарингина частично препятствовало развитию токсического эффекта этанола у крыс и восстанавливало респираторную активность митохондрий кардиомиоцитов и их чувствительность к Ca^{2+} . Внесение ионов экзогенного кальция в суспензию изолированных митохондрий сердца крыс *in vitro* индуцировало значительное возрастание гетерогенности митохондрий в результате Ca^{2+} -зависимого открытия митохондриальных пор высокой проницаемости.

Заключение. Обнаруженные функциональные нарушения митохондрий клеток сердца при длительном употреблении алкоголя могут явиться причиной нарушения



энергетики сердечной мышцы, что вносит вклад в прогрессирование алкогольной кардиомиопатии. Введение нарингина предотвращало функциональные нарушения митохондрий кардиомиоцитов крыс при интоксикации *in vivo* и воздействии ионов кальция на митохондрии *in vitro*.

Ключевые слова: алкогольная кардиомиопатия, митохондрии, сердце, флавоноид нарингин, респираторная активность

Kavalenia T.¹, Kirko S.², Belonovskaya E.², Kuzmitskaya I.², Lapshina E.¹, Astrowskaja A.³,
Zavodnik I.¹✉

¹ Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Belarus

² Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus

³ Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Protective Effect of the Flavonoid Naringin in Alcoholic Cardiomyopathy in Rats

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Kavalenia T. – design of investigation; Lapshina E. – literature review, edition; Zavodnik I. – conceptualization of investigation, edition; Belonovskaya E. – design of investigation; Kirko S. – design of investigation; Kuzmitskaya I. – design of investigation; Astrowskaja A. – design of investigation.

Submitted: 05.06.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: zavodnik_il@mail.ru

Abstract

Purpose. Alcoholic cardiomyopathy (ACM), which develops as a result of prolonged alcohol consumption, is a serious medical and social problem. The purpose of this work was to evaluate the role of mitochondrial dysfunction in the development of ACM in rats and to study the possible cardioprotective effect of the flavonoid naringin during ACM *in vivo*.

Materials and methods. Alcoholic intoxication in male Wistar rats was induced by long-term administration of ethanol (8 weeks, 4 g/kg of body weight). Naringin was administered daily at a dose of 40.0 mg/kg of body weight. Cardiomyocyte mitochondria structure was analyzed by the method of electron microscopy, the respiratory activity of isolated rat heart mitochondria was determined using polarography, and the biochemical parameters of rat blood serum were recorded applying test kits Analyz X (Belarus, Minsk).

Results. Long-term administration of ethanol caused a pronounced cytolysis of liver cells, which was recorded by an increase in marker enzyme activities in the blood serum and accumulation of bilirubin and triglycerides, impaired respiratory activity, dissipation of the mitochondrial membrane potential, and an increase in the sensitivity of cardiomyocyte mitochondria to calcium-induced formation of high permeability pores. The administration of naringin partially prevented the development of the toxic effects of ethanol in rats and restored the respiratory activity and sensitivity to Ca²⁺ of cardiomyocyte mitochondria. Exogenous calcium induced a significant increase in heterogeneity of isolated rat heart mitochondria as a result of Ca²⁺-dependent opening of high-permeability mitochondrial pores.

Conclusion. The functional disorders of heart mitochondria under prolonged alcohol intoxication cause impairment in the energetics of the heart muscle, which contributes to progression of alcoholic cardiomyopathy. The flavonoid naringin prevented functional disorders of cardiomyocyte mitochondria during intoxication in vivo and impairment in rat heart mitochondria by calcium ions in vitro.

Keywords: alcoholic cardiomyopathy, mitochondria, heart, flavonoid naringin, respiration

■ ВВЕДЕНИЕ

Динамические изменения структуры и функции митохондрий, сопровождаемые нарушением энергетики и окислительным стрессом, нарушением кальциевого гомеостаза, клеточной сигнализации, приводят к ряду патологий (сердечно-сосудистые заболевания, диабет, токсическое поражение, ожирение) [1, с. 526; 2, с. 893].

Рассмотрение митохондрий как субклеточной модели позволяет выявить основополагающие вопросы: каким образом функциональные перестройки системы трансформируются в патологические и каким образом можно корректировать этот процесс. Регуляция внутриклеточной концентрации свободного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) представляется определяющим фактором для процесса жизни и смерти кардиомиоцитов [3, с. 101]. При этом митохондрии выступают в качестве важнейшего сенсора кальциевого сигнала в кардиомиоцитах.

Алкогольная кардиомиопатия (АКМ), развивающаяся в результате длительного потребления алкоголя, представляет серьезную медико-социальную проблему и связана с нарушениями сократительной функции сердца, энергетики и ионного баланса сердечной мышцы, гипертензией. Предполагаемые механизмы, ведущие к развитию АКМ, включают взаимосвязанные клеточные процессы: нарушения метаболизма митохондрий сердца, окислительный стресс и апоптоз [4, с. 126]. В то же время детальные механизмы АКМ, как и способы коррекции митохондриальных и клеточных нарушений кардиомиоцитов, требуют своего выяснения. В настоящее время для оценки фармакологической активности тестируемых кардио- и гепатопротекторных агентов используются различные экспериментальные модели алкогольной интоксикации, поскольку отсутствуют модели, точно имитирующие патологию человека [9, с. 176]. В настоящем исследовании мы использовали хроническую интоксикацию крыс этанолом в сочетании с диетой с высоким содержанием жиров (HFD), что непосредственно имитирует образ жизни человека и особенности связанных с ним токсических повреждений тканей.

Митохондриальное поглощение и освобождение ионов Ca^{2+} в ответ на кальциевый сигнал представляет основной механизм регуляции производства АТФ для удовлетворения энергетических потребностей клетки, но также является и фактором риска при перегрузке кальцием, окислительном стрессе, инициации гибели клеток. Перегрузка митохондрий ионами Ca^{2+} в сочетании с окислительным стрессом приводит к открытию митохондриальных пор высокой проницаемости (Mitochondrial Permeability Transition Pore, МРTP) во внутренней митохондриальной мембране, способствуя процессу некроза и/или апоптоза кардиомиоцитов, что в результате приводит к сердечной недостаточности [5, с. 2743].



Флавоноиды, вторичные метаболиты высших растений, не синтезируемые в животных тканях, демонстрируют многочисленные благоприятные эффекты как в экспериментах *in vivo*, так и *in vitro*. Модельными и эпидемиологическими исследованиями было показано, что флавоноиды и их метаболиты обладают рядом важных фармакологических свойств, которые предотвращают развитие неврологических, сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний, диабета, токсических повреждений печени и ряда других [6, с. 671; 7, с. 35].

Широко исследуемыми и используемыми флавоноидами являются нарингенин и его гликозид нарингин (нарингин-7-О-неогесперидозид), основные биологически активные полифенолы цитрусовых, благоприятные эффекты которых считаются доказанными. Многочисленные исследования сообщают об антиоксидантных, противовоспалительных, противораковых, регуляторных свойствах этих фитопрепаратов, нарингин и нарингенин модулируют многочисленные сигнальные пути, подавляют синтез цитокинов и факторов роста, регулируют процессы апоптоза, пролиферации клеток, ангиогенеза [8, с. 3].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить роль митохондриальной дисфункции в развитии АКМ и выяснить возможность коррекции флавоноидом нарингином нарушений митохондрий кардиомиоцитов при алкогольной интоксикации крыс *in vivo* и нагрузке ионами кальция *in vitro*.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы: сахароза, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис-HCl), нарингин (4',5,7-тригидроксифлаванон-7-рамногликозид), этиленгликоль-бис(2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота (ЭГТА), аденозиндифосфат (ADP), сукцинат натрия гексагидрат, калия хлорид, кальция хлорид, аралдит-эпоксид (Araldite 506 ерохуресин), уранил ацетат, сафранин О, карбонилцианид-4-(трифторметокси) фенилгидразон (FCCP), динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (Merck/Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Германия), четырехокись осмия для электронной микроскопии (Carl Roth GmbH, Германия), калий фосфорнокислый однозамещенный, сульфат магния, метанол, этанол и ацетон высшей степени чистоты («Реахим», Россия).

Концентрация свободного кальция: чтобы определить эффекты ионов кальция на состояние митохондрий в присутствии ЭГТА, определяли концентрацию свободного Ca^{2+} для заданной общей концентрации внесенного $[Ca^{2+}]$ с использованием онлайн-калькулятора Ca-EGTA [10].

Алкогольная интоксикация крыс

Алкогольную интоксикацию аутбредных крыс-самцов линии Wistar разведения вивария Института физиологии НАН Беларуси (Минск) вызывали путем длительного (8 недель) введения этанола в дозе 4 г/кг массы в/ж (использовали 30%-ный раствор) на фоне кормления животных высокожировым рационом, содержание жирового компонента в котором составляло 32%. В опыте использованы животные со средней начальной массой 220–250 г. Каждая экспериментальная группа включала 8–10 животных.

Схема опыта:

- 1-я группа – контроль (высокожировой рацион);
- 2-я группа – алкогольная интоксикация + высокожировой рацион;
- 3-я группа – алкогольная интоксикация + высокожировой рацион + нарингин.

С первого дня эксперимента животным группы 3 на фоне алкогольной интоксикации и высокожирового рациона вводили нарингин в дозе 40,0 мг/кг массы животного. Нарингин растворяли в воде и вводили ежедневно, внутривенно посредством зонда с 9 до 10 часов утра. Контрольным животным вводили эквивалентное количество воды. Взвешивание крыс проводили еженедельно. По окончании эксперимента животных декапитировали. Кровь забирали для немедленного приготовления сыворотки. Сердце извлекали для выделения митохондриальной фракции. В сыворотке крови определяли активность маркерных ферментов – аланин- и аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, билирубина с помощью наборов Lachema (Чехия), содержание триглицеридов – с помощью наборов НПК «Анализ-Х» (Беларусь).

Выделение митохондрий сердца крысы

Митохондрии кардиомиоцитов выделяли методом дифференциального центрифугирования [11, с. 2]. Использовали среду выделения, содержащую сахарозу (0,25 моль/л), Трис-НСI (0,025 моль/л), ЭДТА (0,00005 моль/л) и 0,1% БСА, рН 7,4. Изолированное сердце быстро переносили в охлажденный 0,9%-ный раствор КСI (+4 °С) и тщательно отмывали от крови. Мышечную ткань взвешивали, измельчали ножницами на льду и гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора с тефлоновым пестиком в среде выделения при +4 °С. Ядерную фракцию удаляли центрифугированием при 650 g (10 мин., 4 °С) (центрифуга Hermle Z 32 НК, HERMLE Labortechnik GmbH, Германия). Митохондрии осаждали центрифугированием при 11 000 g (10 мин., +4 °С) и промывали в среде выделения.

Структура и функциональные параметры изолированных митохондрий сердца крысы. На митохондрии сердца крыс (5 мг/мл) воздействовали ионами Ca^{2+} (концентрация свободного Ca^{2+} = 550 мкмоль/л), флавоноидом нарингином (200 мкмоль/л) и ионами Ca^{2+} (550 мкмоль/л) + нарингин (200 мкмоль/л) в среде, содержащей сахарозу (0,25 моль/л), Трис-НСI (0,025 моль/л) и ЭДТА (0,00005 моль/л), рН 7,4, в течение 30 мин. (25 °С) *in vitro*. После воздействия ионов кальция и флавоноида суспензии митохондрий центрифугировали при 10 000 g, +4 °С, в течение 20 мин., фиксировали, как описано ранее, и анализировали, используя электронный микроскоп JEM-1011 (Japanese Electron Optics Laboratory Ltd., Япония) [12, с. 238]. Для оценки ультраструктурных изменений митохондрий использовали такие морфометрические параметры, как фактор элонгации и соотношение сторон.

Степень образования пор высокой проницаемости митохондрий (МРТР) определяли по изменению оптической плотности суспензии митохондрий при 540 нм и 30 °С в среде, содержащей КСI (0,12 моль/л), Трис-НСI (0,02 моль/л), KH_2PO_4 (0,002 моль/л) и ЭДТА (0,0005 или 0,00005 моль/л), рН 7,4, как описано нами ранее [13, с. 227]. Изолированные митохондрии сердца (0,5 мг белка/мл) вносили в среду, содержащую субстрат (5 ммоль/л сукцинат). Через 5 мин. инкубации вносили ионы Ca^{2+} или флавоноид нарингин и измеряли скорость (ΔD 540/мин) терминальной фазы



набухания. По окончании измерений в митохондрии вносили разобщитель FCCP (0,5 мкмоль/л) для контроля завершения процесса образования МРТР.

Мембранный потенциал митохондрий сердца определяли спектрофлуориметрически, используя положительно заряженный липофильный флуоресцентный зонд сафранин O (8 мкмоль/л) в среде, содержащей сахарозу (200 ммоль/л), Трис-НСI (10 ммоль/л), KH_2PO_4 (1 ммоль/л), MgSO_4 (5 ммоль/л), ЭГТА (0,00005 моль/л), субстрат сукцинат (5 ммоль/л), pH 7,4, 27 °С. Митохондрии сердца (0,3 мг белка/мл) помещали в среду, через 5 мин. вносили эффекторы (ионы кальция, флавоноиды) и регистрировали изменения мембранного потенциала как разницу интенсивности флуоресценции зонда сафранина O ($I_{\text{FCCP}} - I$) / мг белка, где I – интенсивность флуоресценции зонда в суспензии митохондрий, I_{FCCP} – интенсивность флуоресценции сафранина O после добавления FCCP (после полной деполяризации мембраны).

Скорость потребления кислорода изолированными митохондриями (0,5 мг белка/мл) в отсутствие и в присутствии ионов кальция и флавоноидов регистрировали полярографически, используя электрод Кларка (Hansatech Instruments Limited, Великобритания) при постоянном легком перемешивании в среде, содержащей KCl (0,125 моль/л), сахарозу (0,05 моль/л), Трис-НСI (0,01 моль/л), KH_2PO_4 (0,0025 моль/л), MgSO_4 (0,005 моль/л), pH 7,2, 25 °С.

