

ВЕСТНИК

ВИТЕБСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

Том 8

№ 1

2009



*Ежеквартальный рецензируемый
научно-практический журнал*

ВЕСТНИК

Витебского государственного медицинского
университета

Том 8

№1

2009

Ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал
основан в 2002 году

Учредитель - Учреждение образования «Витебский государственный
ордена Дружбы народов медицинский университет»

Редакционная коллегия:

В.П. Дейкало (*главный редактор*), А.П. Солодков (*зам. главного редактора*),
С.С. Алексанин (Санкт-Петербург), О.-Я.Л. Бекиш, В.С. Глушанко, Н.С. Турина,
Г.Г. Воронов (Минск), А.И. Жебентяев, В.И. Заяц, С.А. Кабанова, Н.Ю. Коневалова,
А.Н. Косинец, Л.Е. Криштопов, СП. Кулик, З.С. Кунцевич, А.М. Литвяков, Н.Г. Луд,
О.Д. Мяделец, И.А. Наркевич (Санкт-Петербург), А.А. Пашков, В.П. Подпалов,
В.М. Семенов, В.И. Шебеко

Редакционный совет:

Г.П. Адаменко (Витебск), В.П. Адаскевич (Витебск), Ю.В. Алексеенко (Витебск),
А.П. Божко (Витебск), С.Н. Занько (Витебск), Р.В. Кадушко (Витебск),
Ю.В. Крылов (Витебск), С.А. Лихачев (Минск), И.Ю. Малышев (Москва),
Е.Б. Манухина (Москва), А.Г. Мрочек (Минск), В.И. Новикова (Витебск),
В.И. Петухов (Витебск), П.Т. Петров (Минск), И.М. Прищепа (Витебск),
М.И. Римжа (Минск), Г.И. Сидоренко (Минск), Л.П. Титов (Минск), В.М. Холод (Витебск),
В.П. Филонов (Минск), И.А. Флоряну (Витебск),
В.М. Цыркунов (Гродно)

Секретариат:

А.В. Гайдукова, Л.М. Родкина

Журнал «Вестник Витебского государственного медицинского университета» цитируется и
реферируется в реферативных изданиях ВИНИТИ

Адрес редакции: 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, тел. (0212) 241-738,
e-mail: admin@vgmu.vitebsk.by

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь, свидетельство
№ 1494 от 16.12.2004 г. ISSN 1607-9906

© Витебский государственный медицинский университет, 2009

СОДЕРЖАНИЕ

Обзор

Сергеева С.П.

Цитокины и ответ иммунной системы в условиях острого нарушения мозгового кровообращения

5

Клеточная биология

Хулуп Г.Я., Мاستицкая С.Ю., Зафранская М.М., Ламовская Н.В., Нижегородова Д.Б., Иванчик Г.И., Денеке Б.

Дифференцировочные и иммуномодулирующие свойства мезенхимальных стволовых клеток как потенциальные механизмы положительного действия при инфаркте миокарда

12

Анатомия

Бурак Г.Г., Самсонова И.В., Кобец Ю.Г.

Варианты отхождения, топографии и ветвления лабиринтных артерий: анатомо-клинические аспекты

22

Внутренние болезни

Макаренко Е.В.

Диагностика эрадикации по уровню антител IG G к *Helicobacter Pylori* у больных дуоденальной язвой

33

Травматология и ортопедия

Карев Д.Б., Карев Б.А., Болтрукевич С. И., Горбачёв А. Е.

Ошибки и осложнения в лечении пациентов с медиальными переломами бедренной кости

39

Онкология

Савицкий С.Э.

Молекулярно- генетические и клинические аспекты наследственного рака молочной железы

45

Кожные и венерические болезни

Козина Ю.В.

Экстракт для ванн и гель из бурых морских водорослей в комплексной терапии больных распространенным псориазом

52

Инфекционные и паразитарные болезни

Жильцов И.В., Веремей И.С., Семенов В.М., Генералов И.И.

Особенности бета-лактамазной активности сыворотки крови больных рожей и пневмонией

58

CONTENTS

Review

Sergeyeva S.P.

Cytokines and immune system response in acute stroke

Cell biology

Khulup G.Y., Mastitskaya S.Y., Zafranskaya M.M., Lamovskaya N.V., Nizhegorodova D.B., Ivanchik G.I., Denecke B.

Differentiation and immunomodulatory properties of human mesenchymal stem cells as potential mechanisms of cardioprotective action

Anatomy

Burak G.G., Samsonova I.V., Kobets Y.G.

The variants of dislocation, topography and branching of labyrinth arteries: anatomical-clinical aspects

Internal medicine

Makarenko E.V.

Diagnosing of eradication by the level of *Helicobacter pylori* IG G antibodies in patients with duodenal ulcer

Traumatology and orthopedics

Karev D.B., Karev B.A., Boltrukevich S.I., Gorbachev A.E.

Errors and complications in the treatment of patients with medial fractures of femur

Oncology

Savitsky S.E.

Molecular-genetic and clinical aspects of hereditary breast cancer

Skin and venereal diseases

Kozina Yu.V.

Brown seaweeds extract and gel for baths in complex therapy of the patients with generalized psoriasis

Infectious and parasitic diseases

Zhiltsov I.V., Veremey I.S., Semenov V.M., Generalov I.I.

The peculiarities of beta-lactamase activity of blood serum of patients with erysipelas and pneumonia

Логвиненко С.М. Опыт организации медицинской помощи инфекционным больным в Республике Афганистан	68	Logvinenko S.M. The experience of organizing medical aid to infected patients in the Republic of Afghanistan
Иммунология и аллергология		Immunology and allergology
Янченко В.В. Выявление специфических IgE антител октапептидом, аналогом Fce рецептора	75	Yanchenko V.V. Detection of specific IgE antibodies with octapeptide analogous to Fce receptor
Фармакология		Pharmacology
Конахович И.И. Эффективность и безопасность эрадикационной терапии при эрозивно-язвенных поражениях желудка, вызванных веществами разъедающего действия	81	Konakhovich I.I. The efficacy and safety of eradication therapy in erosive-ulcerous damages of the stomach caused by corrosives
Ботаника и фармакогнозия		Botany and pharmacognosy
Дергачёва Ж.М., Гурина Н.С. Хроматографическое исследование цветков девясила высокого	89	Dergacheva Zh.M., Gurina N.S. Chromatographic investigation of Inula helenium flowers
Любаковская Л.А., Коробов Г.Д., Решетников В.Н. Закономерности динамики роста каллуса листового происхождения сирени, культивируемого на морфогенных средах	96	Lubakovskaya L.A., Korobov G.D., Reshetnikov V.N. Regularities of growth dynamics of leaf origin callus of lilac cultivated on morphogene media
Педагогика и психология высшей школы		Pedagogics and psychology of higher school
Солодков А.П., Лазуко С.С., Кулик С.П., Конева- лова Н.Ю. Проблемы биоэтики в системе медицинского образования	105	Solodkov A.P., Lazuko S.S., Kulik S.P., Koneva- lova N.Yu. Some problems of bioethics in the system of medical education
Краткие сообщения		Brief reports
Маслаков Д.А., Максимович Н.Е., Лелевич А.В., Троян Э.И. Значение реакций адаптации в патогенезе алкоголизма	113	Maslakov D.A., Maksimovich N.E., Lelevich A.V., Trojan E.I. The significance of adaptation reactions in the pathogenesis of alcoholism
Правила для авторов	116	Instructions for authors

ЦИТОКИНЫ И ОТВЕТ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

СЕРГЕЕВА С.П.

ГОУ ВПО "Московский государственный медико-стоматологический университет"

Резюме. В данной статье отражено современное научное представление об участии иммунных механизмов в развитии острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК). Группой авторов было проведено экспериментальное изучение структуры и клеточного состава тимуса крыс с разной прогностической устойчивостью к эмоциональному стрессу в условиях экспериментально моделируемого геморрагического инсульта, в ходе которого была разработана экспериментальная модель внутримозгового кровоизлияния (ВМК) у крыс. Результаты исследования позволили сделать вывод, что при геморрагическом инсульте в тимусе имеют место изменения, связанные как со стереотипным ответом на эмоциональный стресс, так и с аутоиммунными механизмами. В настоящее время планируется проведение проспективного клинического исследования, в ходе которого будут определены наиболее значимые в развитии локального и системного аутоиммунного ответа гуморальные и клеточные факторы.

Ключевые слова: острое нарушение мозгового кровообращения, цитокины, тимус, стресс.

Abstract. Modern scientific views on the role of immune mechanisms in acute stroke development are reflected in this article. Thymus structure and cell population of rats with different prognostic tolerance to emotional stress in experimental intracerebral hemorrhage (ICH) were studied. The novel model of ICH in rats was developed. The results of this study allowed us to draw a conclusion that both stereotypic and autoimmune mechanisms are involved into ICH development. At present prospective clinical study, aimed at the detection of humoral and cell factors playing the most significant role in local and systemic autoimmune response development is being planned.

Острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) – актуальная медико-социальная проблема. Частота инсультов в разных странах мира колеблется от 150 до 740 случаев на 100 000 населения. В связи со старением населения, т.е. увеличением в популяции лиц пожилого возраста, количество больных с инсультом увеличивается год от года. Высока летальность и инвалидизация [1]. Доказано, что в патогенезе ОНМК значимое место занимают иммунные

механизмы, которые все больше привлекают ученых как потенциальные мишени для терапевтического воздействия и разработки новых диагностических методов [2].

Головной мозг считается иммунологически привилегированным органом, повреждение гематоэнцефалического барьера приводит к попаданию нейроспецифических белков в кровь. В крови здоровых молодых людей свободно циркулирующие антитела к нейроантигенам выявляются сравнительно редко, частота их выявления увеличивается с возрастом, отражая появление «фоновых» деструктивных процессов гематоэнцефалического барьера и ткани мозга [3, 4]. Длительное со-

Адрес для корреспонденции: 127473, г.Москва, ул. Делегатская, д. 20/1, Московский государственный медико-стоматологический университет, e-mail: svetlanapalna@mail.ru. - Сергеева С.П.

хранение антител к нейроантигенам в крови свидетельствует о прогрессивном развитии деструктивных изменений. Проникающие в ткань мозга антитела распространяются в межклеточном пространстве и далее транспортируются аксональным током в различные клеточные структуры, инактивируя соответствующие нейроантигены, что в конечном итоге приводит к усилению повреждения нервной ткани. Аутоантитела оказывают влияние как на метаболизм нервных клеток, так и на формирование специфических функций нервной системы в целом [5].

В связи с вышеизложенным изучение состояния системы иммунитета при ОНМК является актуальной проблемой, что и явилось целью настоящего исследования.

Гематоэнцефалический барьер и аутоаллергические поражения мозга

Показано, что содержание аутоантител к мембранному белку S100 β , основному белку миелина, фактору роста нервов, фенциклидин-связывающему белку NMDA в цереброспинальной жидкости и сыворотке крови больных с ишемическим инсультом коррелировало со степенью повреждения ткани головного мозга [6, 7, 8]. Изучен уровень S100 β в крови пациентов в первые 24 часа после внутримозгового кровоизлияния: он был достоверно повышен и коррелировал с объемом гематомы, степенью неврологического дефицита, исходом. Авторы считают, что S100 β является потенциальным маркером внутримозгового кровоизлияния, с помощью которого представляется возможным определять объем гематомы [9]. Однако известно, что уровень S100 β повышается в периферической крови пациентов с ишемическим инсультом, черепно-мозговой травмой и прочими заболеваниями центральной нервной системы, сопровождающимися нарушением гематоэнцефалического барьера [10, 11, 12]. Таким образом, по нашему мнению, нейроспецифические белки можно рассматривать лишь как маркер нарушения гематоэнцефалического барьера, а их концентрация коррелирует лишь с объемом и длительностью существования данного дефекта.

Необходимо подчеркнуть сложность получения адекватной информации при определении аутоенсибилизации мозговыми антигенами, так как этот процесс зависит не только от выхода антигенов в кровь или цереброспинальную жидкость, но и от иммунного статуса организма [13].

Некоторое время назад было показано, что гистогематический барьер гораздо сильнее ограничивает проникновение молекул из крови в ЦНС, чем в обратном направлении – из ЦНС в кровь [14]. В ЦНС существуют свои антигенпредставляющие и эффекторные клетки: астроциты и интратекальные лимфоциты, составляющие относительно обособленный компонент иммунной системы. Микроглия представлена клетками, близкородственными макрофагам, имеющими особый костномозговой предшественник. Они экспрессируют антигены ГКГС 1 и 2 класса, а при стимуляции цитокинами и вирусами секретируют ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-6 и ФНО- α ; могут представлять антигены ЦНС местным интратекальным лимфоцитам и способствовать проникновению лимфоидных клеток в ЦНС, заставляя эндотелий гематоэнцефалического барьера экспонировать молекулы клеточной адгезии. Эти процессы в норме имеют умеренную интенсивность, но при их патологической активации развиваются аутоаллергические поражения мозга. Некоторые авторы высказывают мнение о том, что «забарьерность» никак не связана с наличием или срывом толерантности, а, скорее, наоборот, позволяет при нарушении толерантности к «забарьерным» антигенам не реализоваться аутоаллергическим проявлениям, но только до тех пор, пока «барьер» не нарушен [15].

Адаптивные реакции при повреждении головного мозга

В ответ на повреждение ткани головного мозга развиваются локальные и системные, специфические и неспецифические адаптивные реакции [16]. Следует отметить, что в клинической иммунологии сложилось следующее представление о проблеме специфичности: хотя все факторы, действующие в организме,

разнообразны как по своим свойствам, так и по специфичности, все они действуют коллективно, как единое целое. При этом в данной кооперации даже полностью неспецифические факторы приобретают черты высокой специфичности. Анализируя результаты исследований, Е.А. Корнева (1988) пришла к выводу, что реакции на антиген специфичны в их начале и конце, но в реализации эффекта существенная роль принадлежит неспецифическим реакциям [17]. Соотношение специфических приспособительных реакций и неспецифической общесистемной активации в каждом конкретном случае может сильно различаться. Ш.Т. Аветикян и соавторы (1982) указывают, что оно, в частности, определяется индивидуально-типологическими особенностями адаптации [18]. Установлены основные типы индивидуально-типологических реакций: 1) адаптивный тип, для которого характерны либо эффективная реактивность специфической функциональной системы и неспецифическая ареактивность, либо, наоборот, относительная ареактивность специфической адаптивной системы с неспецифической реактивностью; 2) неадаптивный тип, для которого характерны как специфическая, так и неспецифическая ареактивность. Основоположник учения о стрессе Г.Селье в качестве ведущего патогенетического звена рассматривал систему “гипоталамус-передняя доля гипофиза-кора надпочечников”. Под влиянием гормонов гипофиза и надпочечников, согласно Селье, формируется неспецифический адаптационный синдром, характеризующийся гипертрофией надпочечников, инволюцией тимуса и лимфатических узлов, а также язвенными поражениями желудочно-кишечного тракта [19]. В своих работах К.В.Судаков и соавт. показали, что в однотипных условиях экспериментов, вызывающих у животных эмоциональный стресс, выявляются особи либо устойчивые, либо предрасположенные к нарушению различных физиологических функций [20]. Стресс-реакция – неспецифический компонент реакции адаптации, обеспечивающий привлечение энергетических и пластических резервов для осуществления специфической адаптационной перестройки систем организ-

ма [21]. Следовательно, в ответ на ОНМК мы вправе ожидать проявления стресс-реакции, что было показано в наших работах.

Состояние системы иммунитета при ОНМК

Совместно с Е.В. Коплик было проведено экспериментальное изучение структуры и клеточного состава тимуса крыс с разной прогностической устойчивостью к эмоциональному стрессу в условиях экспериментально моделируемого внутримозгового кровоизлияния (ВМК) [22]. В результате проведенных исследований разработана экспериментальная модель ВМК у крыс. При использовании этой модели показано, что индивидуальные особенности поведения, характеризующие различную прогностическую устойчивость крыс к эмоциональному стрессу, существенно влияют на выраженность неврологической симптоматики при ВМК. Прогностически устойчивые к эмоциональному стрессу животные характеризуются, по сравнению со стресс-предрасположенными животными, более высоким уровнем восстановления неврологического статуса к 7-м суткам после ВМК.

Анализ функционального состояния центральной нервной системы, а также оценка двигательных и координаторных нарушений после ВМК у крыс, перенесших 24-х часовое стрессорное воздействие, показал, что положительная динамика этих показателей в большей степени отмечалась у устойчивых к стрессу по сравнению со стресс-предрасположенными животными.

Экспериментальное ВМК, как показало исследование весовых коэффициентов органов стресс-маркеров (тимуса и надпочечников), само по себе является стрессорным воздействием, причем прогностически устойчивые к эмоциональному стрессу (ЭС) животные реагируют с меньшим изменением весовых показателей тимуса, но не надпочечников, по сравнению с прогностически предрасположенными к ЭС крысами.

Анализ весовых коэффициентов органов стресс-маркеров у крыс, перенесших стрессорное воздействие перед ВМК, показал, что у

прогностически устойчивых к ЭС животных не отмечалось достоверных изменений весовых коэффициентов надпочечников, однако достоверно снижался вес тимуса. У предрасположенных к ЭС крыс наблюдалось достоверное изменение веса надпочечников и тимуса на протяжении 7 суток эксперимента.

Изучение тимуса 80 крыс-самцов Вистар показало, что через 1, 3 и 7 суток после операции по моделированию геморрагического инсульта крысы, предрасположенные к эмоциональному стрессу, реагируют более выраженными изменениями, чем устойчивые к стрессу. Плотность расположения клеточных элементов на единице площади мозгового вещества гистологического среза тимуса достоверно уменьшается в динамике по сравнению с контрольными группами животных, тогда как коркового – увеличивается, причем не отмечено достоверных изменений в содержании соединительной ткани и тимических телец. Установлено, что на величину изменений как коркового, так и мозгового вещества достоверно влияет устойчивость к эмоциональному стрессу и время до выведения из эксперимента ($p < 0.05$). В мозговом веществе отмечено значительное увеличение площади, занимаемой на срезе сосудами. При изучении динамики изменений содержания клеточных элементов в мозговом, корковом веществе и подкапсулярной зоне тимуса выявлено достоверное снижение числа малых лимфоцитов, наиболее выраженное в подкапсулярной зоне и корковом веществе через 72 часа у предрасположенных к эмоциональному стрессу животных. Не прослеживается достоверно значимых изменений содержания бластов, больших лимфоцитов и клеток с картинами митоза, при этом в мозговом веществе устойчивых к эмоциональному стрессу крыс отмечается увеличение содержания деструктивно измененных клеток. При изучении характера клеточных процессов установлено, что после экспериментального геморрагического инсульта происходит подавление лимфоцитопоза, усиление процессов распада клеток и макрофагальной реакции, нарастает число плазматических и тучных клеток. Ярко выражена сосудистая реакция в виде периваскулярного отека, набу-

хания эндотелия стенок сосудов. Результаты исследований позволили сделать вывод, что при внутримозговом кровоизлиянии в тимусе имеют место изменения, связанные как со стереотипным ответом на эмоциональный стресс, так и с аутоиммунными механизмами.