Биохимические параметры сыворотки крыс

Статистика. Данные измерений, полученные в 5–7 повторениях, анализировали, используя статистический пакет Statistica 10.0, и представляли в виде медианы (Me) и межквартильного интервала [Q1; Q3]. Нормальность распределения оценивали по критерию Шапиро – Уилка. Достоверность различий между параметрами анализировали с помощью U-критерия Манна – Уитни и H-критерия Краскела – Уоллиса. Уровень значимости считался $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дисфункция митохондрий кардиомиоцитов при хронической алкогольной интоксикации крыс и протекторный эффект введения нарингина

В условиях выполненного эксперимента хроническая алкогольная интоксикация крыс на фоне жировой диеты приводила к росту массы тела животных и выраженному цитолизу клеток печени, что регистрировали по возрастанию активности индикаторных ферментов в сыворотке крови, АлТ, АсТ, щелочной фосфатазы, содержанию билирубина, что указано в табл. 1. Нарушение метаболизма липидов сопровождалось накоплением в сыворотке крови триглицеридов (табл. 1). Введение животным нарингина на фоне интоксикации в определенной степени уменьшало активности индикаторных ферментов цитолиза (но не щелочной фосфатазы), содержание билирубина и триглицеридов (табл. 1).

Средний вес животных в группе «алкогольная интоксикация» достоверно возрастает по отношению к группе «контроль» и уменьшается в результате введения нарингина. Масса сердца животных (по абсолютной величине, но не в % к массе животного) также уменьшается в группе «алкогольная интоксикация + нарингин» по отношению к группе «алкогольная интоксикация», что отражает благоприятный эффект введения флавоноида.

Таблица 1

Биохимические параметры сыворотки крови, масса животного и сердца крыс при хронической алкогольной интоксикации и введении нарингина

Table 1

Biochemical parameters of blood serum, animal weight and heart weight in rats during chronic alcoholic intoxication and administration of naringin

Параметр	Контроль	Алкогольная интоксикация	Алкогольная интоксикация + нарингин
Масса животного, г	284,0±10,5	332,5±11,5 ^a	304,5±9,5 ^a
Масса сердца, г	0,86±0,03	0,98±0,05 ^a	0,85±0,02 ^b
Масса сердца / масса животного, %	0,30±0,02	0,29±0,03	0,28±0,02
АлТ, Е/л	53,36±2,46	142,2±9,27 ^a	119,1±8,36 ^{a, b}
АсТ, Е/л	76,74±6,41	188,60±25,14 ^a	104,9±13,10 ^{a, b}
Щелочная фосфатаза, Е/л	183,5±11,65	367,6±34,01 ^a	327,0±36,12 ^a
Билирубин (связанный)	2,41±0,08	2,70±0,05 ^a	2,43±0,05 ^b
Триглицериды, сыворотка, ммоль/л	1,64±0,15	2,84±0,38 ^a	1,52±0,22 ^b

Примечания: ^a p<0,05 – достоверные изменения по сравнению с контролем; ^b p<0,05 – достоверные изменения по сравнению с группой «алкогольная интоксикация».

Хроническая алкоголизация животных существенно изменяла респираторную активность митохондрий сердца крыс, митохондриальный мембранный потенциал и чувствительность митохондрий сердца к кальций-зависимому процессу открытия МРТР. В табл. 2 указано, что скорость сукцинат-зависимого потребления кислорода митохондриями кардиомиоцитов (V₂, состояние 2) в группе «алкогольная интоксикация» возрастает более чем в 2 раза по отношению к этому параметру в группе «контроль» и существенно снижается в группе «алкогольная интоксикация + нарингин» при сравнении с этим параметром в группе «алкогольная интоксикация». Скорость АДФ-стимулированного митохондриального потребления кислорода (V₃) также значительно увеличилась в группе «алкогольная интоксикация», снижалась при введении нарингина на фоне интоксикации. Коэффициенты фосфорилирования АДФ/О и акцепторного контроля (V₃/V₂) достоверно уменьшались при длительном введении этанола. Введение нарингина при интоксикации крыс полностью восстанавливало скорость потребления кислорода и во многом нормализовало коэффициент фосфорилирования АДФ/О и коэффициент дыхательного контроля (V₃/V₂).

Результаты, представленные в табл. 2, демонстрируют, что интенсивность флуоресценции сафранина О возрастает в суспензии митохондрий крыс групп «алкогольная интоксикация» и «алкогольная интоксикация + нарингин», что может свидетельствовать о неспособности митохондрий сердца в данных группах животных накапливать сафранин О из-за повреждения мембран и диссипации мембранного потенциала в результате интоксикации этанолом.

Скорость Ca²⁺-индуцированного формирования МРТР в митохондриях сердца крыс, регистрируемое как изменение светорассеяния митохондриальной суспензии, при длительном введении этанола существенно возростала (в 3,7 раза по отношению к контрольной группе), что свидетельствует о значительном повышении



Таблица 2
Респираторная активность и мембранный потенциал митохондрий сердца при хронической алкогольной интоксикации крыс

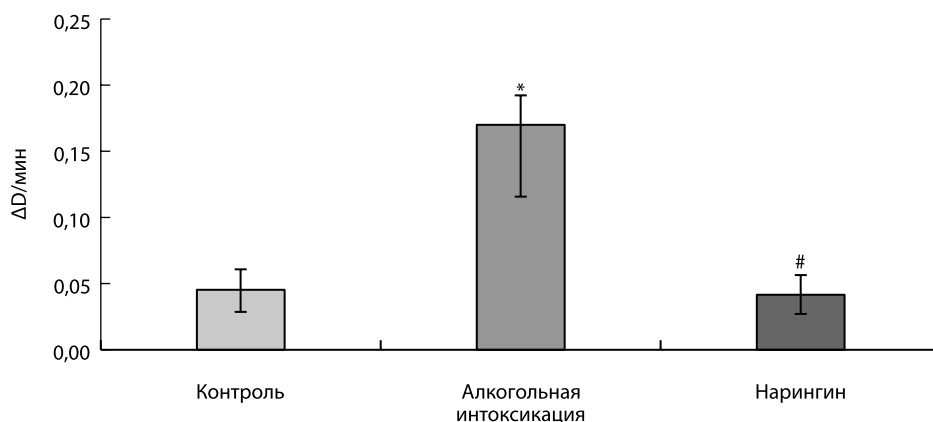
Table 2
Respiratory activity and membrane potential of heart mitochondria during chronic alcoholic intoxication in rats

	V2, нг атом О/ мин/мг белка	V3, нг атом О/ мин/мг белка	V3/V2	АДФ/О	(I _{фср} - I) / мг белка
Контроль	34,27 [16,46; 41,04]	67,16 [54,28; 74,36]	2,11 [1,80; 2,58]	1,05 [0,90; 1,42]	10,24 [6,89; 18,05]
Алкогольная интоксикация	75,48 [59,54; 107,56] ^a	101,88 [95,60; 124,96] ^a	1,86 [1,79; 1,98] ^a	0,76 [0,48; 1,33] ^a	12,91 [11,71; 13,19] ^a
Алкогольная интоксикация + нарингин	26,77 [19,78; 31,38] ^b	65,24 [38,48; 94,34] ^{a, b}	2,29 [1,93; 2,96] ^b	1,12 [1,01; 1,23] ^b	14,41 [12,24; 14,83] ^a

Примечания: ^a p<0,05 – достоверные изменения по сравнению с контролем; ^b p<0,05 – достоверные изменения по сравнению с группой «алкогольная интоксикация».

чувствительности митохондрий к воздействию ионов кальция в результате интоксикации, что показано на рисунке. Лечение нарингином существенно снижало скорость Ca²⁺-индуцированного набухания митохондрий сердца до контрольных значений.

Длительное введение нарингина на фоне алкоголизации восстанавливало этот измененный параметр, что характеризует устойчивость митохондрий к воздействию ионов кальция.



Скорость Ca²⁺-индуцированного формирования МРТП в митохондриях сердца крыс при алкогольной интоксикации

Примечания: * p<0,05 – достоверные изменения по сравнению с контролем; # p<0,05 – достоверные изменения по сравнению с группой «алкогольная интоксикация».

The rate of Ca²⁺-induced MPTP formation in rat heart mitochondria during alcoholic intoxication

Структурно-функциональные нарушения изолированных митохондрий кардиомиоцитов крыс ионами кальция и эффекты нарингина *in vitro*

Учитывая определяющую роль нарушений митохондриального и клеточного кальциевого гомеостаза в кардиомиоцитах, мы определили эффекты ионов кальция на структуру и свойства митохондрий сердца *in vitro*. В нашем эксперименте внесение ионов экзогенного кальция (550 мкмоль/л) в суспензию изолированных митохондрий сердца крыс индуцировало значительное возрастание гетерогенности митохондрий по размерам и электронной плотности за счет появления органелл большего размера с электронно-светлым матриксом, с увеличенными межкристиальными промежутками и нарушенной нативной структурой внутренней мембраны в результате Ca^{2+} -зависимого открытия митохондриальных пор высокой проницаемости и деполяризации мембраны (от 150 до 750 мкмоль/л Ca^{2+}), что указано в табл. 3. Ранее нами были определены эффекты ионов экзогенного кальция на ультраструктуру, респираторную активность, процесс формирования МРПТ изолированных митохондрий печени крыс [12, с. 247]. Флавоноид гликозид нарингин также изменял морфометрические параметры митохондрий сердца крыс, увеличивал среднюю площадь сечения (200 мкмоль/л), но предотвращал индуцированные ионами Ca^{2+} нарушения ультраструктуры и дозозависимо ингибировал респираторную активность митохондрий сердца крыс (10–75 мкмоль/л).

Как показано в табл. 4, ионы кальция в невысоких концентрациях (15–250 нмоль/л) дозозависимо ингибировали стимулируемую субстратом скорость потребления кислорода V2 и АДФ-зависимую скорость потребления кислорода V3 без существенного изменения коэффициентов дыхательного контроля и фосфорилирования изолированных митохондрий сердца крыс.

Флавоноид нарингин также дозозависимо (10–75 мкмоль/л) ингибировал респираторную активность митохондрий сердца крыс, уменьшая коэффициент дыхательного контроля без изменения коэффициента фосфорилирования, стимулировал набухание митохондрий и потерю мембранного потенциала (25–75 мкмоль/л) в отсутствие Ca^{2+} , но ингибировал стимулированное ионами Ca^{2+} открытие митохондриальных пор высокой проницаемости (75 мкмоль/л) (данные не представлены).

Таблица 3
Ультраструктура митохондрий сердца крыс в присутствии ионов Ca^{2+} и нарингина

Table 3
Ultrastructure of rat heart mitochondria in the presence of calcium and naringin

Параметры	Контроль	550 мкмоль/л Ca^{2+} свободный	550 мкмоль/л Ca^{2+} свободный + нарингин 200 мкмоль/л
Средняя площадь сечения одной Мх, мкм ²	0,62 [0,40; 0,89]	0,74 [0,44; 1,26]*	0,62 [0,39; 0,87] [#]
Средний периметр одной Мх, мкм	3,21 [2,55; 3,90]	3,60 [2,78; 4,68]*	3,21 [2,56; 3,88]*, [#]
Фактор элонгации	1,48 [1,34; 1,61]	1,55 [1,41; 1,73]*	1,56 [1,45; 1,74]*, [#]
Средний диаметр одной Мх, мкм	1,01 [0,79; 1,22]	1,14 [0,85; 1,49]*	1,01 [0,79; 1,25] [#]
Сферичность	0,46 [0,38; 0,55]	0,41 [0,34; 0,50]*	0,42 [0,34; 0,49]*

Примечания: * достоверность различий при сравнении с контролем ($p < 0,05$); [#] достоверность различий при сравнении с группой (550 мкмоль/л Ca^{2+} свободный) ($p < 0,05$).



Таблица 4
Параметры потребления кислорода изолированными митохондриями сердца крыс, эффект ионов кальция

Table 4
Parameters of oxygen consumption by isolated rat heart mitochondria, the effect of calcium ions

	V2, нг атом О/ мин/мг	V3, нг атом О/ мин/мг	V3/V4	АДФ/О
Контроль	35,68 [34,00; 48,00]	55,90 [58; 98]	3,63 [2,13; 3,91]	1,75 [1,22; 2,38]
Ионы кальция, 250 нмоль/л	13,80 [12,00; 16,00] ^a	26,54 [28,00; 50,00] ^a	2,82 [1,89; 4,00] ^a	1,53 [0,98; 1,61]

Примечание: ^a p<0,05 – достоверные изменения по сравнению с контролем.

По сравнению с митохондриями печени чувствительность митохондрий сердца крыс к действию ионов Ca²⁺ оказалась значительно ниже в случае открытия митохондриальных пор высокой проницаемости и значительно выше в случае ингибирования респираторной активности.

Известно, что митохондриальная дисфункция и избыточная генерация активных форм кислорода вовлечены в патогенез АКМ, молекулярные механизмы и мишени, ответственные за дисфункцию миокарда при АКМ, изучены недостаточно [14, с. 1]. Данные о митохондриальных процессах в кардиомиоцитах при алкогольной кардиопатологии противоречивы. Так, при 3-месячной алкогольной интоксикации крыс не наблюдали существенных изменений скорости потребления кислорода митохондриями или активности комплексов ОXPHOS I-V, несмотря на уменьшение содержания комплекса V и подавление экспрессии гена Atp6v1e2 при алкоголизации. Митохондрии алкоголизованных крыс были более чувствительны к Ca²⁺-индуцированному открытию МРТР, что связано, как предполагают, с увеличением уровня экспрессии адениннуклеотидтранслоказы 1/2 и потенциал-зависимого анионного канала [14, с. 1].

В соответствии с нашими наблюдениями, ранее также было показано уменьшение митохондриального мембранного потенциала при алкоголизации, ингибирование ряда ферментных систем цикла Кребса, нарушение сопряжения окислительного фосфорилирования [4, с. 3]. В то же время нарушения респираторной активности митохондрий сердца при алкогольной интоксикации крыс (или экспонировании кардиомиоцитов этанолом) зависят как от длительности интоксикации, так и от дозы алкоголя [4, с. 7]. Ранее в модели острого инфаркта миокарда у крыс показано, что нарингенин, агликон нарингина, уменьшал повреждения сердца, вызванные ишемией/реперфузией, благодаря деполяризации митохондриальной мембраны и уменьшению накопления Ca²⁺ в митохондриальном матриксе. При этом предполагают прямое взаимодействие флавоноида с калиевыми ВК-каналами высокой проводимости [15, с. 1634].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует полагать, что нарушения респираторной активности, диссипация митохондриального мембранного потенциала при длительном употреблении алкоголя могут явиться причиной нарушения энергетики сердечной мышцы и сократительной

функции сердца, что вносит вклад в развитие и прогрессирование алкогольной кардиомиопатии. Определенную роль в развитии алкогольной кардиомиопатии может играть нарушение кальциевого гомеостаза в кардиомиоцитах, повышенная чувствительность митохондрий кардиомиоцитов к кальций-индуцируемому формированию митохондриальных пор высокой проницаемости. Длительное введение флавоноида нарингина частично препятствовало развитию токсического эффекта этанола у крыс (что регистрировали по уровню маркеров интоксикации в сыворотке крови), предотвращало функциональные нарушения митохондрий кардиомиоцитов при интоксикации *in vivo*. Одновременно нарингин предотвращал повреждение митохондрий кардиомиоцитов при избыточном воздействии ионов кальция на митохондрии сердца крыс *in vitro*. Благоприятные эффекты нарингина могут быть связаны с его антиоксидантным, противовоспалительным эффектом, прямым взаимодействием с мембраной и комплексами электрон-транспортной цепи митохондрий кардиомиоцитов.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Folmes C.D.L., Dzeja P.P., Nelson T.J. et al. Mitochondria in control of cell fate. *Circulation Research*. 2012;110(4):526–529. DOI: 10.1161/RES.0b013e31824ae5c1.
2. Garbincius J.F., Elrod J.W. Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease. *Physiological Reviews*. 2021;102(2):893–992. DOI: 10.1152/physrev.00041.2020.
3. Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;78:100–106. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.09.023
4. Steiner J.L., Lang C.H. Etiology of alcoholic cardiomyopathy: Mitochondria, oxidative stress and apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;89:125–135. DOI: 10.1016/j.jbiocel.2017.06.009.
5. Bernardi P. Mechanisms for Ca²⁺-dependent permeability transition in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020;117(6):2743–2744. DOI: 10.1073/pnas.1921035117.
6. Ilyich T.V., Veiko A.G., Lapshina E.A. et al. Quercetin and Its Complex with Cyclodextrin against Oxidative Damage of Mitochondria and Erythrocytes: Experimental Results *in vitro* and Quantum-Chemical Calculations. *Biophysical*. 2018;63(4):690–720. DOI: 10.1134/S0006302918040075. (In Russian)
7. Kostyuk V.A. Plant polyphenolic compounds as components of functional nutrition. *Proceedings of BSU*. 2016;11(1):32–41. (In Russian)
8. Stabrauskiene J., Kopustinskiene D.M., Lazauskas R. et al. Naringin and Naringenin: Their Mechanisms of Action and the Potential Anticancer Activities. *Biomedicines*. 2022;10(7):1686. DOI: 10.3390/biomedicines10071686.
9. Stickel F., Datz C., Hampe J. et al. Pathophysiology and management of alcoholic liver disease: Update 2016. *Gut Liver*. 2017;11(2):173–188. DOI: 10.5009/gnl16477.
10. EGTA. Available at: https://pcwww.liv.ac.uk/~petesmif/petesmif/software/_webware06/EGTA/EGTA.htm. (accessed 20 May 2023).
11. Gostimskaya I., Galkin A. Preparation of highly coupled rat heart mitochondria. *J. Vis. Exp*. 2010;(23):2202. DOI: 10.3791/2202.
12. Zavodnik I.B., Kovalenia T.A., Veiko A.G. et al. Structural and functional changes in rat liver mitochondria under calcium ion loading in the absence and presence of flavonoids. *Biomed. Khim*. 2022;68(4):237–249. DOI: 10.18097/PBMC20226804237.
13. Golovach N.G., Cheshchevik V.T., Lapshina E.A. et al. Calcium-induced mitochondrial permeability transitions: parameters of Ca²⁺ ion interactions with mitochondria and effects of oxidative agents. *J. Membr. Biol*. 2017;250(2):225–236. DOI: 10.1007/s00232-017-9953-2.
14. Emelyanova L., Holmuhamedov E., Ryan S. et al. Increased susceptibility of mitochondria to permeability transition pore opening in alcoholic cardiomyopathy. *Circulation Research*. 2017;121:A123. DOI: 10.1161/res.121.suppl_1.123.
15. Testai L., Martelli A., Marino A. et al. The activation of mitochondrial BK potassium channels contributes to the protective effects of naringenin against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biochem. Pharm*. 2013;85(11):1634–1643. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.03.018.



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.4.013>
УДК 615.91/212.7:613.83+616.89-008.1



Вергун О.М.¹✉, Шмигельский А.А.², Григорьев И.М.²

¹ Государственный комитет судебных экспертиз Республики Беларусь,
Минск, Беларусь

² Городская клиническая больница скорой медицинской помощи, Минск, Беларусь

Отравления синтетическими каннабиноидами: статистика, технология идентификации

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Вергун О.М., Шмигельский А.А.; сбор материала – Григорьев И.М., Шмигельский А.А.; обработка данных, анализ и интерпретация результатов, написание текста – Вергун О.М., Шмигельский А.А.; редактирование – Григорьев И.М.

Подана: 04.04.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: vom_v@tut.by

Резюме

Введение. Потребление новых синтетических наркотических веществ является одной из серьезных медико-социальных проблем в мире: с каждым годом возрастает количество отравлений и смертельных случаев от отравлений синтетическими каннабиноидами. С увеличением потребления синтетических наркотических веществ все чаще стали появляться публикации об их негативном действии на организм человека. Идентификация их затруднена из-за нестабильности химической структуры веществ, их метаболитов, а также из-за крайне малых концентраций синтетических наркотиков в биологических жидкостях организма, вызывающих массивный фармакологический эффект. Этими же факторами объясняется, почему юридическое регулирование и решение медицинских проблем по-прежнему представляют серьезную проблему.

Цель. Проанализировать республиканские данные об отмеченных в последние годы острых отравлениях синтетическими наркотическими веществами (в том числе со смертельным исходом) и представить технологию идентификации синтетических каннабиноидов в биологическом материале.

Материалы и методы. Газовый хроматограф «Agilent Technologies» 7890В, колонка капиллярная HP-5MS UI, детектор – MSD 5977В, масс-селективный, тип «квадруполь», интервал сканируемых масс 45–550. Материалом явились реальные пробы мочи – биопробы лиц, у которых установлено содержание синтетических каннабиноидов.

Результаты. Количество отравлений синтетическими наркотическими средствами (в том числе и синтетическими каннабиноидами) в Республике Беларусь варьирует от года к году, но постепенно возрастает. Согласно республиканским данным, в 2013 г. отравления синтетическими наркотическими и психотропными веществами составляли 7,8% от общего количества отравлений наркотическими средствами, затем в связи с доступностью и популярностью синтетических наркотиков в 2014 г. в Республике Беларусь, как и во всех странах мира, наблюдался резкий подъем – до 37,4% от общего количества отравлений наркотическими веществами: ныне он достигает 80%. Тактика лечения при острых отравлениях синтетическими наркотиками

не отличается от таковой при острых интоксикациях: специфического антидота пока не найдено. Установление факта употребления наркотических средств, содержащих синтетические каннабиноиды, является достаточно важным на современном этапе развития лабораторной службы, поскольку их невозможно обнаружить с помощью методов скрининга на наличие Δ^9 -ТНС в биологических жидкостях. Стандартными иммунохроматографическими методами синтетические каннабиноиды не определяются. Состояние интоксикации способны вызывать сверхмалые дозы вещества, следовательно, чувствительность аналитического оборудования должна быть весьма высокой. Для их выявления необходимы газохроматографические методы с масс-спектрометрическим детектированием, ориентированные на идентификацию как нативных, синтетических каннабиноидов, так и продуктов их быстрого метаболизма в организме человека.

Заключение. Синтетические каннабиноиды были причислены к группе легких наркотиков и запрещены во многих странах мира. Для того чтобы обойти закон, производители этих психоактивных веществ регулярно меняют формулу выпускаемых ими наркотиков. Каннабиноиды оказывают губительное действие на все органы и системы в теле человека, поэтому с каждым годом число людей, потерявших здоровье или жизнь от этих наркотиков, стремительно растет. Значительный сдвиг в выявлении и определении химического состава курительных смесей связан с разработкой совместного применения технологии газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС).

Ключевые слова: отравления синтетическими наркотическими средствами, статистика и диагностика отравлений, методы лечения и идентификации, целевые химико-токсикологические исследования

Olga M. Viarhun¹✉, Andrei A. Shmihelski², Igor M. Grigorev²

¹ State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus

² City Clinical Hospital of Emergency Medical Care, Minsk, Belarus

Poisoning with Synthetic Cannabinoids: Statistics, Identification Technology

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: research concept and design – Olga M. Viarhun, Andrei A. Shmihelski; collection of material – Igor M. Grigorev, Andrei A. Shmihelski; statistical processing of data, analysis and interpretation of results, writing the text – Olga M. Viarhun, Andrei A. Shmihelski; editing – Igor M. Grigorev.

Submitted: 04.04.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: vom_v@tut.by

Abstract

Introduction. The consumption of new synthetic drugs is one of the serious medical and social problems in the world, in connection with this, the number of poisonings and deaths from poisoning with synthetic cannabinoids is increasing. With the increase



in the consumption of synthetic narcotic substances, publications about the negative effects of synthetic cannabinoids on the human body are increasingly appearing. Their identification is difficult due to the instability of the chemical structure of substances, their metabolites and extremely low concentrations of synthetic drugs in body fluids, causing a massive pharmacological effect. These same factors explain why the legal regulation and solution of medical problems still pose a serious problem.

Purpose. To analyze republican data on acute poisonings with synthetic narcotic substances (including fatal ones) in recent years and present a technology for identifying synthetic cannabinoids in biological material.

Materials and methods. Gas chromatograph "Agilent Technologies" 7890B, capillary column HP-5MS UI, Detection conditions: detector – MSD 5977B, mass selective, "quadrupole" type, scanned mass interval 45–550, The search for substances was carried out by retention indices in the NIST14 library databases. L, MPW2011.L, software systems "AIP SIN Identifier" version 6.9.1.0. And the Material was real urine samples – bioassays of persons who have been found to contain synthetic cannabinoids.

Results. Synthetic cannabinoids are rapidly and widely distributed among new types of surfactants. Their pharmacochemical features are high sympathomimetic activity and the ability to cause hallucinations, which are superior in severity to those of natural cannabinoids. The narcogenic potential of cannabinoids exceeds that of natural cannabinoids, as evidenced by the rapid, almost lightning-fast development of an addiction syndrome, a pronounced attraction to PAS, more often of a generalized nature, the prevalence of a permanent form of use, the severity of the medical and social consequences of use – a rapidly growing social maladjustment of patients, as well as manifestations organic damage to the CNS. Synthetic cannabinoids can cause numerous disorders in the human body, the most frequent and severe of which are overdoses and the development of psychotic conditions. Difficulties in identifying the composition of synthetic cannabinoids arise from the lack of samples for comparison, the constantly changing composition of the compounds in response to the introduction of prohibitive measures on their circulation, and the widespread use by the manufacturer of natural origin such as tocopherol (vitamin E), eugenol or fatty acids. It is assumed that smoking mixtures can contain up to 15 different components of plant origin, combinations of which give a wide range of effects. Understanding the clinical pharmacology of the compounds that make up this group of surfactants is key to assessing the toxicity and effect produced by these substances.

Conclusion. After a detailed study of the effects of synthetic cannabinomimetics on the body, they were classified as soft drugs and banned in many countries around the world. In order to circumvent the law, the manufacturers of these psychoactive substances regularly change the formula of the drugs they produce. Cannabinoids have a detrimental effect on all organs and systems in the human body, so every year the number of people who have lost their health or life from these drugs is growing rapidly. A significant shift in the identification and determination of the chemical composition of smoking mixtures is associated with the development of a joint application of gas chromatography methods with mass selective detection (GC-MS).

Keywords: poisoning with synthetic drugs, statistics and diagnosis of poisoning, methods of treatment and identification, chemical-toxicological identification

■ ВВЕДЕНИЕ

Вещества, содержащие синтетические каннабиноиды (СК), впервые появились на нелегальном рынке в 2004 г. Синтетические каннабиноиды добавлялись к растительному материалу, например, к измельченным или нарезанным на полоски листьям, путем пропитки или распыления раствора одного или нескольких синтетических каннабиноидов в органическом растворителе, который затем испарялся. В некоторых случаях использовались вещества в твердом виде (кристаллический порошок), что приводило к неоднородному распределению активного соединения в растительном материале.

Синтетические каннабиноиды (синтетические каннабимиметики) – группа веществ различной химической структуры, проявляющих способность воздействовать на каннабиноидные рецепторы – CB₁ и CB₂. Изначально эта группа веществ синтезировалась для лечения пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, ожирением, шизофренией, мигренью, судорожными приступами, рвотой, болевым синдромом разного происхождения и др. К примеру, синтетический каннабимиметик JWH-018 был синтезирован в США в 1995 г. химиком John W. Huffman (откуда и пошло название JWH) с целью возможного использования в медицине. С увеличением потребления синтетических наркотических веществ не в медицинских целях чаще стали появляться публикации о негативном действии синтетических каннабиноидов на организм человека. Идентификация их затруднена из-за нестабильности химической структуры веществ, их метаболитов, а также из-за крайне малых концентраций синтетических наркотиков в биологических жидкостях организма, вызывающих массивный фармакологический эффект.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проанализировать республиканские данные об отмеченных в последние годы острых отравлениях синтетическими наркотическими веществами (в том числе со смертельным исходом) и представить технологию идентификации синтетических каннабиноидов в биологическом материале.