Определенное место в патогенезе геморрагического инсульта занимают неспецифические адаптивные реакции, развивающиеся за счет активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы – так называемый адаптационный, или стресс-синдром [19]. В частности, они выражаются в иммуносупрессии, за счет ослабления Т-клеточного звена иммунитета [23]. Можно выделить три основных механизма. Во-первых, глюкокортикоиды тормозят деление предшественников Т-лимфоцитов в профазе митоза в тимусе; во-вторых, ФНО- α , уровень которого повышается после развития ОНМК, через повышение секреции адренокортикотропного гормона приводит к повышенной секреции глюкокортикоидов. Известно также, что в зависимости от присутствия тех или иных цитокинов ФНО- α может непосредственно контролировать пролиферацию Т-лимфоцитов в тимусе [24] (рисунк). Такая иммуносупрессия способствует развитию инфекционных осложнений. Ряд ученых после анализа результатов экспериментов на животных пришли к мысли о проведении профилактической антибиотикотерапии, что пока не нашло применения в практике [25].

Участие аутоиммунных реакций в формировании трофической дисфункции и повреждении ткани мозга при церебральной ишемии было показано в работе [26]. Авторы пришли к выводу, что ответ иммунной системы, т.е. сенситизация или толерантность, на нарушение гематоэнцефалического барьера и попадание в кровь нейроспецифических белков зависит от наличия в организме инфекционного агента, развития системного иммунного ответа, что сопровождается повышением в периферической крови пациентов, в том числе, уровня ИНФ- γ . В этом случае происходят специфические изменения в микроокружении мозга, лимфоидной ткани, например экспрессия провоспалительных цитокинов,

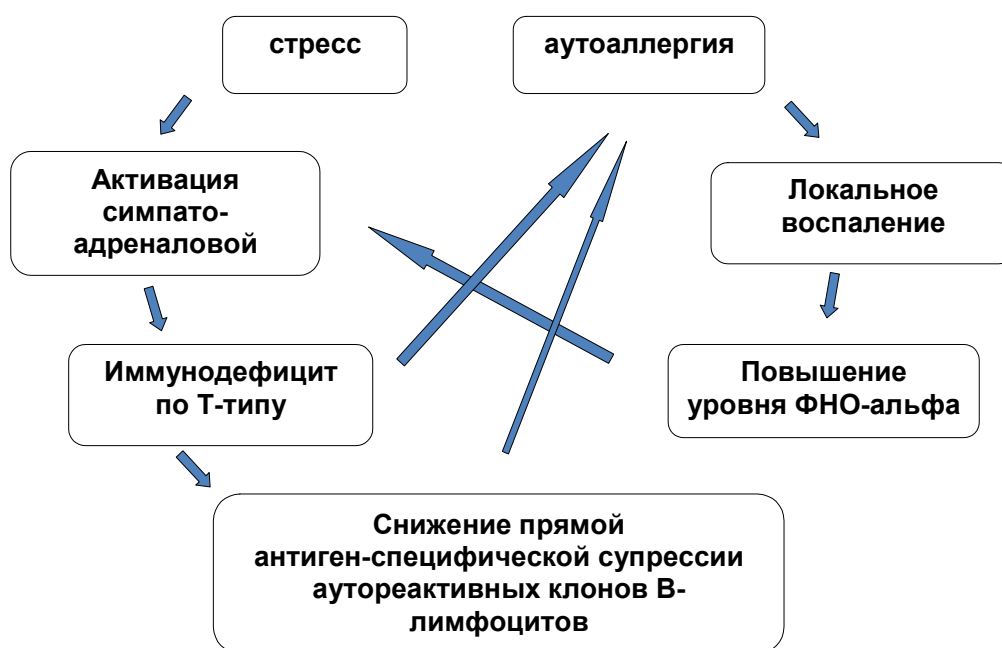


Рисунок. Срыв ауто толерантности вследствие иммуносупрессии за счет ослабления Т-клеточного звена иммунитета.

антигенов главного комплекса гистосовместимости, что приводит к сенситизации иммунной системы к ткани мозга и развитию аутоиммунных реакций при последующих нарушениях гематоэнцефалического барьера. Вызванная ОНМК иммуносупрессия при таком развитии событий играет положительную роль, ослабляя агрессию иммунной системы.

В исследованиях на мышах с экспериментально моделируемым ишемическим инсультом путем перевязки средней мозговой артерии в отсутствии инфекционных осложнений при введении в первые 24 часа после операции poly-ΥЕ вещества, модулирующего Т-клеточный ответ, было получено уменьшение неврологического дефицита и поведенческих нарушений, что свидетельствует в пользу участия Т-клеточного звена и в отсутствии системного иммунного ответа на инфекционный агент [27].

В то же время, наличие неврологического дефицита влияет на функционирование иммунной системы. В результате сравнения выраженности реакции на внутрикожное введение туберкулина у пациентов в остром периоде инсульта ученые выявили так называемую

«латерализацию» Т-клеточного ответа, которая зависит от локализации и размеров очага в головном мозге, моторного дефицита и нарушения симпатической активности [28].

О другом механизме развития иммунных процессов в мозге после ОНМК говорят Feng-Shiun Shie и соавт. [29]. Авторы предположили, что оксигенированные липопротеиды низкой плотности (oxLDL), которые образуются в результате оксидантного стресса, присутствуют в глиальных клетках и влияют на развитие и исход ОНМК. Результаты исследований подтвердили их предположение, что oxLDL попадают в астроциты в подостром периоде ОНМК и стимулируют продукцию ИЛ-6, таким образом активируя иммунный ответ. В другом, более раннем исследовании было показано, что продукция ИЛ-6 астроцитами способствует продукции провоспалительных цитокинов ФНО-α и ИЛ-β [30]. Другой группой ученых на нокаутных по гену ИЛ-6 мышах было установлено, что в остром периоде ОНМК (первые 24 часа) ИЛ-6 не имеет прямой связи с объемом поврежденной ткани [31].

При исследовании содержания ФНО-α, ИЛ-6 и молекул межклеточной адгезии-1 у

пациентов с лакунарным инсультом установлено, что их повышенный уровень в крови связан с ранними неврологическими осложнениями и плохим исходом. При этом из анализа концентраций глутамата и ГАМК в крови у тех же пациентов видно, что воспалительные изменения вносят более значительный вклад в патогенез, чем эксайтотоксичность. В то же время, имеется значительная корреляция между концентрацией нейромедиаторов и провоспалительных цитокинов в крови, что может свидетельствовать в пользу их синергии [32]. Эта гипотеза подтверждается экспериментальными данными о вызываемом цитокинами, в частности ФНО- α , глутаматном эксайтотоксическом каскаде в культуре эмбриональной нервной ткани, который блокировался введением анти-ФНО- α -антител и антагонистов НМДА-рецепторов [33]. Исследования на животных также показали, что введение моноклональных антител против ФНО- α уменьшает объем поврежденной нервной ткани, в том числе за счет уменьшения отека [34].

Е. Tarkowski [28], а позднее N.Vila и соавторами [35, 36] было показано, что ИЛ-6 и ИЛ-1 участвуют в локальном воспалении в ответ на повреждение ткани мозга и могут быть использованы для оценки тяжести этого повреждения и размера очага.

Заключение

Из анализа литературы следует, что нельзя недооценивать вклад иммунной системы в развитие и исход ОНМК. Выявлено множество механизмов, но не сформулировано общей концепции, которая позволит медицине, балансируя на грани между иммунодефицитом и аутоагрессией к ткани мозга, вмешаться в тонкие иммунонейрохимические процессы и остановить разрушение нервной ткани как в остром периоде ОНМК, так и при отсроченных осложнениях, таких, как постинсультные когнитивные нарушения, достигающие у многих пациентов до степени деменции. Перспективным представляется также направление диагностики ОНМК, основанной на изменении параметров иммунной системы.

Литература

1. О состоянии медицинской помощи больным с нарушениями мозгового кровообращения / Яхно Н.Н., Валенкова В.А. // Неврологический журнал. - 1999. - Т. 4, N 4. - С. 44-46.
2. Immunomodulation Strategies for Preventing Vascular Disease of the Brain and Heart / Hallenbeck J. [et al.] // Stroke. - 2006. - N 37. - P. 3035-3042.
3. Ишемия головного мозга / Гусев Е.И., Скворцова В.И. - М.: Медицина, 2001. - 328 с.
4. Мозг как орган иммунитета / Малашиха Ю.А. [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. - 1999. - N 9. - С. 62-65.
5. Моноклональные антитела в нейробиологии / Чехонин В.П. [и др.] - Новосибирск, 1995. - С. 160-170.
6. Blood Test Detecting Autoantibodies to N-Methyl-D-aspartate Neuroreceptors for Evaluation of Patients with Transient Ischemic Attack and Stroke / Dambinova S.A., Khounteev G.A. // Clinical Chemistry. - 2003. - N 10. - P. 1752 - 1762.
7. Novel Diagnostic Test for Acute Stroke / Lynch J. [et al.] // Stroke. - 2004. - N 35. - P. 57-63.
8. Структурные нейроспецифические белки (S100B и основной белок миелина) и аутоантитела к ним как маркеры нейроиммунопатологических реакций при ишемической болезни головного мозга / Скворцова В.И. [и др.] // В кн.: Новые технологии в неврологии и нейрохирургии на рубеже тысячелетий. - Ступино, 1999. - С. 180-181.
9. Plasma S100B Level After Acute Spontaneous Intracerebral Hemorrhage / Delgado P., Sabin J. // Stroke. - 2006. - N 37. - P. 2837-2839.
10. Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury / Vos P. [et al.] // Neurology. - 2004. - N 62. - P. 1303-1310.
11. Evaluation of serum S100B as a surrogate marker for long-term outcome and infarct volume in acute middle cerebral artery infarction / Foerch C. [et al.] // Archive Neurology. - 2005. - N 62. - P. 1130-1134.
12. Release of neurobiochemical markers of brain damage is related to the neurovascular status on admission and the site of arterial occlusion in acute ischemic stroke / Wunderlich M. [et al.] // Journal of Neurological Science. - 2004. - N 227. - P. 49-53.
13. Специфические белки нервной ткани / Березин В.Ф. - Киев, 1990. - С. 45-50.
14. Antibodies to brain antigens following stroke / Bornstein N. // Neurology. - 2001. - N 56. - P. 529-530.
15. Иммунология и иммунопатология / Васильев А.Г., Чурилов Л.П. - СПб, 2006. - С. 124-138.
16. Клиническая нейроиммунология хирургических заболеваний головного мозга / Старченко А.А. - СПб, 2001. - С. 14-15.
17. Иммунофизиология как новое научное направление: предпосылки и история развития / Корнева Е.А. - СПб.: Наука, 1993. - С. 11-37.
18. О типологической систематизации адаптивных реакций (на примере антиортостатического воздей-

- ствия) / Аветикян Ш.Т. [и др.] // Физиология человека. – 1982. – Т. 8, N 1. – С. 132-137.
19. Очерки об адаптационном синдроме / Селье Г. // Пер. с англ. – М., 1960. – 115 с.
20. Прогностические поведенческие критерии и особенности мозгового кровотока у крыс с различной устойчивостью к эмоциональному стрессу / Коплик Е.В. // Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1995. – Т. 81, N 9. – С. 35-39.
21. Индивидуальная устойчивость к эмоциональному стрессу / Судаков К.В. – М., 1998. – 243 с.
22. Цитоархитектоника тимуса прогностически устойчивых к эмоциональному стрессу крыс при геморрагическом инсульте в эксперименте / Ерофеева Л.М., Сергеева С.П.. // Морфология: материалы научно-практической конференции «Современные аспекты гистогенеза и вопросы преподавания гистологии в вузе». – 2007. – N 3. – С. 91.
23. Stroke-Induced Immunodepression / Dirnagl U. [et al.] // Stroke. – 2007. – N 38. – P. 770-773.
24. TNF Regulates Thymocyte Production by Apoptosis and Proliferation of the Triple Negative (CD3-CD4-CD8) Subset / Baseta J., Stutman O. // The Journal of Immunology. – 2000. – N 165. – P. 5621-5630.
25. Preventive Antibacterial Treatment Improves the General Medical and Neurological Outcome in a Mouse Model of Stroke / Meisel C., Prass K. // Stroke. – 2004. – N 35. – P. 2-6.
26. Lymphocytes. Potential Mediators of Postischemic Injury and Neuroprotection / Michael J. [et al.] // Stroke. – 2007. – N 38. – P. 783-788.
27. A Novel Immune-Based Therapy for Stroke Induces Neuroprotection and Supports Neurogenesis / Ziv Y. [et al.] // Stroke. – 2007. – N 38. – P.774-782.
28. Lateralization of T-Lymphocyte Responses in Patients With Stroke / Tarkowski E. [et al.] // Stroke. – 1996. – N 26. – P. 57-62.
29. Oxidized Low-Density Lipoprotein Is Present in Astrocytes Surrounding Cerebral Infarcts and Stimulates Astrocyte Interleukin-6 Secretion / Shie F. [et al.] // American Journal of Pathology. – 2004. – Vol. 164, N 4. – P. 1173 – 1181.
30. Interleukin-6 (IL-6) Production by Astrocytes: Autocrine Regulation by IL-6 and the Soluble IL-6 Receptor / Nicholas J. [et al.] // The Journal of Neuroscience. – 1999. – Vol. 19, N 13. – P. 5236–5244.
31. Lack of Interleukin-6 Expression Is Not Protective Against Focal Central Nervous System Ischemia / Clark W. [et al.] // Stroke. – 2000. – N 31. – P. 1715-1720.
32. Inflammation-Mediated Damage in Progressing Lacunar Infarctions / Castellanos M. [et al.] // Stroke. – 2002. – N 33. – P. 982-987.
33. Tumor necrosis factor-alpha potentiates glutamate neurotoxicity in human fetal brain cell cultures / Chao C., Hu S. // Development Neuroscience. – 1994. – N 16. – P. 172–179.
34. Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia / Hosomi N. [et al.] // Journal Cerebral Blood Flow Metabolism. – 2005. – N 25. – P. 959–967.
35. Proinflammatory Cytokines and Early Neurological Worsening in Ischemic Stroke / Vila N., Castillo J. // Stroke. – 2000. – N 31. – P. 2325-2329.
36. Levels of Anti-Inflammatory Cytokines and Neurological Worsening in Acute Ischemic Stroke / Vila N. [et al.] // Stroke. – 2003. – March. – P. 671-675.

Поступила 25.02.2009 г.
Принята в печать 02.03.2009 г.

ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

ХУЛУП Г.Я.*, МАСТИЦКАЯ С.Ю.*, ЗАФРАНСКАЯ М.М.*, ЛАМОВСКАЯ Н.В.*, НИЖЕГОРОВА Д.Б.*,
ИВАНЧИК Г.И.*, ДЕНЕКЕ Б.**

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»*,
Междисциплинарный центр клинических исследований (IZKF) "BioMAT", Технический университет
земли Северный Рейн-Вестфалия (RWTH-Aachen) **

Резюме. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются перспективной клеточной популяцией для регенерации ишемических повреждений миокарда. В работе приведены результаты анализа эффективности протоколов кардиомиогенной дифференцировки МСК *in vitro*, а также информационно-аналитический обзор литературных данных по иммуномодулирующим и секреторным свойствам клеток. Показано, что, несмотря на значительную пластичность МСК костного мозга и способность подвергаться частичной дифференцировке в кардиомиоцит-подобные клетки при манипуляциях *in vitro*, данные клетки не приобретают функциональные характеристики полноценных кардиомиоцитов. Механизмы положительного эффекта трансплантации МСК на регенерацию миокарда могут быть связаны с их влиянием на процессы ремоделирования и ангиогенеза вследствие секреции противовоспалительных цитокинов, трофических и ростовых факторов.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, кардиоспецифическая дифференцировка *in vitro*, иммуносупрессия.

Abstract. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) are a promising cell population for regenerative therapy of ischemic heart disease. In our study we have analyzed different published protocols of cardiac differentiation of hMSCs. The comprehensive review of MSCs immunomodulatory properties and ability to produce growth factors is given. We found that hMSCs do not generate functionally active cardiomyocytes *in vitro*, although the cells demonstrate high plasticity and respond to induction of the cardiac differentiation pathways in the way of stochastic increase of certain cardiac-specific genes' expression. It seems that the beneficial effects of MSCs transplantation in infarcted heart are mediated by their contribution to angiogenesis and remodelling processes and anti-inflammatory cytokines and growth factors production rather than by cardiac differentiation.

Пластичность и низкая иммуногенность мезенхимальных стволовых клеток (МСК), легкость в получении и наращивании количества клеток *in vitro* обуславливают большой интерес к изучению возможностей применения МСК в клеточно-опосредованной регенерации тканей, в частности, в

клеточной кардиомиопластике [1-4]. Экспериментальные работы и клинические испытания показали положительный эффект трансплантации МСК при инфаркте миокарда [1, 5-8]. Механизмы положительного действия, предположительно, связаны с дифференцировкой МСК в кардиомиоциты и, как следствие, пластической функцией клеток, а также с противовоспалительным действием МСК, продукцией факторов роста и противоапоптотичес-

Адрес для корреспонденции: 2220013, г. Минск, ул. Бровки, 3/3, тел. (8-017) 2653356, (8-029) 7781579, e-mail: s_mastitskaya@yahoo.com. - Маслицкая С.Ю.

ких цитокинов. Тем не менее, в последние годы появляются работы, опровергающие данные о способности МСК к трансдифференцировке в кардиомиоциты [9, 10]. Несмотря на множество работ по направленной кардиомиогенной дифференцировке МСК *in vitro*, результаты данных исследований являются зачастую противоречивыми и невоспроизводимыми [5, 7, 11-13]. Таким образом, механизм положительного действия трансплантированных МСК на последствия инфаркта миокарда остается нераскрытым. Цель работы – осветить биологические свойства МСК, лежащие в основе их кардиопротекторного действия и оценить потенциал МСК к дифференцировке в функционально активные кардиомиоциты *in vitro*.