■ СИНТЕТИЧЕСКИЕ НАРКОТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА. СТАТИСТИКА ОТРАВЛЕНИЙ

По данным таможенных служб, большая часть наркотических препаратов на современном черном рынке (около 60% от всего их количества) представлена именно синтетическими веществами, которые чаще всего используются в виде курительных смесей. Курительные синтетические смеси изготавливают методом распыления наркотического вещества на простую засушенную траву, каждый представитель этой группы в среднем задерживается на рынке до 24 месяцев и затем сменяется новыми производными.

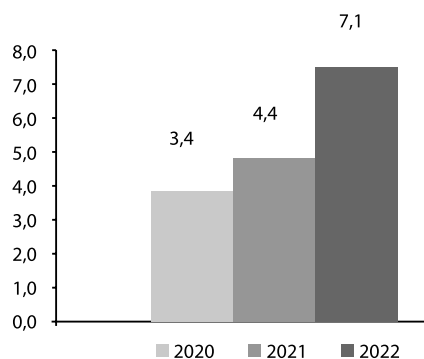
С 2008 г. было выпущено более 160 новых видов синтетических каннабиноидов, которые продавались через интернет и в специализированных магазинах под различными торговыми наименованиями, такими как «спайс силвер», «спайс голд», «спайс даймонд». Из-за большой скорости синтеза новых веществ каждый год происходит обновление списка запрещенных препаратов [5, 6].



Количество отравлений синтетическими наркотическими средствами в Республике Беларусь, в том числе и синтетическими каннабиоидами, варьирует от года к году, но постепенно возрастает (рис. 1).

По республиканским данным, в 2013 г. отравления синтетическими наркотическими и психотропными веществами составили 7,8% от общего количества отравлений наркотиками. В последующие годы в связи с доступностью и популярностью

Количество зарегистрированных отравлений (%) синтетическими каннабиоидами от общего количества отравлений наркотическими средствами в 2020–2022 гг.



Количество зарегистрированных отравлений (%) психостимулирующими средствами (АМФ, МДМА, альфа-РVP и др.) от общего количества отравлений наркотическими средствами в 2020–2022 гг.

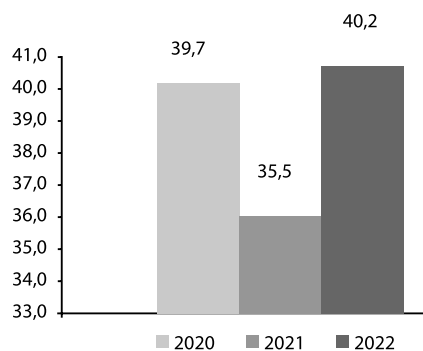


Рис. 1. Количество отравлений синтетическими наркотическими средствами (%) от общего количества отравлений наркотическими веществами за 2020–2022 гг.

Fig. 1. Number of poisonings with synthetic drugs (%) of the total number of drug poisonings for 2020–2022

Отравления с летальным исходом (%) по Республике Беларусь за 2020–2022 гг.

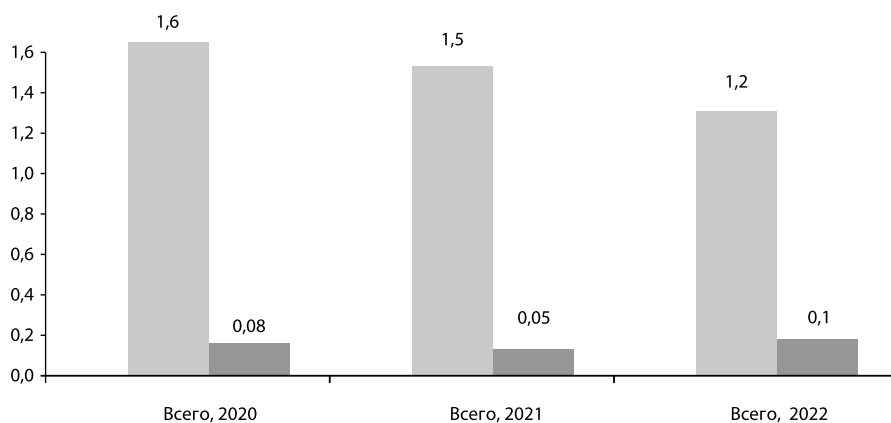


Рис. 2. Смертность от отравлений синтетическими каннабиоидами (%) от общего количества отравлений наркотическими веществами за 2020–2022 гг.

Fig. 2. Mortality from synthetic cannabinoid poisoning (%) of the total number of drug poisoning in 2020–2022

синтетических наркотиков в Республике Беларусь, как и во всех странах мира, наблюдался резкий подъем до 37,4% от общего количества отравлений наркотическими средствами, ныне он достигает 80%. Это объясняется тем, что производство таких наркотических веществ экономически выгодно, по сравнению с веществами растительного происхождения, можно легко изменить структуру и состав химического вещества и самое главное: крайне малые концентрации наркотика (измеряемые в нг/мл) приводят к сильнейшему фармакологическому эффекту.

Поскольку производители синтетических наркотиков несут ответственности за концентрации и дозы производимых веществ, у наркопотребителей возникают не только передозировки этими средствами, но и смертельные случаи (рис. 2), которые составили всего в 2020 г. 0,08%, в 2021 г. – 0,05% и в 2022 г. – 0,1% от общего количества смертельных случаев отравления наркотическими и психотропными веществами.

■ КЛИНИЧЕСКАЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОТРАВЛЕНИЙ

Синтетическими каннабиноидами (СК) (1.2.ПК Республиканского перечня) называют вещества, структурные особенности которых позволяют связывать их с известными каннабиноидными рецепторами – CB1 и CB2, которые располагаются главным образом в головном и спинном мозге и отвечают за характерное физиологическое и, особенно, психотропное действие синтетических веществ, сходное с действием дельта-9-тетрагидроканнабинола (Δ^9 -THC) – алкалоида каннабиса, при применении которого возникает приятное расслабление, подъем настроения, смешливость, легкое головокружение.

Потребители характеризуют свое состояние как полное спокойствие и умиротворение. При передозировке усиливается общая заторможенность, нарушается сознание, развивается сосудистая и дыхательная недостаточность. Типичная клиническая картина: тошнота, рвота, судорожные подергивания, переходящие в судороги; высокое давление, учащенное сердцебиение, гиперемия – сменяется бледностью, появляется головокружение, может развиваться нарколепсия с усилением сердечно-сосудистой и дыхательной недостаточности; увеличивается риск развития коматозного состояния.

Для острой интоксикации СК характерны нарушения речи и двигательной сферы, соматовегетативные расстройства в виде покраснения склер, мидриаза, тахикардии и повышения артериального давления, головокружения, диспноэ. Длительность интоксикации в среднем составляет около 2 часов. Внимание привлекается с трудом, речь невнятная. Смерть чаще всего развивается при аспирации рвотных масс. Возможен и неблагоприятный вариант проявлений интоксикации, который связан с развитием психотического расстройства. Психотические состояния при употреблении синтетических каннабиноидов, как правило, переносят 60–70% пациентов. Психозы протекают по типу онейроидного помрачения сознания (одним из признаков онейроида является дезориентация в личности галлюцинируемого, изменение субъекта восприятия, трансформация личности) с кататоническими расстройствами в виде ступора. В большинстве случаев амнезии по выходу из интоксикации не возникает. Длительность психоза различна: от 4 часов до 5–7 суток. Выход из психоза, как правило, литический, через длительный глубокий сон.



Формирование синдрома зависимости от синтетических каннабиноидов соответствует общим закономерностям формирования наркоманий и токсикоманий. Интоксикация от потребления синтетических каннабиноидов является прерогативой лиц молодого возраста. Потребители пробуют курительные смеси как травяное безопасное и полезное успокоительное средство, как правило, по совету знакомых. При этом физическая зависимость формируется в гораздо более короткие сроки по сравнению с зависимостью от природных каннабиноидов, что является свидетельством высокой наркогенности синтетических каннабиноидов. Психическая зависимость от синтетических каннабиноидов может сформироваться довольно быстро – уже после нескольких, даже единичных проб. Этап эпизодического употребления в среднем продолжается от 1 до 6 месяцев. Толерантность к синтетическим каннабиоидам установить трудно, условно можно говорить о росте толерантности при учащении курения.

Проявления синдрома отмены СК значительно тяжелее, чем в случае употребления природных каннабиноидов (Δ^9 -ТНС). Развитие абстинентного синдрома постепенное, через 2–3 сут. появляется тошнота, рвота, возникают приступы потоотделения, эпизодически учащается сердцебиение, повышается артериальное давление, появляются боли в суставах. Однако пациентами наиболее тяжело переносятся психопатологические нарушения: непреодолимое влечение к употреблению, резко сниженное настроение, внезапно накатывающие чувство страха, паника и суицидальные мысли. У многих потребителей становятся грубо выраженными поведенческие расстройства с нарастанием замкнутости, негативизма к терапии, персоналу и ближайшему окружению. Длительность абстинентного синдрома приблизительно составляет 7–9 сут.

Благодаря своевременной и квалифицированной помощи смертность при передозировках СК не высока, но, возможно, из-за трудностей в идентификации, отсутствия стандартных образцов в лабораторной практике количество выявленных и зарегистрированных отравлений может быть занижено.

Лечение пациентов с острой интоксикацией происходит в соответствии с алгоритмом терапии острых состояний в токсикологической практике – обеспечение адекватности дыхания и кровообращения, восстановление жизненно важных функций организма. Лечение преимущественно симптоматическое. Специфического антидота не существует. Результат лечения, как правило, быстрый (в течение 2–3 часов) и благоприятный. Минимальное время наблюдения – 8 ч. от момента употребления наркотика, то есть время возможного развития судорожного синдрома. Назначаются антипсихотики бутирофенонового ряда, антипсихотики, β -адреноблокаторы. Осуществляется сердечный мониторинг. В терапии абстинентного синдрома используются транквилизаторы бензодиазепинового ряда, снотворные средства. Учитывая поведенческие расстройства при употреблении СК, использование антипсихотиков, нормотимиков, седативных препаратов оправдано. При болевых нарушениях в структуре абстинентного синдрома использование антагонистов-агонистов опиатных рецепторов (трамадол) не рекомендовано. Предпочтение следует отдавать анальгетикам ненаркотического действия.

Терапия синдрома зависимости проводится с учетом особенностей клинической картины, поведенческих расстройств, выраженности последствий хронической

интоксикации. У пациентов с синдромом употребления синтетических каннабиноидов преобладают нарушения сердечно-сосудистой системы и органическое поражение головного мозга. Необходимо сочетание психотерапевтического и медикаментозного лечения.

Установление факта употребления наркотических средств, содержащих синтетические каннабиноиды, является достаточно важным на современном этапе развития лабораторной службы, поскольку его невозможно обнаружить с помощью методов скрининга на наличие Δ^9 -ТНС. Стандартными иммунохроматографическими методами наркотические вещества (каннабиноиды) не определяются. Состояние интоксикации способны вызывать сверхмалые дозы вещества; следовательно, чувствительность аналитического оборудования должна быть высокой. Для их выявления необходимы газохроматографические с масс-спектрометрическим детектированием технологии, ориентированные на идентификацию как нативных СК, так и продуктов их быстрого метаболизма в организме человека.

Пробоподготовка для анализа синтетических каннабиноидов, как правило, включает три основные стадии: гидролиз, экстракцию (жидко-жидкостную или твердофазную) и дериватизацию (преобразование веществ в летучие соединения). Анализ данных литературы показывает [1–4], что общая процедура пробоподготовки является важным этапом при идентификации синтетических наркотиков, поэтому и при подозрении на интоксикацию, отравление или смерть от употребления необходимо проводить целевое исследование с дополнительными мерами, предотвращающими потерю веществ при подготовке проб из биологических образцов.

Для выделения кислотных и нейтральных веществ (наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ, в том числе каннабиноидов и синтетических каннабиноидов) из жидких биологических образцов пользуются жидко-жидкостной экстракцией после щелочного гидролиза, для подтверждения правильности выполнения пробоподготовки используется внутренний стандарт (например 50 мкг/см³ раствор напроксена), для создания щелочной среды вводится раствор гидроксида натрия 300 г/дм³. Гидролиз проводится щадяще: в герметично закрытом сосуде при нагревании в течение 20 минут при 60 °С. После охлаждения до комнатной температуры необходимо довести рН раствора до значения 2–3 по универсальной индикаторной бумаге при помощи концентрированного раствора хлороводородной кислоты. Полученный раствор центрифугируют 10–15 минут при 3000–6000 об/мин на центрифуге типа ОС-6МЦ. Отбирают всю надосадочную жидкость. Надосадочную жидкость экстрагируют 4,0 см³ смеси *n*-гексан-этилацетат (3:1) в течение 5 минут. Смесь центрифугируют при 3000–4000 об/мин в течение 5–10 минут, верхний органический слой переносят в емкость для дериватизации и выпаривают в токе теплого воздуха до удаления растворителей, избегая перегрева. Сухой остаток дериватизируют различными реагентами (йодметаном либо *N*-метил-*N*-(трет-бутилдиметилсиллил)-трифторацетамидом (MTBSTFA)). Полученный сухой остаток после дериватизации реконструируют этилацетатом или хлороформом, тщательно перемешивают, переносят во вставку емкостью 200 мкл, закрывают крышкой (обкапывают колпачком) с септой – исследуют методом газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.



■ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Газовый хроматограф «Agilent Technologies» 7890В, колонка капиллярная HP-5MS UI, 30 м × 0,25 мм, ΔF=0,25 мкм. Условия хроматографирования: термостат колонки 90 °С, 1,3 мин., 11 град/мин, 315 °С, 8,3 мин.; газ-носитель – гелий, 1,5 мл/мин; инжектор – Splitless, 280 °С. Условия детектирования: детектор – MSD 5977В, масс-селективный, тип «квадруполь», интервал сканируемых масс 45–550, температуры детектора: MS Source – 230 °С, MS Quad – 150 °С, Gain – 1 °С. Поиск веществ проводили по индексам удерживания по базам данных библиотек NIST14.L, MPW2011.L, системы ПО «АИП-СИН Идентификатор» версии 6.9.1.0. Индексы удерживания рассчитывались автоматически в программе AMDIS Chromatogram по тестовой смеси алканов C7-C40, проанализированной предварительно. Материалом явились реальные пробы мочи – биопробы лиц, у которых установлено содержание синтетических каннабиноидов.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтетические каннабиноиды являются быстро и широко распространяющимися среди новых видов ПАВ. Их фармакохимические особенности заключаются в высокой симпатомиметической активности и способности вызывать галлюцинации, превосходящие по выраженности таковые у природных каннабиноидов. Наркогенный потенциал каннабиноидов превышает таковой у природных каннабиноидов, о чем свидетельствуют быстрое, практически молниеносное возникновение синдрома зависимости, выраженное влечение к ПАВ, чаще генерализованного характера, преобладание постоянной формы употребления, выраженность медико-социальных последствий употребления – стремительно нарастающая социальная дезадаптация пациентов, а также проявления органического поражения ЦНС. Синтетические каннабиноиды способны вызывать в организме человека многочисленные нарушения, наиболее частыми и тяжелыми из которых являются передозировки и развитие психотических состояний.

Трудности идентификации состава синтетических каннабиноидов возникают из-за дефицита образцов для сравнения, постоянно меняющегося состава соединений в ответ на введение запретительных мер их оборота, широкого использования производителем таких веществ, как токоферол (витамин E), эвгенол или жирные кислоты. Предполагается, что курительные смеси могут содержать до 15 различных компонентов растительного происхождения, комбинации которых дают широкий спектр оказываемых эффектов. Понимание клинической фармакологии соединений, входящих в состав данной группы ПАВ, является ключевым для оценки токсичности и эффекта, производимого данными веществами.

После детального изучения действия синтетических каннабиомиметиков на организм они были причислены к группе легких наркотиков и запрещены во многих странах мира. Для того чтобы обойти закон, производители этих психоактивных веществ регулярно меняют формулу выпускаемых ими наркотиков. Каннабиноиды оказывают губительное действие на все органы и системы в теле человека, поэтому с каждым годом число людей, потерявших здоровье или жизнь от этих наркотиков, возрастает. Значительный сдвиг в выявлении и определении химического состава курительных смесей связан с разработкой совместного применения методов газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС).

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Eremin S., Izotov B., Veselovskaya N. *Analysis of drugs*. M., Thought. 1993. 268 p. (in Russian)
2. Kataev S., Smirnova I., Zalesova V., Kurdina L. Chemical-toxicological analysis of cannabinoids in urine by chromato-mass spectrometry. *Zh.SME*. 2000;1:27–32. (in Russian)
3. Krylova E., Tyurin I., Smirnov A. Analysis of δ 9-tetrahydrocannabinolic acid in urine by gas chromatography. *Narcology*. 2006;6:32–41.
4. Clark E.G.C. *Analysis of Drugs and Poisons*. London, Pharmaceutical Pres, 2004, vol. 1.2. (in Russian)
5. *Recommended Methods for the testing Cannabis UN, N-J, Devision of Narcotic Drugs*. Wiена. 1987.
6. *Decree of the Ministry of Health of the Republic of Belarus No. 19 dated February 11, 2015 "On the establishment of the Republican list of narcotic drugs, psychotropic substances and their precursors subject to state control in the Republic of Belarus"*.
7. Sofronov G., Golovko A., Barinov V. Synthetic cannabinoids. State of the problem. *Narcology*. 2012;10:97–106. (in Russian)



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.4.014>



Yser H.T.

University of Basrah, Basrah, Iraq

The Effect of Cigarette Smoking on Blood Parameters and Serum Minerals on Smoker's Women in Basrah (Iraq)

Conflict of interest: nothing to declare.

The article is published in the author's edition.

Submitted: 10.07.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: medicalresearch77@yahoo.com

Abstract

Introduction. Cigarette smoking is a common cause of health problems. To date, the adherence to smoking in women, as well as the specific effects of smoking on the morphological composition of the blood and the content of certain minerals in it, depending on the age of smokers, remain insufficiently studied.

Purpose. To compare the effect of cigarette smoke on some hematological parameters and minerals between smoker and non-smoker women.

Materials and methods. Samples of whole blood and serum of volunteers were studied, among whom were 20 smokers and 14 non-smokers aged from 20 to 40 years; smokers were divided according to smoking experience into two groups – 1–15 years and 16–30 years. The work used an automated method for studying the content of blood cells (erythrocytes, platelets, leukocytes with the establishment of the average volume of erythrocytes and taking into account the hemoglobin content) on a hematological autoanalyzer, as well as photometric methods for determining the content of serum iron, magnesium, total calcium, zinc.

Results. The result of this study showed significant differences in red blood cell count, hemoglobin, platelet count and mean cell volume between female smokers and non-smokers, while there was no statistically significant difference in white blood cell count was not found. Against this background, a significant decrease in the concentration of calcium, magnesium, and zinc was revealed in smoking women compared to non-smokers, while the concentration of iron increased significantly. In a smoking history of 16–30 years, changes in the content of blood cells and the elemental composition of blood serum were significantly more pronounced both in relation to those in the control group of persons and in relation to the contingent of women with less smoking experience: 1–15 years.

Conclusion. Cigarette smoking affects hematological parameters and blood elemental composition (including trace elements) in women who smoke compared to non-smokers. Changes in the parameters of morphological blood elements and the content of the studied mineral substances turned out to be significantly more pronounced in women with a long history of smoking.

Keywords: cigarette smoke, blood counts, nutrients, non-smokers, trace elements, hematological parameters

Изер Х.Т.
Университет Басры, Басра, Ирак

Влияние курения сигарет на гематологические параметры и минеральный состав сыворотки у курящих женщин в Басре (Ирак)

Конфликт интересов: не заявлен.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 10.07.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: medicalresearch77@yahoo.com

Резюме

Введение. Курение сигарет является распространенной причиной возникновения проблем со здоровьем. К настоящему времени остаются недостаточно изученными приверженность к курению женщин, а также особенности его влияния на морфологический состав крови и содержание в ней отдельных минеральных веществ в зависимости от возраста.

Цель. Сравнить влияние курения сигарет на некоторые гематологические параметры и минералы у курящих и некурящих женщин.

Материалы и методы. Исследованы образцы цельной крови и сыворотки добровольцев, среди которых были 20 курящих и 14 некурящих в возрасте от 20 до 40 лет, курящие были разделены по стажу курения на две группы – 1–15 лет и 16–30 лет. В работе использованы автоматизированный метод исследования содержания форменных элементов крови (эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов с установлением среднего объема эритроцитов и учетом содержания гемоглобина) на гематологическом автоанализаторе, а также фотометрические методы определения содержания сывороточного железа, магния, общего кальция, цинка.

Результаты. Результат этого исследования показал значительные различия в содержании эритроцитов (RBC), гемоглобина (Hb), тромбоцитов (PCV) и показателях среднего объема эритроцитов (MCV) у курящих и некурящих женщин, в то время как статистически значимой разницы в содержании лейкоцитов (WBC) обнаружено не было. На этом фоне выявлено значительное снижение концентрации кальция, магния, цинка у курящих женщин по сравнению с некурящими, в то время как концентрация железа значительно повысилась. При стаже курения 16–30 лет изменения в показателях содержания форменных элементов крови и элементном составе сыворотки крови были значительно более выраженными как по отношению к таковым в контрольной группе лиц, так и по отношению к контингенту женщин с меньшим стажем курения – 1–15 лет.

Заключение. Курение сигарет влияет на гематологические параметры и элементный состав крови (включая микроэлементы) у курящих женщин по сравнению с некурящими. Изменения в показателях морфологических элементов крови и содержании исследованных минеральных веществ оказались значительно более выраженными у женщин с большим стажем курения.

Ключевые слова: сигаретный дым, показатели крови, нутриенты, некурящие, микроэлементы, гематологические показатели



■ INTRODUCTION

Smoking a cigarette is a bad habit that and one of essential causes leading to a complicated disease and die all over the world [1]. Approximately, four millions smoker died every year and this number will increase to more than 8 million by 2030 according to WHO reports [2]. Smoking is defined as inhalation of burning tobacco which is either occasional habit or a consequence of nicotine inhalation addiction [3]. Cigarette smoking causes the killing of more than half million smoker women around the world and this number is in rapid increase in the period between 1950–2000 to about ten million in many countries [4, 5].

There are more than 4000 different chemicals in every single cigarette smoke, 200–400 are known as toxic or carcinogens. These are nicotine, tar, carbon monoxide, nitrogen oxides, free radicals and some oxidants [6, 7].

Many studies suggested that smoking cigarette can affect the blood parameters [6, 8], found significant increase in WBC counts [9, 10], increase in hemoglobin concentration [11, 12]. Several investigators have described the effect of smoking cigarette on minerals and electrolytes, zinc concentration significantly reduce in smoker [13]. Other researchers demonstrated that smoking cause increase in level of serum iron and decrease of magnesium and calcium among smoker [14–16].

■ PURPOSE OF THE STUDY

To compare the effect of cigarette smoke on some hematological parameters and minerals between smoker and non-smoker women.

■ MATERIALS AND METHODS

Sample collection

This study was carried out on 34 volunteer women aged 20–40 years. Fourteen nonsmoker women and 20 smokers. All volunteer underwent medical health diagnosis at Al-Sadder Educational Hospital. A questionnaire was planned to obtain information as age, habitat (smoker or non), the number of cigarette smoker per day, smoking time (1–15 and 16–30) years and the health condition. All blood samples were collected at the morning after an overnight fasting, 7 ml of venous blood withdrawn. CBC counts were estimated and the serum was separated and used for estimation of serum (zinc, magnesium, iron and calcium).

Iron concentration

It was determined by using kit from biolabo France according to the colorimetric method approved [17]. The concentration of iron calculated as follow: (Iron $\mu\text{g/dl}$) = absorbance of serum (A2-A1) / absorbance of standard (A2-21) \times st.con.

Magnesium concentration

It was determined by using kit from spectrum Egyptian according to the colorimetric method approved [18]. The concentration of magnesium calculated as follow: (magnesium mg/dl) = absorbance of serum / absorbance of standard \times standard concentration.

Calcium concentration

It was determined by using kit from Randox United Kingdom according to the colorimetric method approved [19]. The concentration of calcium calculated as follow: (calcium mg/dl) = absorbance of serum / absorbance of standard \times standar concentration.

Zinc concentration

It was determined by using kit from ILTA-ITALY. The concentration zinc of calculated as follow: (zinc µg/dl) = absorbance of serum / absorbance of standard × 200.

Statistical analysis

Statistical Package of Social Sciences Version 23 (SPSS.V.23). Data normality were tested used Shapiro test. Independent t-test was performed to analyze the data. The significant differences were determined using $p \leq 0.05$.

RESULTS

Table 1 showed the variation in blood parameters between smoker and non-smoker women. A significant increase in some blood parameters in smoker women. RBC increased significantly ($p \leq 0.05$) in smoker women ($6.1 \pm 6.1 \times 10^6/\mu\text{L}$) in comparison in non-smoker ($5 \pm 1.23 \times 10^6/\mu\text{L}$). A significant increase in Hb in smoker women (14.20 ± 0.24 g/dl) while it was (10.79 ± 0.21 g/dl) in non-smoker. PCV apparent significant raised in smoker women ($39.65 \pm 0.33\%$) in comparison with non-smoker ($31.43 \pm 0.4\%$). MCV was ($81.86 \pm 1.27 \mu\text{m}^3$) in non-smoker while in smoker recorded ($101.1 \pm 0.86 \mu\text{m}^3$). WBC was not significantly changes. According to the period of smoking the table 2 showed significant increased ($p \leq 0.05$), in the period (16–30) in comparison with the period (1–15) year of smoking.

Table 3 showed significant increased ($p \leq 0.05$), in serum iron in smoker women (82.15 ± 2.92 µg/dL). Calcium in smoker women showed a significant decrease ($6.91 \pm$

Table 1
Difference in blood parameters between cigarette smoker women and non-smoker (mean±SE)

Groups	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dl)	PCV (%)	MCV (μm^3)
Non-smoker	6.25±4.6 ^a	5±1.23 ^a	10.79±0.2 ^a	31.43±0.4 ^a	81.86±1.27 ^a
Smoker	6.79±1.42 ^a	6.1±6.1 ^b	14.2±0.24 ^b	39.65±0.33 ^b	101.1±0.86 ^b

Notes: ^{a,b} different letters refers to significant difference $p \leq 0.05$.

Table 2
Difference in blood parameters according to the period of smoking (mean±SE)

Groups	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dl)	PCV (%)	MCV (μm^3)
1–15 year	6302.5±91.77 ^a	5900.6±43.22 ^a	13.4±.22 ^a	38.5±0.24 ^a	98.5±0.4 ^a
16–30 year	7278.2±156.52 ^b	6313.5±69.7 ^b	15±.25 ^b	40.8±.24 ^b	103.7±1.21 ^b

Notes: ^{a,b} different letters refers to significant difference $p \leq 0.05$.

Table 3
Minerals (iron, magnesium, calcium and zinc) in serum of cigarette smoker women and non-smoker (mean±SE)

Groups/ parameters	Iron (µg/dL)	Calcium (mg/dL)	Magnesium (mg/dL)	Zinc (µg/dL)
Non-smoker	48.63±1.34 ^a	9.53±0.22 ^a	1.96±0.11 ^a	111.56±1.35 ^a
Smoker	82.15±2.92 ^b	6.91±0.26 ^b	0.82±0.1 ^b	91.36±0.19 ^b

Notes: ^{a,b} different letters refers to significant difference $p \leq 0.05$.

**Table 4**
Iron, calcium, magnesium and zinc according to the period of smoking (mean±SE)

Period (years)	Iron (µg/dL)	Calcium (mg/dL)	Magnesium (mg/dL)	Zinc (µg/dL)
1–15	78.44±2.51 ^a	7.28±0.22 ^a	0.9±0.1 ^a	92.09±0.08 ^a
16–30	93.28±1.91 ^b	5.8±0.1 ^b	0.56±0.07 ^b	90.63±0.19 ^b

Notes: ^{a,b} different letters refers to significant difference $p \leq 0.05$.