Методы

Выделение и культивирование МСК. Для выделения МСК из КМ пунктат КМ с добавлением равного объема фосфатного буфера Дюльбекко наслаивали на градиент плотности Lymphoflot (Sigma). После центрифугирования моноклеары отмывали двукратно, полученные клетки ресуспендировали в полной питательной среде (DMEM, 10% ЭТС, 100 U/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамин) и засевали в культуральные чашки. Клетки культивировали при 37°C в 5% CO₂ и 20% O₂ атмосфере, смену среды производили каждые 3-4 дня.

Направленная кардиомиогенная дифференцировка МСК. МСК культивировали в дифференцировочном коктейле, включающем 60% DMEM-LG, 28% MCDB-201 (Sigma, Германия), 10% FCS (PAA Laboratories, Linz, Австрия), 1mg/ml бычьего инсулина, 0.55mg/ml человеческого трансферрина, 0.5µg/ml селенита натрия, 50mg/ml бычьего сывороточного альбумина, 0.47µg/ml линолевой кислоты, 0,1mM аскорбиновой кислоты, 1nM дексаметазона (все компоненты производства Sigma, Германия), 100U/ml пенициллина G, 100µg стрептомицина (PAA Laboratories, Linz, Австрия) или в среде IMDM (Sigma, Германия) с добавлением 10% FCS, 100U/ml пенициллина G, 100µg стрептомицина (PAA Laboratories, Linz, Авст-

рия), 1% незаменимых аминокислот (NEAA), 0,1% β-меркаптоэтанола. Трехмерное культивирование МСК в дифференцировочных средах по принципу висящих капель проводили, как описано ранее [14]. Для выяснения роли деметилирования ДНК и деацетилирования гистонов в индукции кардиомиогенной дифференцировки МСК клетки культивировали в присутствии 5-азацитидина и трихостатина А в концентрациях 1 µM и 0,1 µM соответственно на протяжении 10 суток. Для получения совместной культуры МСК с Cor.AT клетками МСК 2-го пассажа и мышинные кардиомиоциты предсердий (Cor.AT® клетки, AXIOGENESIS AG: www.axiogenesis.com) были посеяны в лунки 48-луночного планшета в соотношении 5000:3000. Клетки культивировали в среде CorAT® (AXIOGENESIS AG).

Иммунофлуоресцентные исследования. Для характеристики клеток в иммунофлуоресцентных исследованиях были использованы моноклональные антитела к сердечному тропонину I (Abcam), тяжелой цепи миозина (Upstate), коннексину-43 (Alpha Diagnostic), Nkx2.5 (Dako), GATA4 (Santa Cruz), миоглобину (Dako), актину гладкой мускулатуры (Dako), CD44 (Beckton Dickinson), а также вторые антитела, конъюгированные с флюорохромом Alexa Fluor-546 (Molecular Probes, Göttingen, Германия).

Обратная транскрипция и ПЦР. Общую РНК выделяли из культур клеток с помощью набора RNeasy Kit (QUAGEN, Германия). РНК миокарда человека использовали в качестве положительного контроля. Для получения кДНК из общей РНК (обратной транскрипции) был использован набор реагентов Superscript III (Invitrogen, Канада). Для характеристики клеток применяли праймеры к следующим кардиоспецифическим маркерам: тяжелая цепь миозина MYH7B (5'-AGCAGAAGCGCAACGCAGAGT-3', 5'-TGCTGCACCTTGCGGAACCTTG-3'), транскрипционные факторы Mef2A (5'-GCAGCAGCACCCACCTAGGAC-3', 5'-CTGCTGCTGCTGCTGGAAG-3'), Mef2D (5'-TGCCCACTGCCTACAACACAG-3', 5'-GGACACCGGTTCTGACTTGATG-3') и

Nkx2.5 (5'-CAAGGACCCTAGAGCCGAAAAG-3', 5'-CCTGCGTGGACGTGAGTTTC-3'). Поставлена 40-цикловая программа ПЦР с использованием *Taq*-полимеразы (Promega, США). Каждый цикл ПЦР состоял из процесса денатурации в течение 60 секунд при 99°C, отжига праймеров при температуре 58 или 60°C в течение 2 мин и экстензии при 71°C в течение 2 мин. Полученные ДНК-продукты были фракционированы по размеру с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле.

Статистический анализ данных. Результаты определения экспрессии генов MYH7B, Nkx2.5, MEF2A и MEF2D с помощью ПЦР-анализа были выражены в баллах от 0 до 4 в соответствии с интенсивностью свечения ДНК-продукта в агарозном геле. Полученные данные были подвергнуты кластерному анализу. В качестве меры сходства между культурами использовано Евклидово расстояние. Кластерный анализ по алгоритму «среднее присоединение» выполнен с помощью программы PRIMER 6 (PRIMER-E Ltd., 2006) [15].

Характеристика МСК

Стромальные клетки костного мозга были впервые описаны Фриденштейном как фибробластоподобная популяция моноклеарных клеток ККМ, обладающих адгезивными свойствами и способностью к дифференцировке в остециты [16]. Впоследствии было показано, что данные клетки дифференцируются также в различные другие мезодермальные клеточные линии, в том числе хондроциты, теноциты и миобласты, и благодаря этому свойству был введен термин «мезенхимальные стволовые клетки» [17]. Подобные клетки были также обнаружены и в других тканях, в том числе жировой ткани, плаценте, амниотической жидкости, фетальных тканях и пуповинной крови. Выделенные и культивируемые *in vitro* МСК экспрессируют ряд поверхностных маркеров: CD105 (SH2, или эндоглин), CD73 (SH3 или SH4), CD90, CD166, CD44 и CD29 [2] и являются негативными по маркерам гемопоэтических и эндотелиальных клеток CD11b, CD14, CD31 и CD45 [2]. В настоящее время не существует специфического

маркера, который позволяет выделить чистую популяцию МСК из ККМ, и методы получения МСК основаны на адгезии их к культуральному пластику. В результате получаемая культура клеток является гетерогенной, а дифференцировочные и иммуномодулирующие свойства культур МСК могут значительно варьировать в разных исследованиях.

Кардиомиогенный потенциал МСК *in vivo* и *in vitro*

Начиная с 1999 года, когда Makino et al. [12] впервые показали, что обработка МСК 5-азациитидином приводит к дифференцировке их в кардиомиоцит-подобные клетки, способные спонтанно сокращаться в культуре, было опубликовано множество работ, посвященных кардиомиогенной дифференцировке МСК. Было показано, что МСК костного мозга могут дифференцироваться в кардиомиоцит-подобные клетки *in vitro* под действием целого ряда факторов – ростовых факторов TGF β 1, ILGF, PDGF, bFGF, неспецифических индукторов дифференцировки (динорфина В, инсулина, аскорбиновой, ретиноевой кислот, 5-азациитидина и др.) [7].

На нескольких экспериментальных моделях инфаркта миокарда была доказана регенерация ткани и улучшение функционального состояния миокарда после трансплантации МСК костного мозга. В исследовании Tomita et al. показано, что клетки, предварительно обработанные 5-азациитидином, успешно интегрировались в ткань миокарда и были способны к полноценной дифференцировке в кардиомиоциты в модели криодеструкции ткани миокарда у крыс [7]. В двух других исследованиях без использования 5-азациитидина показано, что МСК приобретают фенотип дифференцированных кардиомиоцитов при непосредственной их трансплантации в неповрежденный миокард крыс под действием факторов микроокружения [20, 21]. Тем не менее, даже при условии трансплантации большого количества МСК, число прижившихся клеток было чрезвычайно низким. Результатом аутологичной трансплантации МСК после модели ишемии-реперфузии миокарда у свиней

было улучшение функции левого желудочка [22], интракоронарная доставка МСК в сердца здоровых собак в другом исследовании, напротив, приводила к острой ишемии миокарда и подострому микроинфаркту миокарда [23]. В работе Yoon et al. [24] трансплантация клеток нефракционированного костного мозга вызывала значительную интрамиокардиальную кальцификацию, вероятно, вследствие спонтанной дифференцировки МСК в остециты.

Направленная дифференцировка МСК в кардиомиоциты *in vitro*

На основе анализа мирового опыта по направленной дифференцировке МСК в кардиомиоциты *in vitro* нами было проведено комплексное исследование кардиомиогенных дифференцировочных свойств МСК с целью разработки наиболее эффективного протокола. Были охвачены все принципиальные направления, включая использование ростовых факторов, химических индукторов дифференцировки, биоматериалов подложки, методик совместного культивирования с кардиомиоцитами, условий двух- и трехмерного культивирования. Кроме того, было изучено влияние 5-азациитидина и трихостатина А в сочетании с упомянутыми методиками на степень трансдифференцировки МСК в кардиомиоциты.

5-азациитидин – деметилирующий агент, вещество, применяемое в ряде опубликованных работ для увеличения дифференцировочного потенциала МСК [7, 12, 25]. Физиологически, стволовые клетки взрослого организма находятся в состоянии покоя в норме и участвуют в процессах репарации и дифференцировки лишь под воздействием определенных стимулов – при повреждении тканей, воспалительных процессах. Гиперметилирование ДНК и плотная упаковка хроматина посредством деацетилирования гистонов (низкомолекулярные белки, связанные с ДНК) являются важными механизмами репрессии активности некоторых генов в стволовых клетках [12, 26-28]. Для активации механизмов спонтанной дифференцировки МСК, в дополнение к дифференцировочным протоколам, мы

использовали комбинацию веществ 5-азациитидина (оказывает деметилирующее действие на ДНК) и трихостатина А (ингибитор деацетилаз). В результате выявлялась спонтанная активация экспрессии кардиоспецифических генов в МСК как следствие процессов деметилирования и ацетилирования, но не происходило значимого увеличения эффективности применяемых дифференцировочных протоколов. Не наблюдались поперечная исчерченность клеток и их спонтанная сократительная активность, которые характерны для кардиомиоцитов. Результаты наших исследований не согласуются с результатами, полученными Makino et al. [12] и Nassiri et al. [25], что может быть обусловлено стохастическими эффектами обработки клеток 5-азациитидином, зависящими от таких факторов, как состояние донора клеток, источник получения клеток, методы выделения и первичной обработки клеток и т.п. В другом исследовании Shiota et al. показали, что обработанные 5-азациитидином МСК приобретают кардиомиогенный потенциал только при условии применения специальной трехэтапной методики выделения, включающей формирование сфер [29]. На 21-й день после обработки 5-азациитидином в такой культуре МСК авторы наблюдали одиночные шарообразные сокращающиеся клетки [29]. При последующей трансплантации клеток, обработанных 5-азациитидином, в миокард мышей после инфаркта только незначительная доля МСК интегрировались в ткань миокарда как полноценные кардиомиоциты (менее 0,001% от всех трансплантированных клеток) [29], что является дополнительным доказательством того, что положительный эффект МСК не может быть исключительно следствием их кардиомиогенного потенциала.

При проведении сравнительного анализа эффективности кардиомиогенных дифференцировочных сред с использованием химических индукторов дифференцировки, а также в среде IMDM в двух- и трехмерной культуре нами показано, что трехмерное культивирование в присутствии комбинации индукторов дифференцировки инсулина (1mg/ml), дексаметазона (1nM) и аскорбиновой кислоты (0,1mM) является наиболее перспективной

технологией направленной дифференцировки МСК в кардиомиоцит-подобные клетки. Такие клетки демонстрировали повышенный уровень экспрессии кардиоспецифических маркеров – генов транскрипционного фактора Nkx2.5 и тяжелой цепи миозина (MYH7B) по сравнению с клетками, культивируемыми в других дифференцировочных средах ($P=0,036$, дисперсионный анализ сходства). При исследовании дифференцировки культур МСК в динамике, а также при пересеве культур установлено, что экспрессия генов кардиоспецифических белков и транскрипционных факторов мезенхимальными стволовыми клетками в протоколах направленной дифференцировки *in vitro* носит временный характер (увеличивается на 15-сутки культивирования в дифференцировочной среде и достоверно понижается к 27-м суткам; $P = 0,01$, дисперсионный анализ сходства).

Внеклеточный матрикс выполняет множество физиологических функций в процессах роста и дифференцировки клеток, поэтому биоматериалы, структурно и молекулярно воссоздающие микроокружение терапевтической ткани-мишени, активно используются при разработке протоколов направленной дифференцировки стволовых клеток. Мы изучили ряд трехмерных гелеобразных биополимеров в качестве культуральной системы для дифференцировки МСК в кардиомиоциты на основе анализа их биологической совместимости с МСК (в качестве критериев использованы цитотоксичность биоматериала, морфология, жизнеспособность, апоптоз и пролиферация клеток) [30]: Resomer® RG 503 (poly(D,L-lactid-co-glycolic acid)), Коллаген, PCL (polycaprolactone), Texin® 950 (ароматический термопластический полиуретан на основе полиэстера), PEA C (polyesteramide type C) (German Wool Research Institute RWTH, Aachen, Германия). Наиболее эффективными в качестве подложки для культивирования клеток в протоколе кардиомиогенной дифференцировки МСК оказались Resomer® RG 503 и Texin® 950. Именно при культивировании на данных биоматериалах в МСК наблюдалась максимальная экспрессия кардиоспецифических генов MYH7B, Nkx2.5 и MEF2D ($P = 0,05$, дисперсионный анализ сходства).

Для выяснения критической роли факторов тканевого микроокружения (локальная продукция цитокинов и факторов роста, а также непосредственные межклеточные контакты и электромеханическое взаимодействие с резидентными кардиомиоцитами) в кардиомиогенной дифференцировке МСК была использована методика совместного культивирования МСК с мышинными атриовентрикулярными кардиомиоцитами (Cor.AT® клетки).

Иммунофлуоресцентные исследования не выявили увеличения экспрессии кардиоспецифических маркеров человеческими МСК при совместном культивировании с кардиомиоцитами. В отличие от результатов исследований M. Xu et al. [31], которые исследовали совместные культуры мышинных стромальных клеток ККМ и крысиных неонатальных кардиомиоцитов, в нашем эксперименте МСК человека не формировали щелевых контактов с кардиомиоцитами при совместном культивировании.

Экспрессия транскрипционного фактора GATA4 была значительно выше в МСК, чем в Cor.AT клетках, в то время как интенсивность свечения ядер кардиомиоцитов при окраске моноклональными антителами к Nkx2.5 была значительно выше, чем ядер МСК. Экспрессия миоцит-специфического маркера миоглобина была высокой во всех МСК, однако только в некоторых отдельных клетках, находящихся в непосредственном контакте с Cor.AT кардиомиоцитами, наблюдался организованный паттерн структурного распределения белка в цитоплазме. Кардиоспецифический белок тропонин I с четкой внутриклеточной структурной организацией экспрессировался в Cor.AT кардиомиоцитах, но имел диффузное распределение в человеческих МСК. Экспрессия тяжелой цепи миозина также не была характерной для МСК – иммунофлуоресцентный анализ выявил диффузное распределение данного протеина в МСК без характерной для кардиомиоцитов структурной организации. Все МСК демонстрировали высокий уровень экспрессии лимфоцитарного дифференцировочного антигена CD44. В то же время, кардиомиоциты были негативны по данному маркеру, что служит дополнительным доказатель-

ством отсутствия полноценной трансдифференцировки МСК в клетки миокарда.

Таким образом, несмотря на высокую экспрессию кардиоспецифических генов МСК при совместном культивировании с кардиомиоцитами, полноценная трансдифференцировка МСК не была достигнута. По результатам собственных исследований, а также анализа современных публикаций, посвященных данной теме, мы приходим к выводу о том, что невозможно добиться полноценной кардиомиогенной дифференцировки МСК, несмотря на их высокую пластичность, которая в данном случае выражается в виде стохастического увеличения экспрессии кардиоспецифических генов в ответ на индукцию кардиомиогенных путей дифференцировки *in vitro*.

Иммуномодулирующие и секреторные свойства МСК

На сегодняшний день опубликовано множество работ, посвященных изучению антиапоптотического, противовоспалительного, проангиогенного действия МСК в процессах ремоделирования миокарда после инфаркта. МСК оказывают локальное иммуномодулирующее действие, супрессируя активность широкого спектра клеток иммунной системы, в том числе НК-клеток, В-лимфоцитов, естественных киллеров и антиген-презентирующих клеток. Трансплантация МСК в перинфарктную зону снижает экспрессию генов и продукцию провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6. Такой же эффект наблюдается и в отношении матриксной металлопротеиназы-1 (MMP-1) и тканевого ингибитора MMP-1 (TIMP-1), что ведет к затуханию процессов воспаления и патологического ремоделирования в миокарде, таких, как замещение инфарктной зоны рубцовой тканью, гипертрофия и апоптоз миоцитов, дисфункция эндотелия [1]. Помимо VEGF (сильный активатор ангиогенеза) и IGF-I (антиапоптотическое действие в отношении кардиомиоцитов) [32], МСК секретируют ряд других важных паракринных факторов, которые предотвращают апоптоз, активируют ангиогенез и участвуют в реорганизации матрикса, напри-

мер, FGF (ангиогенный, противofiброзный, антиапоптотический эффекты), HGF (ангиогенная, антиапоптотическая, митогенная, противofiброзная активность), аденомедуллин (ангиогенная, антиапоптотическая, противofiброзная активность) [21].

Исследования иммунологических свойств МСК свидетельствуют в пользу значительной роли данных клеток как иммуномодуляторов в поддержании периферической толерантности, формировании иммуноприлегированного стромального микроокружения для примитивных стволовых клеток ККМ [33], трансплантационном иммунитете, развитии аутоиммунных процессов, а также явлении иммунологической привилегированности плода при беременности [34].

В настоящее время точный механизм иммуносупрессирующего действия МСК недостаточно изучен. Как растворимые факторы, так и клеточно-опосредованные механизмы могут быть вовлечены в супрессивную активность МСК [34-36]. Такими факторами могут выступать трансформирующий ростовой фактор- β (TGF- β) и фактор роста гепатоцитов (HGF) [37], а также простагландин E2 (PGE2) [4]. Показано, что МСК конститутивно продуцируют PGE2, и этот процесс усиливается при совместном культивировании с мононуклеарами периферической крови. Еще одним фактором, вовлеченным в супрессию пролиферации Т-клеток, является фермент, расщепляющий триптофан – IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) [38], продукты распада которого (кинуренин) индуцируют апоптоз Т-лимфоцитов [39]. Механизм иммуносупрессирующего действия МСК может быть также связан с индукцией ими анергии Т-клеток вследствие отсутствия экспрессии на МСК поверхностных костимулирующих молекул CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) [37, 40]. Кроме того, МСК могут реализовывать свою супрессивную активность путем повышения количества регуляторных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток [41].