0.26 mg/dL). Magnesium in smoker women apparent significantly decline (0.82±0.1 mg/dL) in compare with (1.96±0.11 mg/dL) in non-smoker. Similarly, Zinc was significantly decreased in smoker women (91.36±0.19 µg/dL) while in non-smoker was (111.56±1.35 µg/dL). Table 4 showed a significant increased ($p \leq 0.05$), in serum iron in the period of (16–30) year while the concentration of calcium, magnesium and zinc were significantly decrease in the period (16–30) in compare with (1–15) year.

■ DISCUSSION

Smoking cigarette was responsible for many dangerous diseases, such as anemia, cardiovascular disease, respiratory disorder, pancreatitis, diabetes mellitus and many type of cancer [11] and seem to cause changes in some haematological parameters [6].

Our result found that smoking effect hematological parameters, WBC, RBC, Hb, PCV, and MCV were higher in smoker women, these correlated with [20, 21]. The increase in hemoglobin concentration due to monoxide carbon exposure which bind together to form carboxy hemoglobin therefore the hemoglobin loses the capacity to carry oxygen [22]. Furthermore, increase cigarettes smoked per day and along time exposure to HbCO linked with polycythemia [23].

The increase in HCT and RBC can explained according to the role of carboxy hemoglobin which induce tissue hypoxia so increased erythropoietin hormone secretion which directly stimulate stem cell on red bone marrow to increase erythropoiesis [24], in the same time it cause increase in permeability of capillaries, lowering plasma volume and allow to rise RBC in blood that was reverse to HCT rise [25].

In our study the elevated of mcv may be indicate for any type of anemia independent in low folic acid, iron and vitamin B12 in the blood [7] or may due to changes in lipid and protein in the membrane of red blood cell because of enhance oxidative stress and free radicals as well as the toxic influence in bone marrow of acetaldehyde from smoking cigarette [23].

According to the period of smoking the results in table 2 found that the period (16–30) years of smoking was more effect on hematology indicator, the elevate in RBC and WBC count caused impairment in blood flow which enhance viscosity and clotting ability [26]. Concerning WBCs observed non-significant different between smoker women and non-smoker this result corresponding with the study [27] which find out higher level in WBCs in smoker women but not significant different with non-smoker women.

In the current study the results showed a significant rise in serum of iron in smoker women, this result is in agreement with other studies [28, 29]. Smoking cigarette induce low concentration of oxygen which stimulate increase in the secretion of erythropoietin [30] caused bone marrow hyperplasia which lead to secondary RBC development and

increase red cell mass count above normal level which cause increase in process of RBC production which in turn induce an increase in destruction of RBC lead to excess of iron in the bloodstream and accumulation in liver cell caused hepatocyte damage [31].

Furthermore, in the present study, serum Mg level was significantly decrease in smoker women. This is consistent with [32, 33] smoking cigarette cause decrease in appetite tend to less eat causing decrease of nutrient [34], also smoker suffering from digestive system disorder so reduce absorption of Mg [35], also the smoker demand for exhaustion more Mg to release a lot of adrenaline and rise the thermogenic effect of tobacco constituent predominately nicotine [33].

The results of our finding showed significant reduction in serum calcium among smoker women that is contradict with [36]. Researcher have found that nicotine cause disturbance in absorption of calcium in intestine via effect metabolism of calciotropic hormone and constriction or tighten the blood vessels [37]. Several researcher reported that smoking effect synthesis of steroid hormone and associated with deficiency of vitamin D either through disturbance of its metabolism and function or changing on genes responsible for the metabolism of vitamin D [38, 39], another researcher find that smoking women have reduction in PTH level compare to non-smoke [40] that due to effecting parathyroid gland cell, enhancing its degradation or the toxic effect of chemicals on tobacco which suppressed PTH secretion [41].

Significant difference in concentration of zinc was observed for smoker women compared with nonsmoker, the result confirm with [12, 26] the decrease in zinc probably independent to toxicity of tobacco components specifically in tar phase which contain heavy metals like cadmium, their action antagonistically to the action of Zn, therefore they competition on binding site in metallothionein the direct key for detoxification of cadmium [38, 42]. And because reduce absorption of zinc caused by tobacco chelation effect [12, 13] suggested that smoking induced hypozincemia through its effect on reduce the bioavailability of food intake in Duhok. Also, oxidative stress an important disorder related to smoking habit can influence of zinc metabolism [13].

■ CONCLUSION

Cigarette smoking causes health effects in women, including changes in blood parameters as leukocyte and erythrocyte count, Hb, hematocrit and MCV as well as the nutrients which necessary for body functions. Smoking is a risk factor for developing many dangerous diseases as atherosclerosis, polycythemia, pulmonary cancer and cardiovascular disease.

■ REFERENCES

1. Mathers M., Toumbourou J.W., Catalano R.F., Willims J., Patton G.C. Consequences of youth tobacco use: a review of prospective behavioural studies. *Addiction*. 2006;101(7):948–958.
2. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The MPOWER package. Geneva: WHO; 2008. Available at: http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_full_2008.pdf
3. WHO. *Gender, Women and the Tobacco Epidemic: Addiction to Nicotine*. Available at: http://www.who.int/tobacco/publications/gender/emn_tf_gender_women_addiction_nicotine.pdf (accessed 2 January 2016).
4. Leifert J.A. International Journal of Laboratory Hematology. *Anemia and cigarette smoking*. 2008;30:177–184.
5. Syamlal G., Mazurek J.M., Dube S.R. Gender differences in smoking among U.S. working adults. *Am J Prev Med*. 2014;47(4):467–475. doi: 10.1016/j.amepre.2014.06.013
6. Asif M., Karim S., Umar Z., Malik A., Ismail T., Chaudhary A., Rasool M. Effect of cigarette smoking based on hematological parameters: comparison between male smokers and non-smokers. *Turk J Biochem*. 2013;38(1):75–80.



7. Malenica M., Prnjavorac B., Bego T., Dujic T., Semiz S., Skrbo S., Gusic A., Hadzic A., Causevic A. Effect of Cigarette Smoking on Haematological Parameters in Healthy Population. *MED ARCH.* 2017;71(2):132–136. doi: 10.5455/medarch.2017.71.132-136
8. Wannamethee S.G., Lowe G.D., Shaper A.G., Rumley A., Lennon L., Whincup P.H. Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2005;26(17):1765–1773.
9. Dass B.P., Jagannathan P., Sravanakumar P. Changes in hematological and biochemical parameters in smokeless tobacco (ST) Chewers in Coastal Belt of Andhra Pradesh, India. *European Journal of biological sciences.* 2013;5:29–33.
10. Mukherjee R., Chatterjee A. Assessment of the effects of smoking and consuming gutka (smokeless tobacco) on selected hematological and biochemical parameters: a study on healthy adult males of Hazaribag, Jharkhand. *International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences (IJP CBS).* 2013;3:1172–1178.
11. Alsalhen K.S., Abdalsalam R.D. Effect of cigarette smoking on liver functions: a comparative study conducted among smokers and nonsmokers male in El-beida City, Libya. *Inter Curr Pharm J.* 2014;3(7):291–295.
12. Al-Azzawy L.H.A., Al-Qaicy A.G.S. A study About Some Physiological Parameters In Smokers. *IBN AL-HAITHAM J. FOR PURE & APPL. SCI.* 2011;24(3).
13. AL-Timimi D.J., Haji M.R., Mohammad B.Y. Zinc status among smokers and non-smokers: relation to oxidative stress. *Duhok Medical Journal.* 2010;4(1).
14. Mudawi S., Ahmed S., AL-Abd. B. Assessment of the Levels of Serum Iron and Magnesium in Sudanese Cigarette Smokers. *IOSR Journal Of Pharmacy.* 2013;3(Issue 4):26–30.
15. Dhahir N.K., Noaman A.A. Study Effect of Cigarette Smoking on the Liver Functions and Electrolytes. *Iraqi Journal of Science.* 2017;58(18):211–215.
16. Abou Turab M.K., Yser H.T. Environmental pollution adverse effects of smoking habits in smokers using cigarette and water pipe smokers volunteer. Basrah, Iraq. *Turkish Journal of Physiotherapy and Rehabilitation.* 2022;32(3):31171–31184.
17. Tietz N.W. *Text book of clinical chemistry.* 3rd ed. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, W.B. Saunders. 1999:1698–1704.
18. Thomas L. *Clinical laboratory diagnostics 1st ed.* Frankfurt, TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998:231–241.
19. Ray S.B.C., Chauhan U.P.S. *Anal Biochem.* 1967;20:155.
20. Lakshmi A.S., Lakshmanan A., Kumar G.P., Saravanan A. Effect of Intensity of Cigarette Smoking on Haematological and Lipid Parameters. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2014;8(7):11–3.
21. Nadia M.M., Shamseldin H.A., Sara A.S. Effects of Cigarette and Shisha Smoking on Hematological Parameters: An analytic case-control study. *International Multispecialty Journal of Health.* 2015;1(10):44–51.
22. Waseem S.M., Srivastava V.K., Bano R., Singh S., Dhunagana H. Anemia as co-morbidity in COPD: Comparative study of oxidant anti-oxidant imbalance in anemic and non-anemic COPD patients. *Int J Contemp Med Res.* 2017;4:1223–7.
23. Buckley C.M., Harrington J.M., O'Shea S., Perry J.J. Cigarette smoking is an under recognised cause of macrocytosis. *Blood.* 2013;122:4660.
24. Nunes A.R., Tata M. The impact of anaemia and iron deficiency in chronic obstructive pulmonary disease: A clinical overview. *Revista Portuguesa de Pneumologia.* 2017;23:146–155.
25. Verma R.J., Patel C.S. Effect of smoking on Haematological parameters in Human Beings. *Journal of Cell and Tissue Research.* 2015;5(1):337.
26. Ho C.H. White blood cell and platelet counts could affect whole blood viscosity. *J Chin Med Assoc.* 2004;67(8):394–397.
27. Arbab M., Batool Z., Afsheen H., Ali H., Naeem M., Tariq N., Hameed T., Tariq M.M., Bukhari F.A. Variation in hematological parameters in adult male and female smokers in Quetta city. *Pure and Applied Biology.* 2019;8(1):866–872.
28. Milnerowicz H., Wrzesniak M., Krolak M., Kowalska K. Influence of tobacco smoke on zinc, cadmium, iron, iron-binding proteins, and low-weight anti-oxidant status in pregnancy, Inhalation Toxicology. *International Forum for Respiratory Research.* 2018;30(13-14):534–541.
29. Abdullah E.S., Al-Shawi N.N. Estimation of serum levels of copper, zinc, and iron and cytological study of the impact of smoking on oral keratinocytes in a sample of tobacco smoke among Iraqi men. *Ann Trop Med & Public Health.* 2020;23(519):SP232131.
30. Jelkmann W. Erythropoietin. *Front Horm Res.* 2016;47:15–27.
31. El-Zayadi A.R. Heavy smoking and liver. *World J Gastroenterol.* 2006;12:6098–6101.
32. Peacock J.M. Serum magnesium and risk of sudden cardiac death in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am Heart Journal.* 2010;160:464–70.
33. Khand F., Shaikh S.S., Ata M.A., Shaikh S.S. Evaluation of the effect of smoking on complete blood counts, serum C-reactive protein and magnesium levels in healthy adult male smokers. *J Pak Med Assoc.* 2015;65(1).
34. Kocyigit A., Erel D., Gur S. Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper, and iron concentrations and related antioxidative enzymes activities. *Clin Biochem.* 2021;34(8):629–33.
35. Winiarczyk A.U., Bagniak A., Lalkowska K.G., Szubartowska E. Calcium, Magnesium, Iron, Zinc and Copper Concentration In the Hair of Tobacco Smokers. *Biol Trace Elem Res.* 2008;128:152–160.
36. Hussein S.E.O. Effect of Cigarettes Smoking on the Serum Levels of Calcium and Phosphate in Sudanese Males in Khartoum. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences.* 2015;2(8):4–9.
37. Cusano N.E. Skeletal Effects of Smoking. *Current Osteoporosis Reports.* 2015;13(5):302–309.
38. Shi L., Nechuta S., Gao Y.T., Zheng Y., Dorjgochoo T., Wu J., Cai Q., Zheng W., Lu W., Shu X.O. Correlates of 25-hydroxyvitamin D among Chinese breast cancer patients. *PLoS One.* 2014;9(1):e86467. doi: 10.1371/journal.pone.0086467
39. Colao A., Muscogiuri G., Rubino M., Vuolo L., Pivonello C., Sabatino P., Pizzo M., Campanile G., Fittipaldi R., Lombardi G., Di Somma C. Hypovitaminosis D in adolescents living in the land of sun is correlated with incorrect life style: a survey study in Campania region. *Endocrine.* 2015;49(2):521–7. doi: 10.1007/s12020-014-0483-8
40. Fujiyoshi A., Polgreen L.E., Gross M.D., Reis J.P., Sidney S., David R., Jacobs D.R. Smoking habits and parathyroid hormone concentrations in young adults: The CARDIA study. *Bone Rep.* 2016;5:104–109. doi: 10.1016/j.bonr.2016.04.003
41. Jorde R., Saleh F., Fjenschau Y., Kamycheva E., Haug E., Sundsfjord J. Serum parathyroid hormone (PTH) levels in smokers and non-smokers. The fifth Tromso study. *Eur. J. Endocrinol.* 2005;152:39–45.
42. Richter P., Faron O., Pappas R.S. Cadmium and Zinc Ratios and Tobacco-Related Morbidities. *International journal of environmental research and public health.* 2017;14(10):1154.



Сивец И.С.¹✉, Кудина В.А.², Томчук Н.Н.²

¹ Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

² Минский городской клинический центр дерматовенерологии, Минск, Беларусь

Создание внутренней контрольной панели сывороток для ее использования в ходе производства RPR-тест-системы для диагностики сифилиса на базе унитарного предприятия «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»)

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: сбор биологического материала, проведение исследований, учет и анализ результатов – Сивец И.С., Кудина В.А.; оформление результатов – Томчук Н.Н.; редактирование, подготовка текста и иллюстраций – Сивец И.С., Кудина В.А., Томчук Н.Н.