Помимо непосредственного супрессивного эффекта в отношении Т-лимфоцитов, одним из ключевых механизмов иммуномодулирующего действия МСК является участие их в регуляции дифференцировки, созревания

и функций антиген-презентирующих клеток. МСК ингибируют дифференцировку дендритных клеток и экспрессию ими CD83, HLA-DR и костимулирующих молекул, вследствие чего нарушается активация Т-лимфоцитов такими клетками [42, 43]. В присутствии МСК наблюдается также изменение спектра цитокинов, продуцируемых культурой моноцитов: увеличение продукции противовоспалительных цитокинов (IL-10) и подавление синтеза провоспалительных цитокинов (TNF- α , IFN- γ , IL-12) [42]. Данные явления могут быть результатом действия цитокинов IL-6, M-CSF и PDE2, продуцируемых МСК [43].

Показано, что МСК угнетают пролиферацию, активацию и В-лимфоцитов [44], вероятно, за счет продукции IDO и запуска триптофанового пути супрессии пролиферативного ответа эффекторных клеток [36, 38]. МСК угнетают цитотоксическую активность естественных киллеров (NK-клеток) в отношении клеток, экспрессирующих молекулы HLA класса I [45], а также IL-2 или IL-15-индуцированную пролиферацию и продукцию IFN- γ [41, 45].

Таким образом, МСК значительно модулируют функции целого ряда иммунных кле-

ток *in vitro*. Наиболее важными эффектами МСК в созревании иммунного ответа при трансплантационном иммунитете являются угнетение пролиферации Т-клеток и дифференцировки дендритных клеток (рисунок 1).

Иммунорегуляторные свойства МСК описаны в ряде экспериментальных работ по моделированию аллореактивного иммунного ответа (органная и клеточная трансплантация), аутоиммунитета и противоопухолевого иммунитета на животных [40, 47-49]. Кроме того, показано, что посредством секреции цитокинов и ростовых факторов МСК оказывают протекционное действие в отношении тканей, подвергающихся ишемически-реперфузионным повреждениям [48].

Способность МСК предотвращать развитие РТПХ посредством секреции растворимых факторов, непосредственного клеточного контакта с аллореактивными Т-клетками либо за счет угнетения функции дендритных клеток, а также участие МСК в репарации поврежденных тканей путем секреции ростовых и трофических факторов, трансдифференцировки или fusion-феномена делают их перспективным универсальным материалом в клеточной трансплантологии. Однако для успешно-

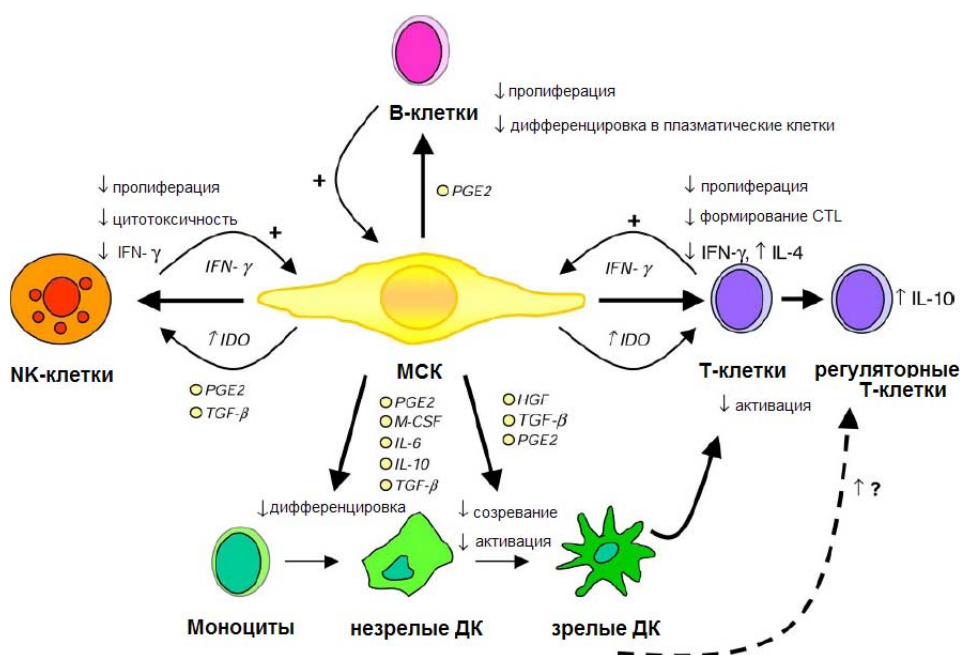


Рис. 1.

го применения МСК в клинических целях необходимо дальнейшее изучение биологических свойств МСК как *in vivo*, так и *in vitro*, т.к. условия культивирования могут значительно повлиять на функциональную активность клеток, а также привести к аккумуляции молекулярных нарушений [50]. Использование же разных методов выделения и культивирования клеток приводит к получению разнородных популяций МСК, значительно отличающихся по характеристикам.

Заключение

Основываясь на результатах научных исследований последних лет о том, что стволовые клетки КKM интегрируются в ткань миокарда в чрезвычайно низком количестве по механизму слияния с резидентными кардиомиоцитами (*fusion-феномен*) вне зоны формирования послеинфарктного рубца в экспериментальной модели [10] и не оказывают положительного эффекта на функциональное состояние левого желудочка после инфаркта [9], следует отметить, что выводы о кардиомиогенном потенциале МСК являются преждевременными. Участие трансплантированных МСК в формировании патологических инкапсулированных структур в миокарде, содержащих очаги кальцификации и оссификации, доказанное в исследовании Breitbach et al. [51], еще более ставит под сомнение тканеспецифичную судьбу трансплантированных МСК и требует осторожности и критичности в интерпретации единичных случаев успешной трансдифференцировки стволовых клеток.

Нами показано, что МСК костного мозга человека не дифференцируются в функционально активные кардиомиоциты *in vitro*, несмотря на то, что некоторые клетки демонстрируют повышенный уровень экспрессии кардиоспецифических генов при культивировании в среде, содержащей индукторы дифференцировки, или при совместном культивировании с нативными кардиомиоцитами. Противоположные результаты, полученные другими исследователями, оказались, по меньшей мере, невоспроизводимыми.

Расхождения между опубликованными данными могут возникнуть вследствие значительных вариаций протоколов выделения и характеристики МСК между разными лабораториями. Поскольку строма костного мозга состоит из различных типов МСК, вариабельность параметров, используемых для сортировки клеток, и их адгезивных свойств, а также последующие условия культивирования могут привести к выделению и росту различных клеточных типов, обладающих разными пролиферативными свойствами в разных исследованиях. Например, Bedada et al. [26] показали, что стромальные клетки КKM могут различаться по экспрессии двух популярных клеточных маркеров CD34 и Sca-1 без различий в адгезивной способности, пластичности и дифференцировочном потенциале. На сегодняшний день неизвестно, в какой степени подобные различия в фенотипе влияют на кардиомиогенный потенциал субклонов МСК. Вероятно, успех некоторых исследований по кардиомиогенной дифференцировке стромальных клеток КKM достигнут именно благодаря использованию редкой субпопуляции МСК, способных к трансформации в кардиомиоциты. Если данная субпопуляция МСК существует, методики выделения клеток должны быть унифицированы и воспроизводимы, а критерии оценки кардиомиогенной трансдифференцировки – более весомыми, чем простая детекция экспрессии кардиоспецифических генов.

Таким образом, несмотря на то, что МСК костного мозга демонстрируют значительную пластичность и подвергаются частичной дифференцировке при манипуляциях с ними *in vitro*, они неспособны приобретать функциональные характеристики полноценных кардиомиоцитов. Следовательно, механизмы положительного эффекта трансплантации МСК на регенерацию миокарда связаны с их влиянием на процессы ремоделирования и ангиогенеза посредством секреции цитокинов и ростовых факторов, а не с непосредственным участием в клеточной регенерации миокарда. Вследствие своего уникального иммунорегуляторного потенциала и способности к секреции широкого спектра трофических и ростовых факторов, МСК должны рассматри-

ваться как идеальный инструмент генной и регенеративной терапии ишемических повреждений миокарда.

Литература

- Guo, J. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction / J. Guo [et al.] // *Inflammation*. – 2007. – Vol. 30. – P. 97-104.
- Pittenger, M.F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M.F. Pittenger [et al.] // *Science*. – 1999. – Vol. 284. – P. 143-146.
- Sun, S. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method / S. Sun [et al.] // *Stem Cells*. – 2003. – Vol. 21. – P. 527-535.
- Tse, W.T. Suppression of allogenic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation / W.T. Tse [et al.] // *Transplantation*. – 2003. – Vol. 75. – P. 389-397.
- Gojo, S. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells / S. Gojo [et al.] // *Exp. Cell. Res.* – 2003. – Vol. 288. – P. 51-59.
- Mackenzie, T.S. Multilineage differentiation of human MSC after in utero transplantation / T.S. Mackenzie, A.W. Flake // *Cytherapy*. – 2001. – Vol. 3. – № 5. – P. 403-405.
- Tomita, S. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation / S. Tomita [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2002. – Vol. 123. – P. 1132-1140.
- Wang, J.-S. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: Pathophysiologic and therapeutic implications / J.-S. Wang [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2001. – Vol. 122. – P. 699-705.
- Kolossov, E. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium / E. Kolossov [et al.] // *JEM*. – 2006. – Vol. 203(10). – P. 2315-2327.
- Nygren, J.M. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation / J.M. Nygren [et al.] // *Nature Medicine*. – 2004. – Vol. 10(5). – P. 494-501.
- Bittira, B. In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration / B. Bittira [et al.] // *Ann. Thorac. Surg.* – 2002. – Vol. 74. – P. 1154-1160.
- Makino, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro / S. Makino [et al.] // *J. Clin. Investigation*. – 1999. – Vol. 103. – P. 697-705.
- Shim, W.S.N. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells / W.S.N. Shim [et al.] // *BBRC*. – 2004. – Vol. 324. – P. 481-488.
- Мастичкая, С.Ю. Возможности направленной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток человека в кардиомиоциты *in vitro* / С.Ю. Мастичкая [и др.] // *Медицина*. – 2009. – № 1(64). – С. 32-36.
- Clarke, K.R. PRIMER v6: User Manual / K.R. Clarke, R.N. Gorley. – Plymouth: PRIMER-E., 2006. – 126 p.
- Friedenstein, A.J. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells / A.J. Friedenstein, R.K. Chailakjan, K.S. Lalykina // *Cell. Tissue. Kinet.* – 1970. – Vol. 3. – P. 393-403.
- Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells / A.I. Caplan // *J. Orthop. Res.* – 1991. – Vol. 9. – P. 641-650.
- Heng, B.C. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro / B.C. Heng [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – Vol. 62. – P. 34-42.
- Ventura, C. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts / C. Ventura [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282 – № 19. – P. 14243-14252.
- Toma, C. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart / C. Toma [et al.] // *Circulation*. – 2002. – Vol. 105. – P. 93-98.
- Wang, X.-J. The roles of mesenchymal stem cells (MSCs) therapy in ischemic heart diseases / X.-J. Wang, Q.-P. Li // *BBRC*. – 2007. – Vol. 359. – P. 189-193.
- Shake, J.G. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects / J.G. Shake [et al.] // *Ann. Thorac. Surg.* – 2002. – Vol. 73. – P. 1919-1926.
- Vulliet, P.R. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs / P.R. Vulliet [et al.] // *Lancet*. – 2004. – Vol. 363. – P. 783-784.
- Yoon, Y.S. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction / Y.S. Yoon [et al.] // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109. – P. 3154-3157.
- Nassiri, S.M. 2007. The similar effect of transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells with or without prior differentiation induction in experimental myocardial infarction / S.M. Nassiri [et al.] // *J. Biomed. Sci.* – 2007. – Vol. 14. – P. 745-755.
- Bedada, F.B. Activation of myogenic differentiation pathways in adult bone marrow-derived stem cells / F.B. Bedada [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 11. – P. 9509-9519.
- Christman, J.K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy / J.K. Christman // *Oncogene*. – 2002. – Vol. 21. – P. 5483-5495.
- Yoshida, M. Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function / M. Yoshida, S. Horinouchi, T. Beppu // *Bioassays*. – 1995. – Vol. 17. – P. 423-430.
- Shiota, M. Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties / M. Shiota [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 2007. – Vol. 313. – P. 1008-1023.

30. Neuss S. Assessment of stem cell - biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering / S. Neuss [et al.] // *Biomaterials*. – 2008. – № 29. – P. 302-313.
31. Xu, M. Differentiation of bone marrow stromal cells into the cardiac phenotype requires intercellular communication with myocytes / M. Xu [et al.] // *Circulation*. – 2004. – Vol. 110. – P. 2658-2665.
32. Sadat, S. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF / S. Sadat [et al.] // *BBRC*. – 2007. – Vol. 363. – P. 674-679.
33. Bacigalupo, A. T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia / A. Bacigalupo [et al.] // *Exp. Hematol*. – 2005. – Vol. 33. – P. 819-827.
34. Rasmusson, I. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells / I. Rasmusson [et al.] // *Transplantation*. – 2003. – Vol. 76. – P. 1208-1213.
35. Le Blanc, K. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes / K. Le Blanc [et al.] // *Scand. J. Immunol*. – 2004. – Vol. 60. – P. 307-315.
36. Krampera, M. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells / M. Krampera [et al.] // *Stem Cells*. – 2006. – Vol. 24. – P. 386-398.
37. Di Nicola, M. Human bone marrow stromal cells suppress T lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli / M. Di Nicola [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 99. – P. 3838-3843.
38. Meisel, R. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenasemediated tryptophan degradation / R. Meisel [et al.] // *Blood*. – 2004. – Vol. 103. – P. 4619-4621.
39. Plumas, J. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells / J. Plumas [et al.] // *Leukemia*. – 2005. – Vol. 19. – P. 1597-1604.
40. Zappia, E. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy / E. Zappia [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 106. – P. 1755-1761.
41. Aggarwal, S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses / S. Aggarwal, M.F. Pittenger // *Blood*. – 2005. – Vol. 105. – P. 1815-1822.
42. Jiang, X.X. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells / X.X. Jiang [et al.] // *Blood*. – 2005. – Vol. 105. – P. 4120-4126.
43. Nauta, A.J. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells / A.J. Nauta [et al.] // *J. Immunol*. – 2006. – Vol. 177. – P. 2080-2087.
44. Corcione, A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions / A. Corcione [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol. 107. – P. 367-372.
45. Sotiropoulou, P.A. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells / P.A. Sotiropoulou [et al.] // *Stem Cells*. – 2006. – Vol. 24. – P. 74-85.
46. Nauta, A.J. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells / A.J. Nauta, W.E. Fibbe // *Blood*. – 2007. – Vol. 110. – P. 3499-3506.
47. Bartholomew, A. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo / A. Bartholomew [et al.] // *Exp. Hematol*. – 2002. – Vol. 30. – P. 42-48.
48. Togel, F. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation independent mechanisms / F. Togel [et al.] // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol*. – 2005. – Vol. 289. – P. F31-F42.
49. Yanez, R. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AD-MSC) have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of graft-versus host disease (GVHD) / R. Yanez [et al.] // *Stem Cells*. – 2006. – Vol. 24. – P. 2582-2591.
50. Rombouts, W.J. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture / W.J. Rombouts, R.E. Ploemacher // *Leukemia*. – 2003. – Vol. 17. – P. 160-170.
51. Breitbach, M. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts / M. Breitbach // *Blood*. – 2007. – Vol. 110. – P. 1362-1369.

Поступила 02.03.2009 г.
Принята в печать 02.03.2009 г.

ВАРИАНТЫ ОТХОЖДЕНИЯ, ТОПОГРАФИИ И ВЕТВЛЕНИЯ ЛАБИРИНТНЫХ АРТЕРИЙ: АНАТОМО-КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

БУРАК Г.Г.*, САМСОНОВА И.В.***, КОБЕЦ Ю.Г.*

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;
кафедра анатомии человека,*
кафедра патологической анатомии***

Резюме. В статье представлены собственные данные изучения вариантов отхождения, топографии и ветвления лабиринтных артерий. Материалом исследования явились 19 трупов новорожденных и плодов обоего пола (мужского-11, женского-8).

Анатомия лабиринтных артерий и их ветвей изучалась методами макро- и микропрепарирования, ангиоморфометрии, окраской гематоксилином и эозином, 1% раствором толуидинового синего, импрегнацией азотнокислым серебром.

Выявлены 4 (21% от числа наблюдений) варианта отхождения лабиринтных артерий от сосудов вертебрально-базиллярного бассейна, два вида ветвления сосуда во внутреннем слуховом проходе, анастомозы между ветвями лабиринтной и наружной сонной артерий в каменистой части височной кости и в твердой мозговой оболочке задней черепной ямки. Показано, что варианты отхождения, топографии и ветвления лабиринтных артерий развиваются по причине нарушений раннего ангиогенеза на уровне 6,7,8 дорзальных межсегментарных артерий и их анастомозов.

В статье дана анатомо-клиническая оценка роли лабиринтных артерий и особенностей их структурной организации в патогенезе кохлео-вестибулярных нарушений периферической локализации.

Ключевые слова: лабиринтная артерия, варианты отхождения, варианты ветвления, внутреннее ухо.

Abstract. Our own data of the variants investigation of dislocation, topography and branching of labyrinth arteries are presented in this article. 19 corpses of newborns and fetuses (11 males, 8 females) have been studied.

Anatomy of labyrinth arteries and their branches was studied by the methods of macro- and micropreparation, angiomorphometry, dyeing with hematoxylin and eosin, 1% toluidine blue solution, nitrate silver impregnation.

Four (21% of the total number of observations) variants of labyrinth arteries dislocation from vertebro-basilar area, 2 types of vessel branching in the internal acoustic duct, anastomoses between the branches of labyrinth artery and external carotid artery in the stony area of temporal bone have been detected.

The variants of dislocation, topography and branching of labyrinth arteries were shown to develop due to changes in the early angiogenesis at the level of 6,7,8 dorsal intersegmental arteries and their anastomoses.

The anatomoclinical estimation of labyrinth arteries role and peculiarities of their structural features in the pathogenesis of cochleovestibular disturbances of peripheral localization is presented in this article.

Научный и практический интерес к изучению структурной организации лабиринтной артерии на макро- и микроскопическом уровнях объясняется особой ее

ролью в патологии вестибулярной и слуховой сенсорных систем различной этиологии.

Лабиринтная артерия является единственным сосудом, кровоснабжающим образования рецепторной (вестибулярная и улитковая части перепончатого лабиринта) и проводниковой (преддверный и спиральный

Адрес для корреспонденции: 210062, г. Витебск, пр. Фрунзе, д. 27, Витебский государственный медицинский университет, кафедра анатомии человека. – Бурак Г.Г.

узлы) частей вестибулярной и слуховой сенсорных систем. Терминальные ветви лабиринтных артерий формируют в рецепторных и секреторных частях улиткового и полукружных протоков, в маточке и мешочке, в узлах преддверно-улиткового нерва гемомикроциркуляторное русло, которое обеспечивает необходимые условия для течения обменных процессов в нейроэпителиальных структурах внутреннего уха, определяет уровни образования и реабсорбции внутрилабиринтных жидкостей и участвует в регуляции их объема и ионного состава [7, 9].

Характер гемодинамики в сосудах внутреннего уха определяет патогенетические механизмы становления, развития и исходов вестибулярной и слуховой дисфункций.

Синдром вестибулярной дисфункции (СВДФ) наиболее часто развивается при нарушениях кровотока в артериях вертебрально-базилярного бассейна. В основе СВДФ лежат сосудистые, внутрисосудистые и внесосудистые изменения в микроциркуляторном русле сенсорных и секреторных зон статических образований перепончатой части внутреннего уха [3, 7, 18, 19, 22, 26, 27]. Нарушения функций вестибулярной системы в большей или меньшей степени сочетаются со слуховыми расстройствами [3, 8, 30].

Нарушениям гемодинамики внутреннего уха принадлежит важная роль [12, 14, 24, 31] в патогенезе болезни Меньера и меньероподобных заболеваний, которыми, по данным И.Б. Солдатова, Г.П. Сущева, Н.С. Храппо [23], страдает 16,6% всех отоларингологических больных и 79,1% больных, поступивших в клинику по поводу вестибулярной дисфункции.

Данные литературы свидетельствуют об определяющей роли гемодинамики в терминальных ветвях лабиринтной артерии в патогенезе слуховых нарушений (в виде симптомов раздражения или выпадения) при действии шумов различной частоты и силы [1, 2, 20].

Особенности ветвления лабиринтной артерии и архитектоники ее конечных ветвей во многом определяют механизмы прямого и опосредованного (через пери- и эндолимфу) действия ототоксических веществ

на специализированные структуры слуховой и вестибулярной частей внутреннего уха с развитием в них дистрофически-атрофических и дистрофически-некротических изменений [4, 11, 29].

Из собственных работ [5], а также работ других авторов [13, 16, 17, 25] известно, что причинами нарушений кровотока в лабиринтных артериях могут быть аномалии отхождения, топографии и ветвления позвоночных артерий, патологическая извитость (койлинг, кинкинг, S-образная извитость) магистральных артерий головы [15, 28], гипоплазия базилярной артерии [26], что сопровождается расстройствами гемодинамики в сосудах вертебрально-базилярного бассейна при сохранении их проходимости.

Таким образом, в становлении и развитии заболеваний акустического и статокинетического аппаратов различной этиологии основополагающая роль принадлежит условиям кровотока в лабиринтных артериях, которые определяются особенностями структурной организации сосуда и его ветвей.

Все вышеизложенное определяет необходимость целенаправленного изучения особенностей отхождения, топографии и ветвления лабиринтных артерий, особенностей микроанатомии их ветвей в функционально различных образованиях внутреннего уха, что имеет важное значение для функциональной и клинической лабиринтологии и является источником совершенствования специальных знаний.

Цель работы – описание и анализ аномалий отхождения, топографии, ветвления и строения лабиринтных артерий, выявленных при исследовании структурной организации сосудов вертебрально-базилярного бассейна и изучении структурно-функциональных механизмов вестибулярных и слуховых расстройств при моделировании патологии мозгового кровообращения стволовой локализации.

Методы

Материалом исследования явились 19 трупов новорожденных и плодов обоего пола (мужского – 11, женского – 8), полученных из

патологоанатомического отделения Витебской областной детской клинической больницы. Анатомия лабиринтных артерий изучалась методами макро- и микропрепарирования с использованием биологических стереоскопических микроскопов МБС-1 и МБС-2, ангиометрии с последующей визуализацией результатов исследования.

Для изучения анатомии ветвей лабиринтной артерии сосуды вертебрально-базилярного бассейна контрастировались 1% раствором туши на желатине с последующими декальцинацией каменистых частей височных костей, приготовлением срезов толщиной 50 мкм и их просветлением по методу А.М. Малыгина. Для изучения гистоструктуры стенок лабиринтных артерий и их ветвей забирались кусочки сосудов на различных уровнях, фиксировались 12% забуфференным (рН, 7,6) раствором нейтрального формалина. Кусочки сосудов импрегнировались азотнокислым серебром, а приготовленные из них парафиновые срезы толщиной 4-6 мкм окрашивались гематоксилином и эозином, 1% раствором толуидинового синего.

Результаты и их обсуждение

У 15 из 19 исследованных трупов (79% от числа наблюдений) лабиринтные артерии отходили с обеих сторон относительно симметрично от передних нижних мозжечковых артерий. Угол отхождения составлял от 30 до 65°. Диаметр артерий колебался от 0,2 мм до 1,3 мм. Направляясь латерально и кпереди по скату, а затем по задней поверхности каменистой части височной кости, они входили во внутренний слуховой проход через одноимённое отверстие (рис.1).

В четырех случаях (21% от числа наблюдений) были выявлены особенности отхождения и топографии лабиринтных артерий. При этом в *первом случае* (рис. 2) левая лабиринтная артерия имела диаметр 0,3 мм и отходила от основной дистальнее передней нижней мозжечковой артерии, отдавая две ветви к твердой мозговой оболочке. На этой же стороне от передней нижней мозжечковой отходила добавочная ветвь, которая следовала во внутренний слуховой проход и ниже лицевого нерва входила в него.

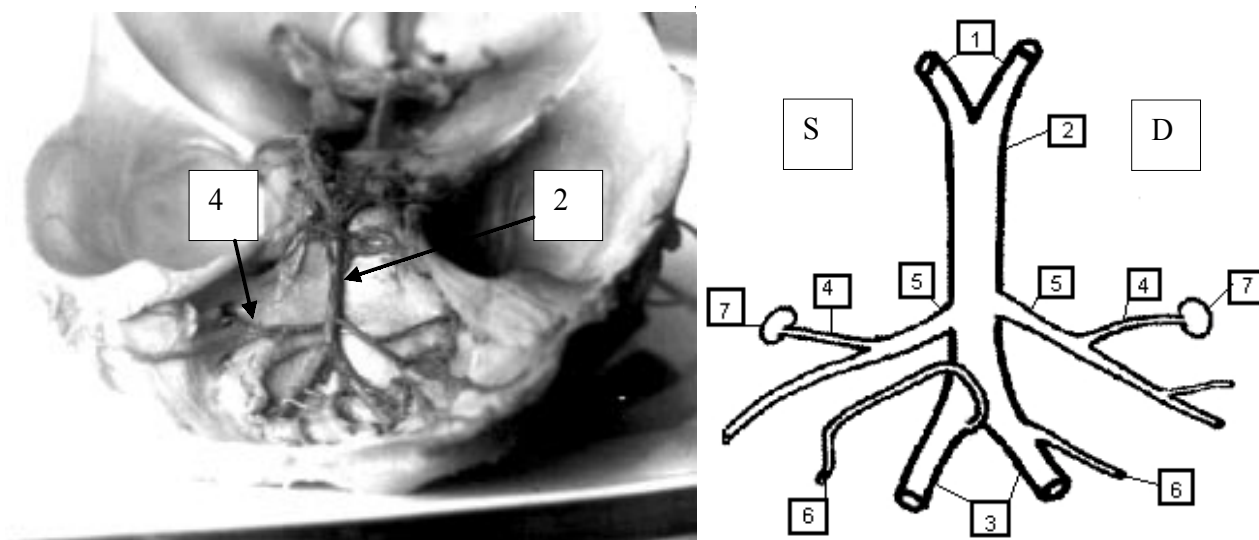


Рис. 1. Наиболее часто встречающийся вариант отхождения лабиринтной артерии от соответствующих передних нижних мозжечковых артерий (А - фото, Б – схематическое изображение).

1. Задняя мозговая артерия (A. cerebri posterior)
2. Базилярная артерия (A. basilaris)
3. Позвоночная артерия (A. vertebralis)
4. Лабиринтная артерия (A. labyrinthi)
5. Передняя нижняя мозжечковая артерия (A. cerebellaris anterior inferior)
6. Задняя нижняя мозжечковая артерия (A. cerebellaris posterior inferior)
7. Внутреннее слуховое отверстие (Porus acusticus internus)

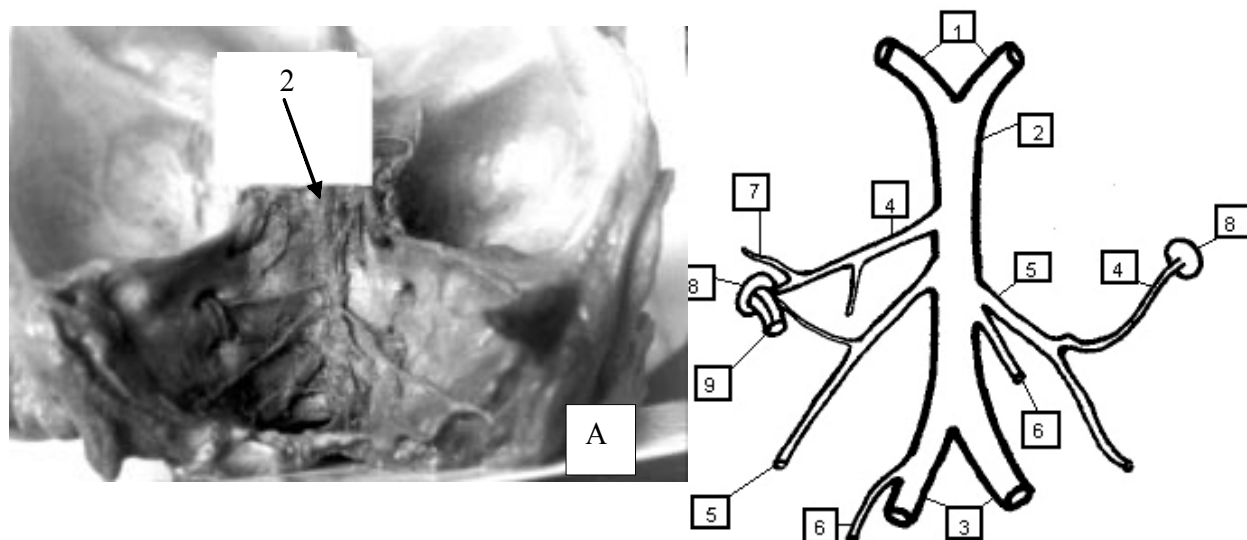


Рис.2. Асимметричное отхождение лабиринтной артерии: левой – от базилярной артерии дистальнее передней нижней мозжечковой артерии; правой – от соответствующей передней нижней мозжечковой артерии (А - фото, Б – схематическое изображение).

1. Задние мозговые артерии (A. cerebri posterior)
2. Базилярная артерия (A. basilaris)
3. Позвоночные артерии (A. vertebralis)
4. Лабиринтная артерия (A. labyrinthi)
5. Передняя нижняя мозжечковая артерия (A. cerebellaris anterior inferior)
6. Задняя нижняя мозжечковая артерия (A. cerebellaris posterior inferior)
7. Ветвь к твердой мозговой оболочке
8. Внутреннее слуховое отверстие (Porus acusticus internus)
9. Лицевой нерв (N. facialis)

Правая лабиринтная артерия имела диаметр 0,2 мм, была вторичной ветвью передней нижней мозжечковой артерии и входила во внутренний слуховой проход.

Особенностью данного случая является также то, что справа передняя и задняя мозжечковые артерии отходили от основной общим стволом (рис. 2).

Во втором случае (рис. 3) левая передняя нижняя мозжечковая артерия отходила от основной двумя стволиками. Левая лабиринтная артерия диаметром 0,3 мм отходила от основной более дистально и перед входом во внутренний слуховой проход образовывала изгиб.

Правая лабиринтная артерия имела диаметр 0,4 мм, являлась вторичной ветвью передней нижней мозжечковой артерии и по пути к внутреннему слуховому проходу отдавала две ветви к твердой мозговой оболочке (рис. 3).

В третьем случае (рис. 4) левая лабиринтная артерия (диаметр 0,5 мм), являясь ветвью передней нижней мозжечковой арте-

рии, перед входом во внутренний слуховой проход делилась на три конечные ветви. Две из них (меньшего диаметра) входили во внутренний слуховой проход, третья направлялась к твердой мозговой оболочке. Кроме того, с этой же стороны задняя нижняя мозжечковая артерия отходила от базилярной артерии, а не от позвоночной.

С правой стороны лабиринтная артерия (диаметр 0,2 мм) отходила от соответствующей передней нижней мозжечковой артерии. Дистальнее от правой передней нижней мозжечковой артерии отходила дополнительная ветвь, направлявшаяся во внутренний слуховой проход (рис. 4).

В четвертом случае (рис. 5) левая лабиринтная артерия (диаметр 0,5 мм) отходила от основной дистальнее передней нижней мозжечковой артерии, отдавала ветвь к твердой мозговой оболочке и входила во внутренний слуховой проход ниже лицевого нерва.

С правой стороны передняя нижняя мозжечковая артерия (диаметр 0,4 мм) отходила

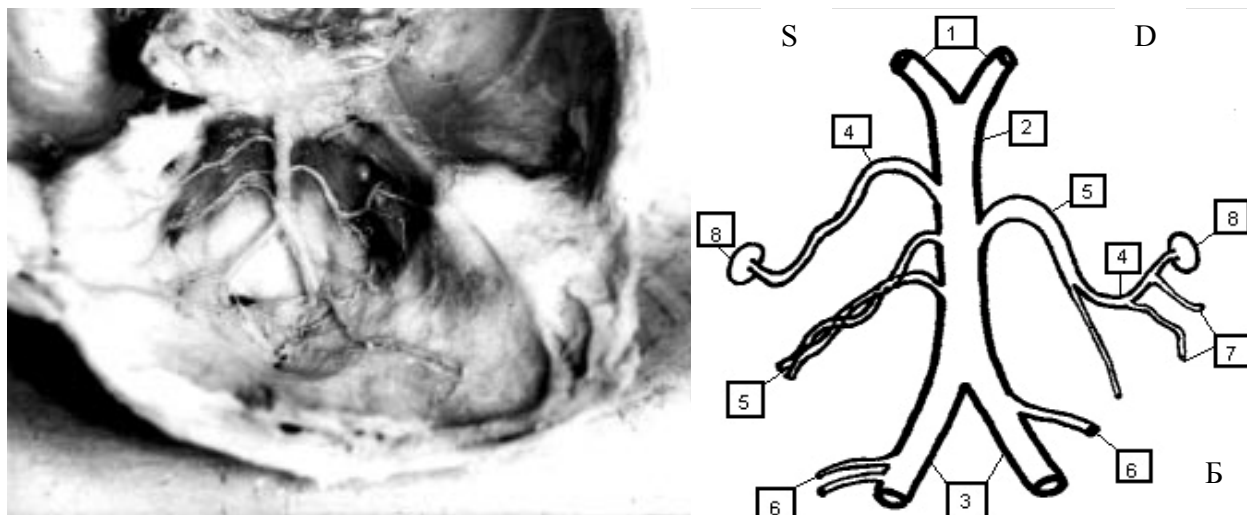


Рис.3. Вариант, при котором правая лабиринтная артерия по диаметру и расположению являлась продолжением передней нижней мозжечковой артерии и давала две ветви к твердой мозговой оболочке, а левая – ветвью базилярной артерии (А - фото, Б – схематическое изображение).

1. Задние мозговые артерии (A. cerebri posterior)
2. Базилярная артерия (A. basilaris)
3. Позвоночные артерии (A. vertebralis)
4. Лабиринтная артерия (A. labyrinthi)
5. Передняя нижняя мозжечковая артерия (A. cerebellaris anterior inferior)
6. Задняя нижняя мозжечковая артерия (A. cerebellaris posterior inferior)
7. Ветвь к твердой мозговой оболочке
8. Внутреннее слуховое отверстие (Porus acusticus internus)

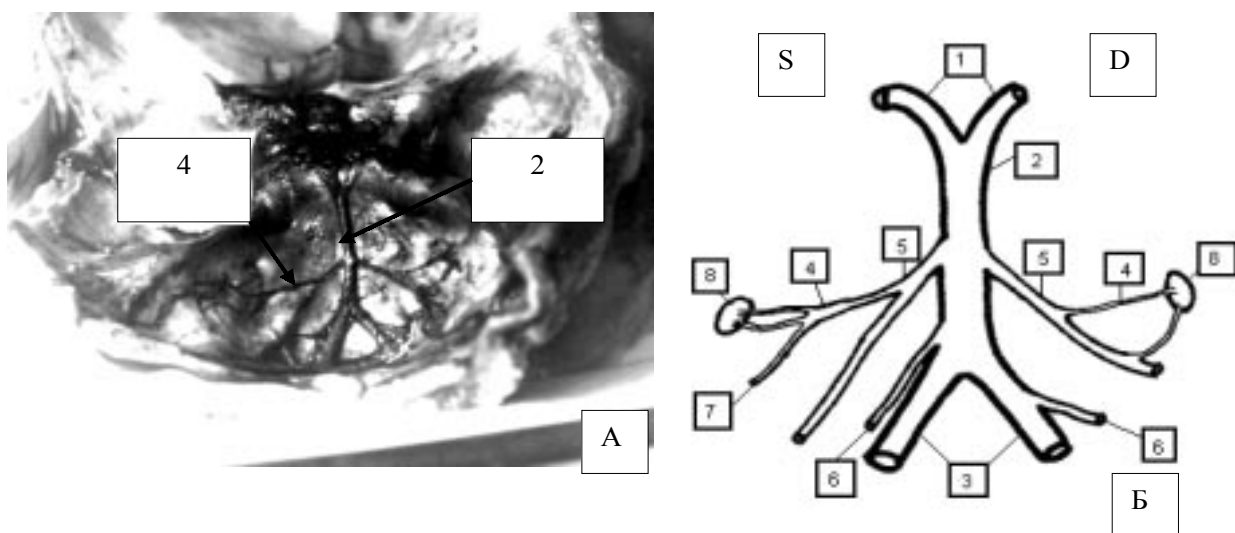


Рис. 4. Вариант, при котором левая лабиринтная артерия, являясь ветвью передней нижней мозжечковой артерии, перед входением во внутренний слуховой проход делилась на три ветви (А - фото, Б – схематическое изображение).