Подана: 03.04.2023

Принята: 13.11.2023

Контакты: siwets.irina@yandex.ru

Резюме

Введение. Сифилис – инфекционное заболевание, этиологическим агентом которого является *Treponema pallidum*, характеризуется разнообразными клиническими проявлениями с периодичностью течения. Для диагностики сифилиса используются 2 категории серологических тестов: трепонемные и нетрепонемные. Трепонемные тесты выявляют антитела к специфическим антигенам *Treponema pallidum*. Нетрепонемные тесты основаны на обнаружении антител к кардиолипину. Они быстры, доступны и необходимы для оценки эффективности лечения или подтверждения реинфекции. Тест быстрых плазменных реактивов (Rapid plasma reagin, RPR-тест) относится к группе нетрепонемных тестов, широко используется в медицинских учреждениях для диагностики сифилиса при профилактических обследованиях населения, диагностике его клинических форм и клинико-серологическом наблюдении после лечения, информативен при обследовании пациентов с вторичным и ранним скрытым сифилисом. Исследование осуществляется как в качественном, так и в полуколичественном вариантах. Так как отечественные технологии производства RPR-теста отсутствуют, при разработке наборов реагентов необходимо создание контрольной панели сывороток для оценки качества RPR-теста при его производстве.

Цель. Создание контрольных панелей сывороток для оценки эффективности тест-систем и проведения медико-лабораторных испытаний экспериментальных партий новых наборов реагентов.

Материалы и методы. При создании панели использовались образцы сыворотки крови пациентов с различными формами сифилиса (основная группа), а также



пробы пациентов, которые были включены в контрольную группу исследования. Тестирование проб проводилось методом RPR с использованием разработанного УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» набора реагентов, предназначенного для качественного и полуколичественного определения неспецифических реактивных антител при выявлении бактериальной инфекции *Treponema pallidum*. Использовались подтверждающие наборы других производителей.

Результаты. На основе образцов сывороток с патологическим и нормальным содержанием быстрых плазменных реагинов создана контрольная панель сывороток, которая будет использоваться для контроля качества разработанного набора RPR-теста при его серийном производстве.

Заключение. Созданы внутренние контрольные панели сывороток, содержащие реактивные антитела в широком диапазоне концентраций.

Ключевые слова: сифилис, RPR-тест, нетрепонемный тест, производство, контрольная панель сывороток, тест быстрых плазменных реагинов

Sivets I.¹✉, Kudzina V.², Tamchuk N.²

¹ Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnology, Minsk, Belarus

² Minsk City Clinical Center of Dermatovenerology, Minsk, Belarus

Creation of an Internal Control Serum Panel for its Use in the Production of the RPR-Test-System for Diagnostics Based on the Domestic Manufacturer Unitary Enterprise "Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus"

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: collection of biological material, research, accounting and analysis of results – Sivets I., Kudzina V.; registration of results – Tamchuk N.; text and illustrations – Sivets I., Kudzina V., Tamchuk N.

Submitted: 03.04.2023

Accepted: 13.11.2023

Contacts: sivets.irina@yandex.ru

Abstract

Introduction. Syphilis is an infectious disease caused by *Treponema pallidum*, which is characterized by diverse clinical manifestations and periodicity of progression. Two categories of serological tests are used to diagnose syphilis: treponemal and non-treponemal. Treponemal tests detect antibodies to specific antigens of *Treponema pallidum*. Non-treponemal tests are based on the detection of antibodies to cardiolipin. They are fast, accessible and necessary for evaluating treatment efficacy or confirming reinfection. The RPR test belongs to the group of non-treponemal tests and is widely used in medical institutions for diagnosing syphilis during population screening, diagnosing

its clinical forms, clinical and serological observation after treatment. It is informative for examining patients with secondary and early latent syphilis. The test can be conducted both qualitatively and semi-quantitatively. As there are no domestic production technologies for the RPR test, it is necessary to create a control serum panel for assessing the quality of the RPR test during its production when developing reagent kits.

Purpose. Create of serum control panels to evaluate the test-systems effectiveness and conduct medical laboratory tests of experimental batches of new reagent sets.

Materials and methods. Samples of blood serum from patients with various forms of syphilis were used in the creation of the panel (the main group), as well as samples from patients included in the study's control group. Testing of the samples was performed using the RPR method with a set of reagents developed by Unitary Enterprise "Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus" for the qualitative and semi-quantitative determination of non-specific reagin antibodies in the detection of bacterial infection with *Treponema pallidum*. Confirmatory sets from other manufacturers were also used.

Results. A control serum panel has been created based on samples of serum with pathological and normal levels of rapid plasma reagins. This panel will be used for quality control of the developed RPR test kit during its mass production.

Conclusion. Internal control serum panels containing reagin antibodies over a wide range of concentrations have been created.

Keywords: syphilis, RPR-test, non-treponemal test, production, control serum panel, rapid plasma reagin test

■ ВВЕДЕНИЕ

У пациентов с первичной формой сифилиса в сыворотке (плазме) крови и, при некоторых формах заболевания, в ликворе появляются реакиновые антитела, которые взаимодействуют с липоидными антигенами клеточной мембраны возбудителя заболевания *T. pallidum*. К регламентированным методам исследования, применяемым для диагностики сифилитической инфекции, относятся нетрепонемные тесты, предназначенные для определения реакиновых антител с использованием кардиолипинового антигена: тест быстрого определения реакинов плазмы (RPR) [1, 2].

После успешно проведенного лечения с применением антибактериальных средств у пациентов с сифилитической инфекцией отмечается снижение содержания реакиновых антител к *T. pallidum* и обычно через некоторое время результаты нетрепонемных тестов становятся отрицательными. Результаты полуколичественного определения реакиновых антител (титра антител) могут быть использованы в качестве критериев оценки эффективности антибиотикотерапии пациентов, страдающих сифилисом, излеченности и возможности снятия с клинико-диагностического наблюдения [2, 3].

RPR-тест основан на реакции флокуляции (образовании агрегатов). При взаимодействии реакиновых антител (антифосфолипидные антитела классов IgM и IgG), присутствующих в сыворотке или плазме, с кардиолипиновым антигеном образуются комплексы антиген-антитело (преципитат). Наличие таких антител служит



основанием для постановки предварительного диагноза сифилиса. В случае положительного образца присутствующие в нем реактивные антитела образуют видимые агрегаты с антиген-угольными частицами. В случае отрицательного образца суспензия остается гомогенной. Результат оценивается визуально. Величина частиц преципитата может быть выражена в условных единицах от 2+ до 4+:

резко положительный результат (4+) – крупные частицы преципитата черного цвета распределяются равномерно по всей лунке либо имеют тенденцию к расположению по периферической части, при этом реакционная среда практически полностью прозрачна – это свидетельствует о высоком содержании антител к кардиолипину, лецитину и холестерину в биологическом материале;

положительный результат (3+) – агрегаты угольных частиц средней величины распределены по всей лунке, реакционная среда имеет просветление общего фона реакционной среды – указывает также на наличие большого количества антител-преципитатов;

слабоположительный результат (2+) – мелкие частицы преципитата распределены по периферии лунки, реакционная среда имеет гомогенную структуру – свидетельство отсутствия антител в биологическом материале;

отрицательный результат – преципитата нет, видимые агрегаты угольных частиц в пробе отсутствуют, реакционная среда гомогенной структуры либо частицы угля собираются в центральной части лунки, формируя пятно черного цвета, – антитела в сыворотке не выявлены.

При результате 4+ дальнейшую оценку напряженности гуморального иммунного ответа (полуколичественную оценку содержания антител) проводят путем титрования последовательных разведений исследуемого образца патологического материала (титрование). Титром антител считается наибольшее разведение исследуемого образца, при котором наблюдается положительный результат. У некоторых пациентов с очень высоким содержанием антител в биологическом материале возможно проявление эффекта прозоны. Причина этого явления заключается в том, что переизбыток антител не позволяет образоваться преципитации комплексов антиген-антитело [4].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание контрольных панелей сывороток для оценки эффективности тест-систем и проведения медико-лабораторных испытаний экспериментальных партий новых наборов реагентов.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор образцов для проведения исследований является важной операцией, направленной на обеспечение достоверности и обоснованности результатов. Забор биологического материала осуществлялся в соответствии с требованиями, устанавливающими методы отбора, в количестве, необходимом для проведения исследований и измерений [4]. Выборка пациентов происходила в 2 этапа. На 1-м этапе было протестировано 69 проб пациентов (пробы сывороток 45 пациентов с различными формами сифилиса и пробы сывороток 24 клинически здоровых мужчин и женщин).

В работе использовались референс-наборы реагентов, предназначенные для качественного и полуколичественного определения неспецифических реактивных

антител при выявлении бактериальной инфекции *Treponema pallidum*, связанной с сифилисом, производства ЗАО «ЭКОлаб», Российская Федерация, и Dialab, Австрия (табл. 1):

- пробы 24 пациентов имели отрицательный результат (-);
- пробы 8 пациентов имели слабоположительный результат (2+);
- пробы 13 пациентов имели положительный результат (3+);
- пробы 24 пациентов имели резко положительный результат с количественной раститровкой (4+).

Таблица 1
Выборка сывороток пациентов с разной степенью позитивности. 1-й этап
Table 1
Serum samples were collected from patients with varying degrees of positivity. Stage 1

№ п/п	№ контрольной пробы	Результаты	
		Референс-набор производства ЗАО «ЭКОлаб», Российская Федерация	Референс-набор производства Dialab, Австрия
1	18	Отр.	
2	29	3+	
3	30	4+ титр 1/4	
4	35	2+	
5	37	Отр.	
6	40	3+	
7	43	2+	
8	45	3+	
9	47	4+ титр 1/16	
10	53	Отр.	
11	54	4+ титр 1/2	
12	55	3+	
13	63	4+ титр 1/8	
14	64	Отр.	
15	65	4+ титр 1/32	
16	71	4+ титр 1/64	
17	73	Отр.	
18	79	3+	
19	85	4+ титр 1/2	
20	87	4+ титр 1/2	
21	90	Отр.	
22	91	2+	
23	92	4+ титр 1/64	
24	93	3+	
25	94	Отр.	
26	95	4+ титр 1/32	
27	98	2+	
28	100	4+ титр 1/2	
29	101	Отр.	



Окончание таблицы 1

№ п/п	№ контрольной пробы	Результаты	
		Референс-набор производства ЗАО «ЭКОлаб», Российская Федерация	Референс-набор производства Dialab, Австрия
30	103	Отр.	
31	105	4+ титр 1/8	
32	107	3+	
33	108	4+ титр 1/2	
34	109	Отр.	
35	110	Отр.	
36	111	Отр.	
37	115	3+	
38	118	4+ титр 1/128	
39	121	Отр.	
40	125	4+ титр 1/16	
41	129	2+	
42	130	4+ титр 1/8	
43	150	4+ титр 1/4	
44	151	Отр.	
45	152		Отр.
46	153		3+
47	154		Отр.
48	155		2+
49	160		Отр.
50	161		3+
51	163		Отр.
52	164		4+ титр 1/8
53	165		Отр.
54	177		2+
55	178		Отр.
56	179		4+ титр 1/4
57	180		4+ титр 1/2
58	181		4+ титр 1/64
59	182		Отр.
60	183		4+ титр 1/8
61	187		3+
62	188		Отр.
63	189		4+ титр 1/16
64	190		Отр.
65	195		3+
66	197		3+
67	198		2+
68	199		4+ титр 1/8
69	200		Отр.

К тому же было выбрано и протестировано 50 проб пациентов (пробы сывороток 42 пациентов с различными формами сифилиса и пробы сывороток 8 клинически здоровых мужчин и женщин). В работе использовался разработанный набор реагентов, предназначенный для качественного и полуколичественного определения неспецифичных реагиновых антител при выявлении бактериальной инфекции *Treponema pallidum*, связанной с сифилисом, производства УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», Республика Беларусь. Результаты тестирования сывороток крови пациентов с использованием референс-наборов, а также экспериментальных образцов разработанных наборов были сопоставимы (табл. 2).

Таблица 2
Тестирование сывороток крови пациентов с использованием тест-систем разных производителей
Table 2
Testing of blood serum from patients using test systems from different manufacturers

№ п/п	№ контрольной пробы	Результаты		
		Референс-набор производства ЗАО «ЭКОлаб», Российская Федерация	Референс-набор производства Dialab, Австрия	Разработанный УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», Республика Беларусь
1	201	4+ титр 1/2		4+ титр 1/2
2	202	3+		3+
3	203	4+ титр 1/2		4+ титр 1/2
4	204	2+		2+
5	206	3+		2+
6	210	4+ титр 1/16		4+ титр 1/8
7	257	4+ титр 1/16		4+ титр 1/8
8	259	3+		3+
9	260	2+		2+
10	261	4+ титр 1/2		3+
11	262	2+		2+
12	263	Отр.		Отр.
13	264	2+		2+
14	265		2+	2+
15	267		2+	2+
16	268		4+ титр 1/64	4+ титр 1/32
17	269		4+ титр 1/16	4+ титр 1/8
18	270		4+ титр 1/8	4+ титр 1/4
19	271		4+ титр 1/8	4+ титр 1/4
20	272		4+ титр 1/64	4+ титр 1/32
21	274		4+ титр 1/64	4+ титр 1/32
22	276		2+	2+
23	277		4+ титр 1/64	4+ титр 1/16
24	278		4+ титр 1/4	4+ титр 1/2
25	279		4+ титр 1/2	3+
26	280		4+ титр 1/4	4+ титр 1/4
27	281		4+ титр 1/2	4+ титр 1/2



Окончание таблицы 2

№ п/п	№ контрольной пробы	Результаты		
		Референс-набор производства ЗАО «ЭКОлаб», Российская Федерация	Референс-набор производства Dialab, Австрия	Разработанный УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», Республика Беларусь
28	282		4+ титр 1/4	4+ титр 1/4
29	283		2+	2+
30	284		4+ титр 1/16	4+ титр 1/8
31	285		4+ титр 1/32	4+ титр 1/16
32	288		4+ титр 1/64	4+ титр 1/32
33	289		4+ титр 1/2	4+ титр 1/2
34	290		2+	2+
35	291		4+ титр 1/32	4+ титр 1/16
36	293		4+ титр 1/8	4+ титр 1/8
37	296		Отр.	Отр.
38	299		4+ титр 1/32	4+ титр 1/16
39	300		Отр.	Отр.
40	301		4+ титр 1/32	4+ титр 1/16
41	302		4+ титр 1/8	4+ титр 1/8
42	303		Отр.	Отр.
43	305		Отр.	Отр.
44	307		2+	2+
45	308		Отр.	Отр.
46	309		Отр.	Отр.
47	310		4+ титр 1/4	4+ титр 1/4
48	312		4+ титр 1/32	4+ титр 1/16
49	314		3+	3+
50	318		Отр.	Отр.