- 1.Задние мозговые артерии (A. cerebri posterior)
- 2.Базилярная артерия (A. basilaris)
- 3.Позвоночная артерия (A. vertebralis)
4. Лабиринтная артерия (A. labyrinthi)
- 5.Передняя нижняя мозжечковая артерия (A. cerebellaris anterior inferior)
- 6.Задняя нижняя мозжечковая артерия (A. cerebellaris posterior inferior)
- 7.Ветвь к твердой мозговой оболочке
- 8.Внутреннее слуховое отверстие (Porus acusticus internus)

от основной практически у места соединения позвоночных артерий и после отхождения от нее лабиринтной артерии сразу же делилась на две ветви. Лабиринтная артерия делилась на три ветви, одна из которых направлялась к твердой мозговой оболочке, а две – во внутренний слуховой проход (рис.5).

По нашему мнению, выявленные варианты отхождения, топографии и строения лабиринтных артерий формируются на 3-7 неделе внутриутробного развития одновременно с аномалиями позвоночных артерий [5] по причине нарушения ангиогенеза на уровне 6-8 дорзальных межсегментарных артерий (ветви дорзальных аорт). На 4-ой неделе развития из множественных анастомозов между 6-8 межсегментарными сосудами путем слияния образуются позвоночные артерии. Последние растут в краниальном направлении и на уровне развивающегося продолговатого мозга отклоняются медиально и вентрально, соединя-

ются друг с другом и образуют основную артерию, которая продолжает расти до уровня воронки, где формирует заднюю часть виллизьева круга.

В результате преобразования дорзальных межсегментарных артерий и множественных анастомозов между ними не происходит полного исчезновения последних. Из оставшихся мелких сосудов образуются ветви основной артерии к отделам головного мозга, развивающимся из заднего мозгового пузыря (артерии моста и мозжечка), и к перепончатому лабиринту, развивающемуся из утолщения эктодермы по бокам продолговатого мозга (лабиринтная артерия). При нарушениях редукции межсегментарных артерий и их анастомозов на этом уровне формируются аномалии отхождения, топографии и ветвления лабиринтных артерий (случаи 2, 3, 4, 5).

Особенности деления лабиринтной артерии на конечные ветви (рис.6) связаны, по

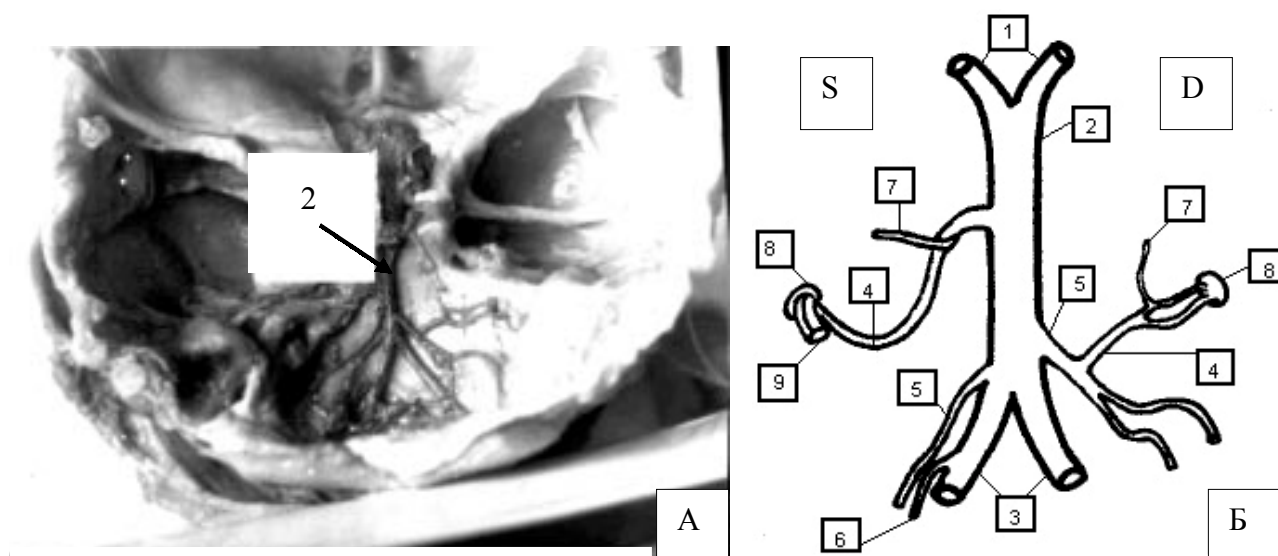


Рис.5. Вариант, при котором левая лабиринтная артерия, являясь достаточно крупным сосудом, отходила от базилярной артерии, а правая ЛА отходила от соответствующей передней нижней мозжечковой и входила во внутренний слуховой проход двумя стволами

(А - фото, Б – схематическое изображение).

1. Задние мозговые артерии (A. cerebri posterior)
2. Базилярная артерия (A. basilaris)
3. Позвоночная артерия (A. vertebralis)
4. Лабиринтная артерия (A. labyrinthi)
5. Передняя нижняя мозжечковая артерия (A. cerebellaris anterior inferior)
6. Задняя нижняя мозжечковая артерия (A. cerebellaris posterior inferior)
7. Ветвь к твердой мозговой оболочке
8. Внутреннее слуховое отверстие (Porus acusticus internus)
9. Лицевой нерв (N. facialis)

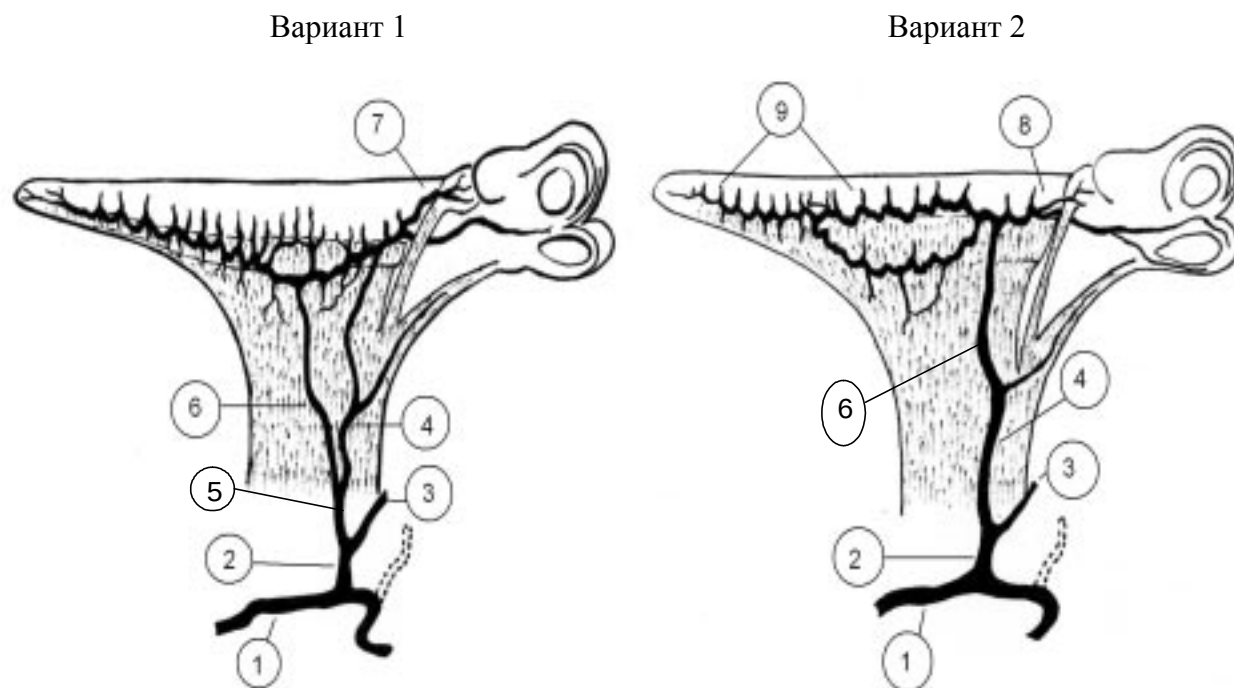


Рис. 6. Варианты ветвления лабиринтной артерии во внутреннем слуховом проходе.

1. Передняя нижняя мозжечковая артерия (A. cerebellaris anterior inferior)
2. Лабиринтная артерия (A. labyrinthi)
3. Передняя преддверная артерия (A. vestibularis anterior)
4. Преддверно-улитковая артерия (A. vestibulo-cochlearis)
5. Общая улитковая артерия (A. cochlearis communis)
6. Собственно улитковая артерия (A. cochlearis propria)
- 7,8. Саккулярная артерия (A. saccularis)
9. Ветви улитковой артерии (Rami arteriae cochlearis)

нашему мнению, с неодинаковой дифференцировкой развивающегося перепончатого лабиринта на слуховую и вестибулярную части в раннем онтогенезе (4-5 недели).

Анализ выявленных нами вариантов отхождения лабиринтных артерий и их диаметров показал, что при малом диаметре основного ствола лабиринтной артерии во внутренний слуховой проход входила добавочная ветвь, которая являлась вторичной ветвью самой лабиринтной или передней нижней мозжечковой артерии (рис. 2, 4, 5).

Комплексное изучение уровней отхождения, топографии и строения основного ствола лабиринтных артерий методами макро- и микропрепарирования, ветвей артерии методами импрегнации и контрастирования с последующим просветлением позволили получить приоритетные данные, имеющие принципиальное научное и практическое значение. Эти результаты дают основание не согласиться

с данными литературы об изолированности лабиринтной артерии. Нами установлено, что до вхождения во внутренний слуховой проход от лабиринтной артерии отходит одна или две ветви (рис. 2, 3, 4, 5) к твердой мозговой оболочке в области задней черепной ямки, которые анастомозируют с менингеальными ветвями наружной сонной артерии (затылочная и восходящая глоточная артерии).

Во внутреннем слуховом проходе от лабиринтной артерии отходят 20-30 веточек, которые образуют в оболочках, окружающих нервы прохода, мелкопетлистое сосудистое сплетение. Отходящие от сплетения веточки (10-15) анастомозируют в губчатом веществе каменистой части височной кости с ветвями задних ушных, восходящих глоточных и верхнечелюстных артерий из системы наружных сонных артерий.

Таким образом, лабиринтная артерия через свои ветви анастомозирует с ветвями

наружной сонной артерии, по которым протекает кровь к твердой мозговой оболочке в области задней черепной ямки и каменистой части височной кости.

Мы полагаем, что анастомозы между ветвями лабиринтной и наружной сонной артерии являются дополнительными путями перераспределения крови между бассейнами вертебрально-базиллярной системы кровообращения и наружной сонной артерии, что исключительно важно для поддержания стабильности лабиринтного кровообращения при постоянно меняющихся условиях функционирования периферической части вестибулярной и слуховой сенсорных систем. Кроме того, анастомозы могут стать и путями двустороннего распространения инфекции.

Во внутреннем слуховом проходе лабиринтная артерия делится на свои конечные ветви. Нами выявлено два варианта ветвления сосуда на данном участке (рис. 6, 7).

В первом варианте лабиринтная артерия делилась на переднюю преддверную, кровоснабжающую перепончатое преддверие и полукружные каналы, и общую улитковую, которая отдавала преддверно-улитковую и собственно улитковую артерии. Последняя кро-

воснабжала улитку и спиральный ганглий. Преддверно-улитковая артерия делилась на саккулярную, направляющуюся к мешочку, и ампулярную, кровоснабжающую ампулы полукружных каналов.

Во втором варианте от лабиринтной артерии отходили передняя преддверная и преддверно-улитковая артерии. Последняя отдавала преддверную, улитковую и саккулярную артерии.

От конечных ветвей лабиринтной артерии отходили микрососуды в специализированные образования акустического и статокINETического аппаратов, в вестибулярный и спиральный узлы (рис. 7), формируя в них гематолабиринтный барьер.

Импрегнация кусочков артерии, взятых на различных уровнях от места ее отхождения, азотнокислым серебром, окраска срезов гематоксилином и эозином, 1% раствором толуидинового синего позволили установить, что гистоструктура стенки сосуда принципиально не отличалась от таковой в артериях мышечно-эластического типа других анатомических образований. Особенностью строения артерии являлась относительно большая толщина средней оболочки сосуда со значительным

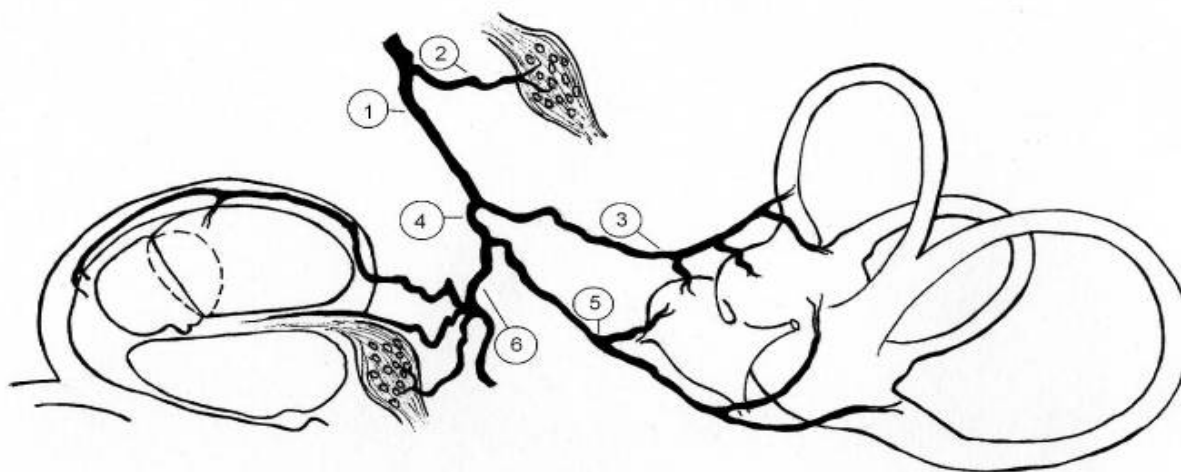


Рис. 7. Области кровоснабжения конечных ветвей лабиринтной артерии.

1. Лабиринтная артерия (A. labyrinthi)
2. Ветви к вестибулярному ганглию
3. Саккулярная артерия (A. saccularis)
4. Преддверно-улитковая артерия (A. vestibulo-cochlearis)
5. Передняя преддверная артерия (A. vestibularis anterior)
6. Улитковая артерия (A. cochlearis)

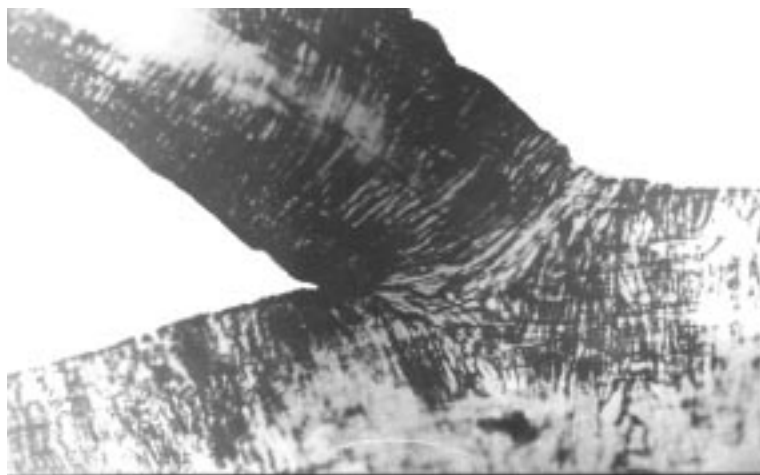
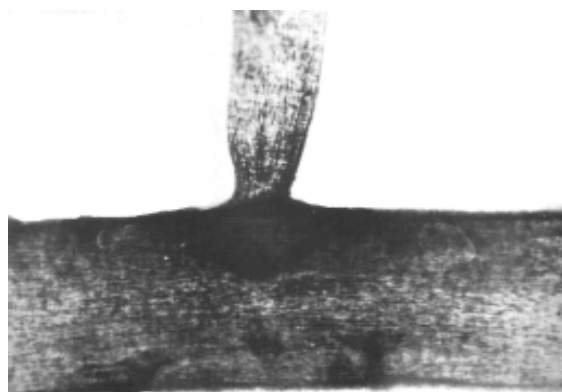
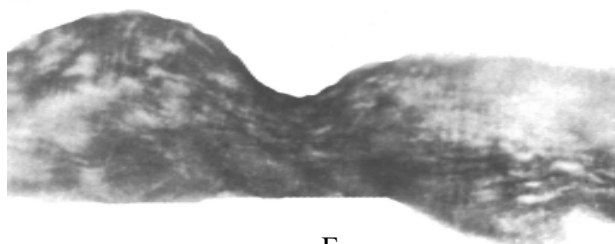


Рис. 8. Лабиринтная артерия у места отхождения от передней нижней мозжечковой артерии (труп мужчины 58 лет). Импрегнация азотнокислым серебром. Увел. $\times 70$.



А



Б

Рис. 9. Спазм лабиринтной артерии кролика у места отхождения (А) и во внутреннем слуховом проходе (Б). Импрегнация азотнокислым серебром. Увел. $\times 70$.

количеством эластических волокон в ней и концентрацией гладких миоцитов и эластических волокон у места отхождения (рис.8).

Мы полагаем, что эти особенности артерии способствуют регуляции кровотока по сосуду в соответствии с функциональным состоянием рецепторной части вестибулярной и слуховой сенсорных систем. Вместе с тем они обуславливают, по нашему мнению, спазмы сосуда с появлением шума в ушах [8], устойчивым снижением или выпадением слуха [2, 8] и вестибулярными расстройствами периферической локализации [2, 7, 23, 27].

В связи с невозможностью регистрировать спазм лабиринтной артерии при посмер-

тном исследовании людей, умерших от нарушений мозгового кровообращения стволочной локализации, мы исследовали ЛА у экспериментальных животных. Моделирование патологии вертебрально-базилярного кровообращения методом ирритации позвоночных нервов и одновременная перфузия сосудов забуференным (рН 7,6) раствором нейтрального формалина позволили зафиксировать спазмы сосуда у места отхождения от передней нижней мозжечковой артерии (рис. 9а) и во внутреннем слуховом проходе (рис. 9б) и спазм общей улитковой артерии после отхождения от лабиринтной на дне прохода (рис.10). Вазомоторные расстройства лабиринтной ар-

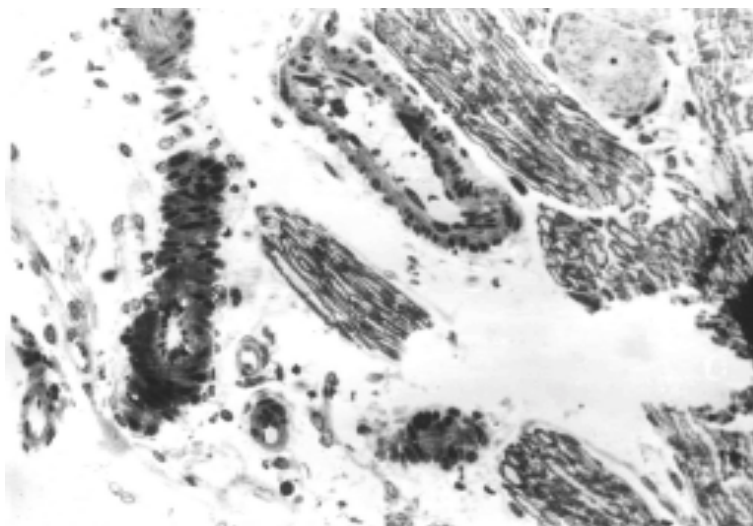


Рис. 10. Спазм общей улитковой артерии кролика. Окраска 1% толуидиновым синим. Увел. х70.

терии наблюдал В.В.Киселев [14] в опытах на крысах при орошении кожи шеи хлорэтилом в области проекции позвоночной артерии.

На основании полученных данных можно предположить, что ушные шумы неясной этиологии, внезапное снижение слуха, внезапная глухота патогенетически связаны с уменьшением или прекращением кровотока по лабиринтной артерии и ее ветвям вследствие их спазма различной продолжительности и локализации.

Заключение

Таким образом, развитие индивидуальных вариантов отхождения, топографии и строения лабиринтных артерий происходит при нарушениях раннего ангиогенеза (3-5 недели) на уровне 6-8 дорзальных межсегментарных артерий и множественных анастомозов между ними с одновременным формированием анатомически различных типов ветвления сосуда на конечные ветви к акустическому и стато-кинетическому аппаратам.

Клиническая важность знания вариантов отхождения топографии и особенностей строения лабиринтных артерий и их ветвей обусловлена следующим:

во-первых, анастомозы между ветвями лабиринтных и наружных сонных артерий в твердой мозговой оболочке задней черепной ямки и губчатом веществе каменистой части височной кости являются, с одной стороны,

путями двухстороннего распространения инфекции и, с другой стороны, способствуют перераспределению крови между бассейнами наружных сонных и позвоночных артерий;

во-вторых, большое количество эластических волокон и гладких миоцитов в средней оболочке стенки лабиринтных артерий с концентрацией их у места отхождения во многом определяет патогенетические механизмы различных по этиологии заболеваний кохлеовестибулярной системы периферической локализации;

в-третьих, экспериментальные данные о спазмах лабиринтной артерии и ее конечных ветвей при механических раздражениях нервного аппарата сосудов вертебрально-базиллярного бассейна позволяют заключить, что спазмы артерий являются причиной внезапных нарушений слуха и острых вестибулярных расстройств.

Литература

1. Аничин, В.Ф. Действие высокочастотного шума на кохлеарный и вестибулярный отделы ушного лабиринта / В.Ф. Аничин, В.В. Павлов // Журн. ушных, носовых и горловых болезней. – 1985. – №2. – С. 29-35.
2. Благовещенская, Н.С. Отоневрологические симптомы и синдромы // Н.С. Благовещенская. – М.: Медицина, 1981. – С. 250-274
3. Бурак, Г.Г. Морфологические изменения в вестибулярном и слуховом анализаторах при острых и хронических нарушениях мозгового кровообращения / Г.Г. Бурак и др. // Центральные механизмы нейро-

- гуморальной регуляции функций в норме и патологии. – Мн.: Наука и техника, 1985. – С. 206-219.
4. Бурак, Г.Г. Морфогистохимические изменения в вестибулярном анализаторе при аминогликозидной интоксикации в условиях нарушенного мозгового кровообращения / Г.Г.Бурак // Морфологические науки практике здравоохранения и ветеринарии. – Омск: ОГМА, 1999. – С.9-12.
 5. Бурак, Г.Г. Аномалии строения и топографии позвоночных артерий: анатомо-клинические аспекты / Г.Г. Бурак, И.В. Самсонова // Вестник Витебского гос. мед.ун-та. – 2008. – Т. 7, №1. – С. 39-45.
 6. Бурак, Г.Г. Planum semilunare вестибулярного аппарата: строение, функции, морфофункциональные изменения при ишемии / Г.Г. Бурак, И.В. Самсонова // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации. Мат. 63-й науч. сессии сотрудников университета. – Витебск: ВГМУ, 2008. С. 454-456.
 7. Бутко, Д.Ю. Состояние церебральной гемодинамики и статокINETических функций у больных с вертебрально-базиллярной сосудистой недостаточностью / Д.Ю. Бутко // Журн. невролог. и психиатр. им. С.С. Корсакова. – 2004. – Т.104, №12. – С. 38-42.
 8. Велицкий, А.П. Ушные шумы / А.П. Велицкий. – Л.: Медицина, 1978. – 162 с.
 9. Виленский Б.С. ПатокИнез сосудистых поражений мозга / Б.С. Виленский [и др.] // Журнал неврол. и психиат. им. С.С.Корсакова. – 1996. – Т.96, №5. – С.14-18.
 10. Герке, П.Я. Частная эмбриология человека / П.Я. Герке. – Рига: Из-во Акад. Наук ЛССР, 1957. – С.134-138.
 11. Гурин, Н.Г. Рациональное применение антибиотиков- основа их побочных эффектов / Н.Г. Гурин, А.Г. Захаренко, Г.Г. Бурак // Антибиотики и химиотерапия. – 1996. – Т. 41, №3. – С. 40-43.
 12. Еремей, А.А. Болезнь Меньера (патогенез и патогенетическая терапия) / А.А. Еремей // Кишинев: Штиинца, 1984. – 176 с.
 13. Кабак, С.Л. Необычное отхождение правой подключичной артерии / С.Л. Кабак [и др.] // Здравоохранение Белоруссии. – 1985. – №1. – С. 72-74.
 14. Киселев, В.В. Морфологическая характеристика переходящего эндолимфатического гидропса / В.В. Киселев, А.Н. Полухина // Вестник оториноларингологии. – 1989. – №5. – С. 30-35.
 15. Коваленко, В.А. Патологическая извитость магистральных артерий головы: диагностика, лечение / В.А. Коваленко, И.С. Калитко, И.А. Казанцева // Врач. – 2006. – №6. – С. 41-44.
 16. Куприянов, В.В. Анатомические варианты и ошибки в практике врача / В.В. Куприянов, Н.В. Воскресенский. – М.: Медицина, 1970. – С. 112-118.
 17. Лазюк, Г.И. Пороки развития сердечно-сосудистой системы / Г.И. Лазюк, И.И. Лазюк. В кн.: Тератология человека. – М.: Медицина, 1979. – С.150-164.
 18. Лужецкая, Т.А. Клиника нарушений кровообращения в позвоночной артерии / Т.А. Лужецкая // Журн. невролог. и психиатр. им. С.С. Корсакова. – 1962. – №11. – С.1665-1668.
 19. Нассибулин, Б.А. Морфологические изменения вестибулярного анализатора в динамике нарушений мозгового кровообращения / Б.А. Нассибулин, Н.И. Бровина // Журн. невролог. и психиатр. им. С.С. Корсакова. – 1996. – Т.91, №5. – С.73-76.
 20. Павлов, В.В. О механизме действия шума на ушной лабиринт / В.В. Павлов, С.В. Алексеев, В.Ф. Аничин // Гигиена труда и профессиональные заболевания. – 1984. – №10. – С.22-24.
 21. Пэттен, Б.М. Эмбриология человека / Б.М. Пэттен // М.: Гос. из-во мед. лит-ры. – 1959. – С.606, 652-655.
 22. Самсонова, И.В. Вертебро-базиллярная недостаточность: проблемы и перспективы решения / И.В. Самсонова [и др.] // Вестник Витебского гос. мед. ун-та. – 2006. – Т.5, №4. – С. 5-15.
 23. Солдатов, И.Б. Вестибулярная дисфункция / И.Б. Солдатов, Г.П. Сущева, Н.С Храппо // М.: Медицина, 1980. – 288 с.
 24. Фирсова, И.П. Церебральная гемодинамика при болезни Меньера / И.П. Фирсова, Р.Б. Хасанова // Вестник оториноларингологии. – 1986. – №6. – С.43-47.
 25. Cavdar, Safiye Variations in the extracranial origin of the human vertebral artery / Safiye Cavdar, Ergal Aisan // Acta anat. – 1989. – V. 135, №3. – P. 236-238.
 26. Chaturvedi, S. Ischemia in the territory of a hypoplastic vertebrobasilar system/ S. Chaturvedi [et al.] // Neurology. – 1999. – Vol. 52, №5. – P. 980-983.
 27. Fisher, C. Vertebrobasilar artery syndromes / C. Fisher, T. Breitenfeld // Acta clin. Croat. – 1999. – №38. – P. 324-328.
 28. Macchi, C. Kinking of the human internal carotid artery: a statistical study in 100 healthy subjects by echocolor Doppler / C. Macchi, M. Gulisano, F. Glonnelli // Cardiovascular Surg. (Torino). – 1997. – Т.38, №6. – P. 629-637.
 29. Nakai, Y. Histopathology of human gentamicin ototoxicity and Menieres disease/ Y. Nakai. [et al.] // Pract. otolog. – 1986. – Vol 79, №8. – P.44-52.
 30. Savitz, S.I. Vertebrobasilar disease / S.I Savitz, L.R.Caplan // N. Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 352, № 25. – P. 2618-2623.
 31. Torok, N. Old new in Meniere disease / N. Torok // Zaryngoscope. – 1977. – Vol. 87, №11. – P.1870-1877.

Поступила 06.01.2009 г.

Принята в печать 02.03.2009 г.

© МАКАРЕНКО Е.В., 2009

ДИАГНОСТИКА ЭРАДИКАЦИИ ПО УРОВНЮ АНТИТЕЛ IgG К *HELICOBACTER PYLORI* У БОЛЬНЫХ ДУОДЕНАЛЬНОЙ ЯЗВОЙ

МАКАРЕНКО Е.В.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;
кафедра терапии № 2 ФПК и ПК

Резюме. Цель работы заключалась в оценке возможности диагностики эффективности эрадикационной терапии у больных дуоденальной язвой по изменению уровня антител IgG к *H. pylori*.

Нами обследовано 89 больных (67 мужчин и 22 женщины) дуоденальной язвой исходно и через год после проведения эрадикации *H. pylori*. Средний возраст пациентов составил 42, 28±9,83 года.

Антитела IgG к *H. pylori* определяли в сыворотке крови исследуемых с помощью тестовой системы «GastroPanel» (Biohit Pic, Финляндия). Тесты основаны на технологии иммуноферментного анализа. Титр антител более 38 ЕIU считали положительным в соответствии с инструкцией к наборам для определения антител.

Результаты серологического метода сравнивали с данными быстрого уреазного теста и морфологического исследования. Для морфологического исследования во время фиброгастроэзофагодуоденоскопии (ФЭГДС) получали 2 биоптата из середины антрального отдела желудка и 2 – из середины тела желудка. Окраска препаратов осуществлялась гематоксилин-эозином, по Гимзе, ШИК-реакцией и альциановым синим (pH=1,0 и pH=2,5). Один биоптат забирали из антрального отдела для проведения быстрого уреазного теста, который проводился с помощью полуколичественной тест-системы «ProntoDry» (MIC, Швейцария).

Показателем успешной эрадикации *H. pylori* считали снижение титра сывороточных антител более 50%. Точность диагностики эрадикации по уровню антител IgG к *H. pylori* составила 87,5%, чувствительность – 83,3% и специфичность – 94,4%, предсказательная ценность положительного результата – 96,2%, отрицательного – 77,3%.

Результаты исследования свидетельствуют о высокой степени точности, специфичности и чувствительности серологического метода оценки эффективности эрадикации инфекции *H. pylori*, что позволяет использовать его в практике здравоохранения.

Ключевые слова: дуоденальная язва, антитела IgG к *H. pylori*, диагностика эрадикации.

Abstract. The aim of this study was to assess the possibility of eradication efficacy diagnosing in patients with duodenal ulcer by means of the changes in the level of *Helicobacter pylori* IgG antibody.

We examined 89 patients (67 men and 22 women) with duodenal ulcer before and one year after *H. pylori* eradication. Mean age of the patients was 42, 28±9,83 years. Antibodies IgG to *H. pylori* were determined in serum samples by test system «GastroPanel» (Biohit Pic, Finland). Determination of serum IgG was based on enzyme-linked immunosorbent assay. The titers of antibodies more than 38 EIU were considered as positive according to the kit instruction. The results of serological method were compared with those of rapid urease test and morphological examination.

During upper gastrointestinal endoscopic examination two biopsy specimens for histological examination were taken from the antrum within 2 cm from the pylorus, two gastric biopsy samples were obtained from the corpus and they were used for histological examination. Sections were stained with hematoxylin-eosin, alcian blue (pH = 1.0 and pH = 2.5) and by modified Giemsa procedure. One more biopsy specimen was taken from the antrum for rapid urease test. The rapid urease test was done with the help of the semiquantitative rapid test system «ProntoDry» (MIC, Switzerland).

The index of the successful *H. pylori* eradication was considered to be more than 50% decrease of serum antibody titer. Accuracy of the diagnosing of eradication using the level of antibodies IgG to *H. pylori* was 87,5%, sensitivity – 83,3% and specificity – 94,4%, predictive value of positive result – 96,2%, that of negative – 77,3%.

Our results indicate that serological method has a high degree of accuracy, specificity and sensitivity for efficiency estimation of *H. pylori* infection eradication, and may be used in practice of public health service.

Адрес для корреспонденции: г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, кафедра терапии № 2 ФПК и ПК, р.тел. 221997, 212292. - Макаренко Е.В.

Возможности различных способов диагностики инфекции *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) и оценки эффективности лечения после проведения эрадикации этого микроорганизма представляют интерес для исследователей в связи с тем, что *H. pylori* является причиной развития гастродуоденальных язв, большинства вариантов хронического гастрита, рака желудка и MALT-лимфомы [10].

Для диагностики хеликобактерной инфекции используют инвазивные и неинвазивные методы. Инвазивные методы диагностики осуществляются при обследовании больных с помощью фиброэзофагогастродуоденоскопии (ФЭГДС). Производится забор биопсийных образцов для проведения быстрого уреазного теста, выделения бактериальной культуры, гистологического исследования и постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР). Гистологическое исследование позволяет получить информацию о присутствии *H. pylori*, наличии воспаления, атрофии, метаплазии. Во время эндоскопического исследования может выполняться также быстрый уреазный тест, дающий высокую чувствительность и специфичность. Метод ПЦР используется для идентификации ДНК микроорганизма. Следует учитывать, что тесты, основанные на биопсии, мало информативны у больных с язвенным кровотечением [7, 12, 13].

Доказательная диагностика *H. pylori*-инфекции обычно основывается на положительных результатах, по меньшей мере, двух из четырех основанных на биопсии методов: быстрого уреазного теста, выделения культуры микроорганизма, морфологического исследования и ПЦР [14].

Проблема диагностики и оценки эрадикации *H. pylori* неинвазивными методами представляется актуальной во многих регионах мира [10]. Неинвазивные методы включают дыхательный уреазный тест и определение *H. pylori* в кале иммуноферментным методом. Дыхательный уреазный тест основан на приеме внутрь меченой ^{14}C или ^{13}C мочевины и обнаружении продуктов распада как свидетельства присутствия *H. pylori*. Он может быть использован для скрининга пациентов до проведения эндоскопического ис-

следования и как последующий тест для определения эффекта лечения путем эрадикации *H. pylori*. [13, 14]. К сожалению, в Республике Беларусь до сих пор этот метод не используется из-за относительно высокой стоимости оборудования.

Одним из удобных для пациента методов, не вызывающих неприятных субъективных ощущений, является исследование сыворотки крови. Серологический метод диагностики известен как простой и удобный метод диагностики успешной или неудачной эрадикации *H. pylori*. Проводились исследования уровня антител IgG к *H. pylori* на разных сроках после осуществления эрадикационной терапии [4, 7, 11, 14].

Возможность серологического метода диагностики эрадикации *H. pylori* оценивается в публикациях, посвященных этой проблеме, неоднозначно. Большинство проведенных исследований свидетельствуют о снижении уровня антител IgG в сыворотке крови в течение 3-6 месяцев после лечения. Чувствительность метода варьирует от 42 до 100% [9]. В Республике Беларусь ранее не проводилось определение уровня антител IgG к *H. pylori* после проведения эрадикационной терапии.

Цель работы заключалась в оценке возможности диагностики эффективности эрадикационной терапии у больных дуоденальной язвой по изменению уровня антител IgG к *H. pylori*.

Методы

Нами обследовано 89 больных (67 мужчин и 22 женщины) дуоденальной язвой до лечения и через год после проведения эрадикации *H. pylori*. Средний возраст обследованных составил $42,28 \pm 9,83$ года.

Антитела IgG к *H. pylori* определяли в сыворотке крови исследуемых с помощью тестовой системы «GastroPanel» (Biohit Pic, Финляндия). Тесты основаны на технологии иммуноферментного анализа. Для проведения исследования кровь забирали из локтевой вены объемом 10 мл, центрифугировали в течение 15 минут со скоростью 2000 G. Сыворотку замораживали и хранили до начала работы с образцами при температуре -20°C .

Выявление IgG антител к *H.pylori* основано на технике взаимодействия очищенного антигена *H. pylori* и антител. Для этого используют моноклональные антитела, меченные пероксидазой хрена. Методика определения состоит из следующих этапов. Очищенный бактериальный антиген *H.pylori*, сорбированный на поверхности 96-луночного полистиролового планшета, связывается с IgG антителами к *H.pylori*, содержащимися в человеческой сыворотке. Затем планшет промывают для удаления не связавшихся антител. Моноклональные антитела конъюгированные с пероксидазой хрена реагируют с IgG антителами, связанными с антигеном *H.pylori*, сорбированным на полистироловом 96-луночном планшете. Планшет повторно промывают для удаления не связавшихся антител и добавляют раствор тетраметилбензидина с перекисью водорода, для получения цветной реакции. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна содержанию IgG антител к *H.pylori* в испытуемых образцах. Реакцию останавливают с помощью 0,1 молярной серной кислоты, и результат реакции учитывают на автоматическом анализаторе.