На 2-м этапе исследования было протестировано 83 пробы пациентов (пробы сывороток 67 пациентов с различными формами сифилиса и пробы сывороток 16 клинически здоровых мужчин и женщин). В работе использовались референс-наборы реагентов, предназначенные для качественного и полуколичественного определения неспецифичных реагиновых антител при выявлении бактериальной инфекции *Treponema pallidum*, связанной с сифилисом, производства АО «Вектор-Бест», Российская Федерация, и Dialab, Австрия (табл. 3). Были отобраны следующие:

- пробы 16 пациентов имели отрицательный результат (-);
- пробы 19 пациентов имели слабоположительный результат (2+);
- пробы 4 пациентов имели положительный результат (3+);
- пробы 44 пациентов имели резко положительный результат с количественной раститровкой (4+).

В амбулаторно-дерматовенерологическом отделении № 4 имеется полная информация об обследуемых пациентах. Биологический материал направлялся в Республиканскую референс-лабораторию по диагностике сифилиса, где регистрировался и фиксировался в базе данных. Республиканская референс-лаборатория

Таблица 3

Выборка сывороток пациентов с разной степенью позитивности. 2-й этап

Table 3

Serum samples were collected from patients with varying degrees of positivity. Stage 2

№ п/п	№ контрольной пробы	Результаты	
		Референс-набор производства АО «Вектор-Бест», Российская Федерация	Референс-набор производства Dialab, Астрия
1	591	Отр.	
2	592	4+ титр 1/128	
3	593	2+	
4	595	4+ титр 1/8	
5	596	Отр.	
6	597	4+ титр 1/4	
7	598	2+	
8	599	2+	
9	600	4+ титр 1/16	
10	601	4+ титр 1/32	
11	602	2+	
12	603	3+	
13	605	Отр.	
14	606	4+ титр 1/16	
15	607	Отр.	
16	608	4+ титр 1/4	
17	609	4+ титр 1/4	
18	610	4+ титр 1/16	
19	611	4+ титр 1/16	
20	612	4+ титр 1/8	
21	613	4+ титр 1/4	
22	614	2+	
23	615	4+ титр 1/8	
24	616	Отр.	
25	618	2+	
26	619	2+	
27	621	4+ титр 1/4	
28	622	4+ титр 1/2	
29	623	4+ титр 1/2	
30	624	Отр.	
31	625	Отр.	
32	626	4+ титр 1/4	
33	627	4+ титр 1/32	
34	628	Отр.	
35	630	4+ титр 1/4	
36	632	4+ титр 1/16	
37	633	4+ титр 1/16	
38	634	Отр.	
39	635	4+ титр 1/16	
40	637	3+	



Окончание таблицы 3

№ п/п	№ контрольной пробы	Результаты	
		Референс-набор производства АО «Вектор-Бест», Российская Федерация	Референс-набор производства Dialab, Астрия
41	638	4+ титр 1/128	
42	640	Отр.	
43	641	2+	
44	643	4+ титр 1/32	
45	644	2+	
46	645	4+ титр 1/8	
47	648	4+ титр 1/32	
48	649	2+	
49	650	Отр.	
50	652	2+	
51	653	4+ титр 1/2	
52	654	4+ титр 1/16	
53	656	4+ титр 1/8	
54	657	4+ титр 1/64	
55	658	4+ титр 1/16	
56	659	Отр.	
57	660	3+	
58	661	Отр.	
59	662	4+ титр 1/2	
60	663	3+	
61	665	2+	
62	666	4+ титр 1/4	
63	667	4+ титр 1/16	
64	668	4+ титр 1/4	
65	669	2+	
66	670	2+	
67	671	4+ титр 1/8	
68	672	4+ титр 1/8	
69	673	4+ титр 1/32	
70	674		2+
71	675		2+
72	676		4+ титр 1/32
73	677		Отр.
74	678		2+
75	679		2+
76	680		4+ титр 1/16
77	681		4+ титр 1/4
78	682		4+ титр 1/2
79	683		2+
80	684		4+ титр 1/4
81	685		Отр.
82	686		4+ титр 1/8
83	687		Отр.

по диагностике сифилиса создана на базе и является структурным подразделением учреждения здравоохранения «Минский городской клинический центр дерматовенерологии» в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.08.2018 № 851.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Определены критерии и сформирована база данных контрольной группы пациентов, больных сифилисом различной формы заболевания, и здоровых лиц, включаемых в исследование. Осуществлен забор биологического материала для проведения тестирования.

Проведено тестирование выбранных проб сыворотки крови пациентов с использованием референс-наборов RPR-теста.

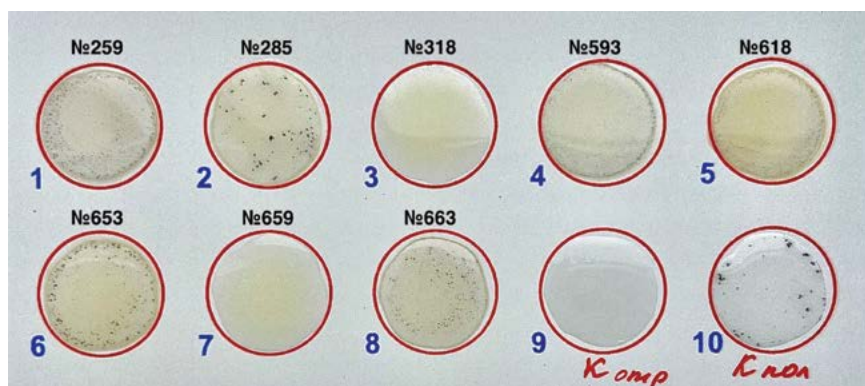


Рис. 1. Реакция быстрых плазменных реагинов (RPR-тест). Качественная постановка
Fig. 1. Rapid plasma reagin (RPR-test). Qualitative testing

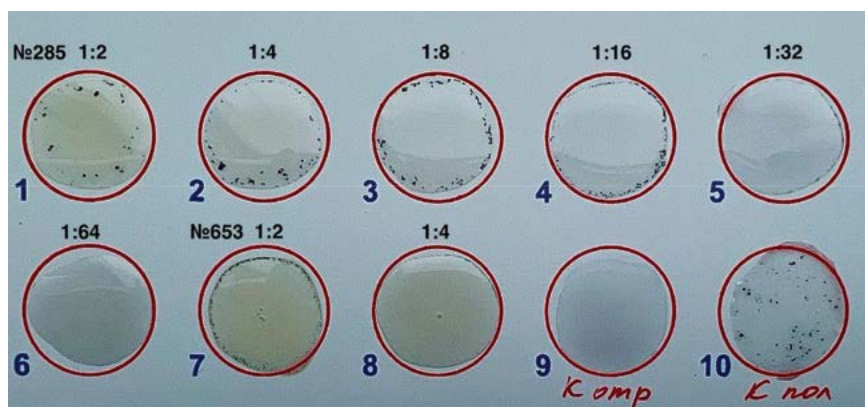


Рис. 2. Реакция быстрых плазменных реагинов (RPR-тест). Полуколичественное определение реагиновых антител (титр антител)
Fig. 2. Rapid plasma reagin (RPR) test. Semi-quantitative determination of reagin antibodies (antibody titer)



На рис. 1 приведен пример определения качественной реакции быстрых плазменных реагинов при использовании сывороток из контрольной панели.

На рис. 2 представлены результаты полуколичественного определения реагиновых антител (титра антител).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В сформированную контрольную панель вошли пробы сыворотки клинически здоровых людей (отрицательный результат) и сыворотки пациентов с сифилитической инфекцией (положительный результат). Панель сывороток была протестирована на референс-наборах различных производителей, результаты были сопоставимы. Сформированная база сывороток используется при контроле производства тест-системы отечественного производителя УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси».

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Manual for laboratory diagnosis of syphilis of 20.10.2020 № 1105. (in Russian)
2. *Diagnosis and treatment of patient with syphilitic infection*. The guidelines on diagnosis and management of syphilis of 19.09.2019 № 96. (in Russian)
3. *Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines*. 2021. Available at: <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/syphilis.htm>.
4. *Standard Operational Procedure for Syphilis*: SOP № SYPH003/01; SOP № SYPH004/01; SOP № SYPH005/01; SOP № SYPH006/01. Moscow; 2006. (in Russian)

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ, ПЛАНИРУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЮ В ЖУРНАЛАХ ИЗДАТЕЛЬСТВА «ПРОФЕССИОНАЛЬНЫЕ ИЗДАНИЯ»

С подробной версией и примерами оформления статьи можно ознакомиться на сайте www.recipe.by.

В журнале публикуются оригинальные статьи, описания клинических наблюдений, лекции и обзоры литературы.

Журнал рассматривает материалы от аспирантов, соискателей, докторантов, специалистов и экспертов.

Представление статьи в журнал подразумевает, что:

- статья не была опубликована ранее в другом журнале;
- статья не находится на рассмотрении в другом журнале;
- все соавторы согласны с публикацией текущей версии статьи.

Перед отправкой статьи на рассмотрение убедитесь, что в файле (файлах) содержится вся необходимая информация на русском и английском языках, указаны источники информации, размещенной в рисунках и таблицах, все цитаты оформлены корректно.

Параметры форматирования: Times New Roman, кегль – 12, междустрочный интервал – 1,5. Объем оригинального исследования, описания клинического случая – 30 000 знаков с пробелами (15–17 страниц), обзора, лекции – 50 000 знаков с пробелами (20–25 страниц). Количество рисунков и таблиц – не более 5 для каждой позиции. Количество литературных источников: для оригинального исследования, описания клинического случая – не более 30, обзора, лекции – не более 50. Допускается 10–15%-е отклонение от заданных объемов.

На титульном листе статьи размещаются (на русском и английском языках):

I. Имя автора (авторов)

На русском языке при указании авторов статьи фамилию следует указывать до инициалов имени и отчества (Иванов П.С.).

На английском языке при указании авторов статьи используется формат «Имя, инициал отчества, фамилия» (Ivan P. Ivanov). Фамилию на английском языке необходимо указывать в соответствии тем, как она была указана в ранее опубликованных статьях, или использовать стандарт BSI.

II. Информация об авторе (авторах)

В этом разделе перечисляются звание, должность, иные регалии. Здесь также указываются e-mail и телефон ответственного автора.

III. Аффiliation автора (авторов)

Аффiliation включает в себя официальное название организации, включая город и страну. Авторам необходимо указывать все места работы, имеющие отношение к проведению исследования.

Если в подготовке статьи принимали участие авторы из разных учреждений, необходимо указать принадлежность каждого автора к конкретному учреждению с помощью надстрочного индекса.

Необходимо официальное англоязычное название учреждения для блока информации на английском языке.

IV. Название статьи

Название статьи на русском языке должно соответствовать содержанию статьи. Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

V. Аннотация

Рекомендуемый объем структурированной аннотации для оригинальных исследований: 1000–2000 знаков с пробелами. Аннотация содержит следующие

разделы: Цель, Методы, Результаты, Заключение. Для обзорных статей и описаний клинических случаев требований к структуре резюме нет, его объем должен составлять не менее 1000 знаков с пробелами.

В аннотацию не следует включать впервые введенные термины, аббревиатуры (за исключением общеизвестных), ссылки на литературу.

VI. Ключевые слова

5–7 слов по теме статьи. Желательно, чтобы ключевые слова дополняли аннотацию и название статьи.

VII. Благодарности

В этом разделе указываются все источники финансирования исследования, а также благодарности людям, которые участвовали в работе над статьей, но не являются ее авторами.

VIII. Конфликт интересов

Автор обязан уведомить редактора о реальном или потенциальном конфликте интересов, включив информацию о конфликте интересов в соответствующий раздел статьи. Если конфликта интересов нет, автор должен также сообщить об этом. Пример формулировки: «Конфликт интересов: не заявлен».

Текст статьи

В журнале принят формат IMRAD (Introduction, Methods, Results, Discussion; Введение, Методы, Результаты, Обсуждение).

Рисунки

Рисунки должны быть хорошего качества, пригодные для печати. Все рисунки должны иметь подрисовочные подписи. Подрисовочная подпись должна быть переведена на английский язык.

Таблицы

Таблицы должны быть хорошего качества, пригодные для печати. Обязательны таблицы, пригодные для редактирования, а не отсканированные или в виде рисунков. Все таблицы должны иметь заголовки. Название таблицы должно быть переведено на английский язык.

Список литературы

В журнале используется Ванкуверский формат цитирования, который подразумевает отсылку на источник в квадратных скобках и последующее указание источников в списке литературы в порядке упоминания: [6].

При описании источника следует указывать его DOI, если его можно найти (для зарубежных источников удается это сделать в 95% случаев).

В ссылках на статьи из журналов должны быть обязательно указаны год выхода публикации, том и номер журнала, номера страниц.

В описании каждого источника должны быть представлены не более 3 авторов.

Ссылки должны быть верифицированы, выходные данные проверены на официальном сайте.

Списки литературы приводятся только на английском языке, без транслитерации. После описания русскоязычного источника в конце ссылки ставится указание на язык работы: (in Russian).

Для транслитерации имен и фамилий авторов в русскоязычных источниках, названий журналов следует использовать стандарт BSI.

Редакция журнала ведет переписку с ответственным (контактным) автором.

Редакция вправе отклонить статью без указания причины.

НАШИ ОПЫТ, ТЕХНИЧНОСТЬ, ЭСТЕТИКА –
ВАШЕ ПОПАДАНИЕ В ЦЕЛЬ!



220049, г. Минск, ул. Кнорина, 17
+375 17 3221678; +375 29 3499732
e-mail: office@recipe.by



ПРОФЕССИОНАЛЬНЫЕ
ИЗДАНИЯ