Титр антител более 38 EIU считали положительным в соответствии с инструкцией к наборам для определения антител.

Результаты серологического метода сравнивали с данными быстрого уреазного теста и морфологического исследования. Для экспресс-диагностики наличия хеликобактерной инфекции проводился быстрый уреазный тест полуколичественной тест-системой «ProntoDry» (MIC, Швейцария) с биоптатом, полученным из антрального отдела желудка. Для морфологического исследования во время фиброгастроэзофагодуоденоскопии (ФЭГДС) получали 2 биоптата из середины антрального отдела желудка и 2 – из середины тела желудка. Окраска препаратов осуществлялась гематоксилин-эозином, по Гимзе, ШИК-реакцией и альциановым синим (pH=1,0 и pH=2,5).

Эрадикационная терапия основывалась на рекомендациях Маастрихтского Консенсуса. Наряду с классической тройной терапией 1-й линии, включавшей ингибитор протонной

помпы, кларитромицин и амоксициллин, часть больных использовала схемы терапии, состоящие из коллоидного субцитрата висмута, амоксициллина, фуразолидона и омепразола (или без последнего) [3]. Повторное определение антител IgG к *H. pylori* и ФЭГДС с забором гастробиоптатов для осуществления быстрого уреазного теста и морфологического исследования осуществляли через год после лечения.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием U-теста Mann-Whitney с помощью пакета программ Statistica 6,0 (StatSoft Inc., Okla., USA). Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Определялись общепринятые диагностические характеристики: чувствительность, специфичность и точность диагностики [1].

Результаты и обсуждение

По результатам уреазного теста и морфологического исследования были сформированы группы больных с полной эрадикацией, частичной элиминацией и отсутствием эрадикации инфекции *H. pylori*. При наличии полной эрадикации оба теста были отрицательными, при ее отсутствии – оба положительными, при частичной элиминации уреазный тест был отрицательным, морфологическое исследование подтверждало наличие *H. pylori* в гастробиоптатах, однако плотность контаминации этого микроорганизма снижалась. Все три группы не различались по возрасту, длительности заболевания, методам лечения. Исходный уровень антител в группах достоверно не отличался ($p > 0,1$).

Полученные нами результаты продемонстрировали статистически значимое снижение уровня антител IgG к *H. pylori* в группе больных с успешной эрадикацией и частичной элиминацией *H. pylori*. В то же время, в группе с отсутствием эрадикации достоверных изменений этого показателя не произошло (табл.).

Такой характер изменений уровня антител связан с тем, что после проведения эрадикационной терапии происходит снижение плотности колонизации *H. pylori* различной степени выраженности. Полное исчезновение

Таблица

Изменение уровня антител к *Helicobacter pylori* через год после эрадикации

Группы больных	Показатели	Уровень антител IgG к <i>H. pylori</i>		Изменение уровня антител в % к исходному значению
		До лечения	После лечения	
Полная эрадикация n=30	M±σ	94,30±32,43	32,22±18,72	65,00±15,45
	p	<0,001		
Отсутствие эрадикации n=18	M±σ	84,78±38,11	72,82±32,55	10,60±22,95
	p	0,361		<0,001*
Частичная элиминация n=41	M±σ	89,24±34,80	52,90±28,34	39,23±28,68
	p	<0,001		<0,001*

Примечание: * – по отношению к группе больных с успешной эрадикацией.

микроорганизма в группе больных с успешной эрадикацией привело к значительному снижению титра антител, почти в 3 раза. При частичной элиминации *H. pylori* происходит менее значимое уменьшение количества сывороточных антител в связи с тем, что сохраняется персистенция уменьшившегося клона микробных тел. В группе с неуспешной эрадикацией также намечается тенденция к уменьшению уровня антител IgG к *H. pylori*. Вероятно, это связано с тем, что проведенная терапия в определенной степени уменьшила колонизацию микроорганизма.

Аналогичные изменения наблюдались и другими авторами. В исследовании, проведенном японскими учеными, было отмечено, что титр антител у пациентов с персистирующей инфекцией снизился почти на 40%, а примерно у 5% пациентов с сохранившейся инфекцией *H. pylori* появились отрицательные результаты серологической диагностики инфекции *H. pylori*. Было установлено, что у больных с постоянной инфекцией *H. pylori* годовой уровень спонтанной сероконверсии составлял около 2%. Количество пациентов с успешной эрадикацией, по результатам серологической диагностики спустя 1, 2, 3 и 4 года после лечения, составило 23%, 41%, 52% и 61% соответственно. Уровень антител у пациентов этой группы был ниже 50 U/мл. Напротив, у больных с персистирующей *H. pylori*-инфекцией титр антител к *H. pylori*

оставался выше 50 U/мл в течение 4 лет, и только у 2-2,5% пациентов этой группы уровень антител к *H. pylori* спонтанно уменьшился ниже 50 U/мл. Известно, что спонтанная сероконверсия чаще наблюдается у пациентов с выраженной атрофией слизистой оболочки желудка [10].

Для оценки наступления эрадикации после проведения лечения в качестве пограничного значения (точка cut-off) нами было выбрано снижение титра антител IgG к *H. pylori* на 50% от исходного уровня. Для расчета показателей точности, специфичности и чувствительности использовались значения уровня сывороточных антител IgG к *H. pylori*, полученные для двух групп больных: с успешной эрадикацией *H. pylori* и отсутствием эрадикации. Число истинноотрицательных значений в двух группах составило 17 случаев, ложноположительных – 1, ложноотрицательных – 5, истинноположительных – 25. Исходя из полученных результатов, точность диагностики эрадикации по уровню антител IgG к *H. pylori* составила 87,5%, чувствительность – 83,3% и специфичность – 94,4%, предсказательная ценность положительного результата – 96,2%, отрицательного – 77,3%.

В группе больных с частичной элиминацией хеликобактерной инфекции наблюдались разнонаправленные изменения уровня антител IgG к *H. pylori*. Снижение уровня антител различной степени выраженности про-

изошло у 38 пациентов (92,7%), в то время как у трех (7,3%) – титр антител повысился. На 50% и больше содержание сывороточных антител уменьшилось у 15 человек (36,6%), у 23 больных (56,1%) уровень антител IgG к *H. pylori* снизился меньше, чем на 50%.

Попытки определения антител IgG к *H. pylori* предпринимались различными авторами для оценки результатов эрадикации хеликобактерной инфекции. При обследовании 318 пациентов, проведенном F. Lerang с соавторами, было установлено, что уменьшение титра антител IgG к *H. pylori* на 40% или более через 3-6 месяцев после лечения свидетельствовало об эрадикации *H. pylori* [4]. При этом чувствительность метода составила 93%, а специфичность – 100%. В проведенном в Бельгии исследовании с участием 247 пациентов уменьшение в IgG титра антител на 50% и более в течение 3-6 месяцев после лечения подтверждало факт эрадикации *H. pylori*. Чувствительность метода равнялась 44%, а специфичность – 87% [6].

В исследовании, проведенном в России, снижение уровня антител на 20% по сравнению с исходными показателями через 4 недели после лечения расценивалось как эрадикация *H. pylori*, а отсутствие изменений, повышение или снижение титра антител менее чем на 20% – как неэффективное лечение. Чувствительность и специфичность серологического метода оценки эффективности эрадикации в данном исследовании были около 90% [2]. В сообщении, касающемся изучения серологической диагностики эрадикации хеликобактерной инфекции у 43 американских пациентов, отмечено, что в случае положительного результата спустя 12-21 месяц после лечения происходит снижение концентрации IgG на 20%, чувствительность метода составила 93% [5].

В ряде исследований, проведенных через 3-12 месяцев после лечения, сообщается, что снижение титра IgG антител на 20% и более расценивается как эрадикация *H. pylori*. Чувствительность и специфичность метода составили 80% или выше [4, 11, 14].

В Японии установлен показатель успешной эрадикации *H. pylori* – снижение титра ан-

тител IgG *H. pylori* на 60% по сравнению с исходными значениями через 1 год после эрадикации. Чувствительность метода составила 90% и специфичность – 87%. [10].

Отличия в результатах точности серологической диагностики успешной эрадикации *H. pylori*, полученные рядом исследователей, могут быть связаны с использованием наборов, выпускаемых разными производителями, а также особенностями изучаемой популяции.

Полученные нами результаты исследования свидетельствуют о высокой степени точности, специфичности и чувствительности серологического метода оценки эффективности эрадикации инфекции *H. pylori*, что позволяет использовать его в практике здравоохранения.

Заключение

1. Снижение уровня антител IgG к *H. pylori* на 50% по сравнению с исходным уровнем свидетельствует об эрадикации хеликобактерной инфекции.

2. Точность диагностики эрадикации по уровню антител IgG к *H. pylori* составила 87,5%, чувствительность – 83,3% и специфичность – 94,4%, предсказательная ценность положительного результата – 96,2%, отрицательного – 77,3%.

Литература

1. Власов, В. В. Эффективность диагностических исследований / В. В. Власов. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.
2. Исаков, В. А. Хеликобактериоз / В. А. Исаков, И. В. Доморадский. – М.: ИД «Медпрактика», 2003. – 412 с.
3. Пиманов, С. И. Анализ эффективности протоколов эрадикации инфекций *Helicobacter pylori* / С. И. Пиманов, Е. В. Макаренко // Репецт. – 2005. – № 1. – С. 19-23.
4. Accuracy of IgG serology and other tests in confirming *Helicobacter pylori* eradication / F. Lerang [et al.] // Scand. J. Gastroenterol. – 1998. – Vol. 33. – P. 710-715.
5. Cutler, A. F. Long term follow-up of *Helicobacter pylori* serology after successful eradication / A. F. Cutler, V. M. Prasad // Am. J. Gastroenterol. – 1996. – Vol. 91. – P. 85-88.
6. Effect of antimicrobial therapy on the specific serological response to *Helicobacter pylori* infection / Y. Glupczynski [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1992. – Vol. 11. – P. 583-588.
7. Go, M. F. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection / M. F. Go // Aliment. Pharmacol. Ther. – 2002. – Vol. 16. – Suppl. 1. – P. 3-15.

8. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer / N. Uemura [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2001. – Vol. 345. – P. 784-789.
9. Herbrink, P Serological methods for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and monitoring eradication therapy / P. Herbrink, L. J. van Doorn // Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis. – 2000. – Vol. 19. – P. 164-173.
10. Host serological response to *Helicobacter pylori* after successful eradication: long-term follow-up in patients with cured and persistent infection / J. Tanaka [et al.] / Aliment. Pharmacol. Ther. – Vol. 24. – Suppl. 4. – P. 239-248.
11. Longterm follow-up and serologic assessment after triple therapy with omeprazole or lansoprazole of *Helicobacter*-associated duodenal ulcer / L. Fanti [et al.] // J. Clin. Gastroenterol. – 2001. – Vol. 32. – P. 45-48.
12. Review article: *Helicobacter pylori* infection from pathogenesis to treatment – a critical eappraisal / D. Vaira [et al.] // Aliment. Pharmacol. Ther. – 2002. – Vol.16. – Suppl. 4. – P.105–113.
13. The Efficacy of Laboratory Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infections in Gastric Biopsy Specimens in Related to Bacterial Density and *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes / L. J. van Doorn [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2000. – Vol.38, N.1. – P. 13-17.
14. Usefulness of serological IgG antibody determination for confirming eradication of *Helicobacter pylori* infection / P. Marchildon [et al.] // Am. J. Gastroenterol. – 1999. – Vol. 94. – P. 2105-2108.

Поступила 01.12.2008 г.
Принята в печать 02.03.2009 г.



ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С МЕДИАЛЬНЫМИ ПЕРЕЛОМАМИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ

КАРЕВ Д.Б., КАРЕВ Б.А., БОЛТРУКЕВИЧ С. И., ГОРБАЧЁВ А. Е.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»,
УЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи г.Гродно»

Резюме. Медиальные переломы бедренной кости, несмотря на многообразие предлагаемых методов хирургического лечения, создают трудности в реабилитации пациентов; неудовлетворительные исходы достигают 23-57%. До настоящего времени изучаются причины «местных» осложнений, таких, как несращение перелома, аваскулярный некроз головки бедренной кости, коксартроз. Авторами исследованы результаты лечения 216 пациентов в сроки от 1 до 5 лет, систематизированы основные 4 группы ошибок и осложнений с определением основных направлений их коррекции и профилактики.

Ключевые слова: пожилой возраст, остеопороз, медиальный перелом, остеосинтез, органосохраняющие вмешательства, ошибки и осложнения.

Abstract. In spite of the variety of the suggested surgical treatment methods medial femoral neck fractures cause difficulties in the rehabilitation of patients, unsatisfactory outcomes reaching 23-57%. Up to the present time the reasons of “local” complications such as nonaccretion of a fracture, avascular necrosis of femoral neck, coxarthrosis are studied. The authors have investigated the results of treatment of 216 patients during the period from 1 to 5 years, have systematized the main 4 groups of errors and complications with the determination of principal directions of their correction and prevention.

Переломы проксимального отдела бедренной кости по данным различных авторов составляют от 15 до 17% среди повреждений костей опорно-двигательного аппарата. 50-55% приходится на долю медиальных (внутрисуставных), частота которых составляет 20,7 на 10 тыс. населения, число таких больных имеет стойкую тенденцию к увеличению. В 70-75% эти травмы возникают у лиц пожилого и старческого возраста [1,2].

Своеобразие этого контингента пациентов, анатомо-функциональные характеристики тазобедренного сустава, разнообразная патология общесоматического, психического и

локального характера создают значительные трудности в их лечении и реабилитации и являются причинами неудовлетворительных исходов в 58-89% и высокой летальности – до 22,2-27,6%. Все это дает основание рассматривать эту патологию как одну из наиболее сложных проблем современной гериатрической травматологии [3, 4, 5, 6, 10, 12, 13].

В литературе имеются также указания на возрастающую частоту медиальных переломов бедренной кости у лиц молодого и трудоспособного возраста. По данным различных авторов, у указанных категорий пациентов травмы данной локализации составляют от 25 до 33,2%, при этом имеется тенденция к «омолаживанию» патологии, а результаты лечения у этих групп пациентов существен-

Адрес для корреспонденции: 230009, г.Гродно, Горького, 80, Гродненский медицинский университет.
- Карев Д.В..

но не отличаются от таких показателей у пожилых [9, 11].

Обоснована тактика раннего хирургического лечения пациентов с медиальными переломами бедренной кости и целесообразность выполнения оперативных вмешательств по экстренным показаниям. Однако выбор метода операций до настоящего времени остается проблематичным. Продолжаются поиски оптимальных способов остеосинтеза, фиксирующих конструкций, технологических приемов, упрощающих технику, снижающих травматичность вмешательства и повышающих его надежность [7, 8, 11, 14, 15, 19, 20].

До настоящего времени изучаются причины «местных» осложнений, таких, как несращение перелома, аваскулярный некроз головки бедренной кости, коксартроз. Большинство авторов связывают их с нарушением кровоснабжения проксимального фрагмента бедренной кости [16, 17, 18].

Изучение проблемы лечения больных с медиальными переломами бедренной кости в клинике травматологии, ортопедии и ВПХ ГрГМУ проводится на протяжении ряда десятилетий (минимально травматичный остеосинтез винтами, разработана технология металлокостнопластического и реконструктивно-металлокостнопластического остеосинтеза, эндопротезирования головки бедренной кости эндопротезом металлополимерной конструкции), отработаны алгоритмы подхода к выбору способов лечения пациентов с переломами данной локализации. Значительная частота неудовлетворительных исходов лечения больных с данной патологией, как по сведениям литературы, так и по нашим наблюдениям побудила нас к проведению анализа допущенных ошибок и возникших осложнений в процессе лечения в нашей клинике и выработке путей их профилактики.

Методы

Работа основана на наблюдении за 385 больными с медиальными переломами бедренной кости, лечившихся в клинике травматологии, ортопедии ГрГМУ. Среди них преобладали лица пожилого и старческого воз-

раста (263 или 69,1%) и женского пола (232 или 60,2%). Среди больных в возрастных группах до 60 лет мужчин отмечено почти в 2 раза больше (80 к 43), чем женщин. В более преклонном возрасте соотношение обратное (73 к 189) с существенным превалированием лиц женского пола. Мы связываем это с обстоятельствами травмы (преобладание у мужчин в более молодых возрастных группах падения с высоты или нарушения координации и падения после употребления алкоголя), остеопорозом (более существенное прогрессирование его у женщин после 50 лет) и демографической ситуацией. В 87,8% наблюдений отмечена общесоматическая патология.

Рентгенологические исследования позволили у 88,2% установить наличие аддукционного перелома (3-4 степень смещения по классификации Гардена), 61,2% отнесены к 3-й группе по классификации Павелса. По локализации и характеру плоскости излома: в 34,6% – переломы субкапитальные, в 53,9% – трасцервикальные, базальные – в 5,3%, диагональные – в 6,2% (в 19,3% из общего числа переломы носили оскольчатый характер).

Сопоставляя характеристику переломов по рентгенологическим признакам у лиц пожилого и старческого возраста с пациентами трудоспособного возраста, следует отметить большую частоту в первой группе субкапитальных, оскольчатых и диагональных переломов. В то же время, у другой категории больных смещение фрагментов в более выраженных степенях отмечено чаще.

Оперативные вмешательства выполнялись в зависимости от ряда факторов: общесоматического и психического статуса, локализации, характера перелома, степени его стабильности, выраженности остеопороза, возраста пациентов и др. 123 пациентам трудоспособного возраста произведены органосохраняющие операции: остеосинтез ангулярной пластиной АО-39, винтами АО-31, двумя конструкциями-15, МКО-28, РМКО- 8 больным. 2-м пациентам выполнено тотальное эндопротезирование тазобедренного сустава протезом «Алтимед».

В группе пациентов пожилого и старческого возраста (262) 222-м произведен ос-

теосинтез в различных вариантах: остеосинтез ангулярной пластиной АО-78, винтами АО-98, двумя конструкциями-38, МКО-8, эндопротезирование-40, при этом, 38 больным имплантировали однополюсный и 2-тотальный протез. Эндопротезирование головки бедренной кости у 12 пациентов произвели оригинальным металлополимерным эндопротезом, у 12-Томпсона, у 6-Мура-ЦИТО, у 4-Споторно и у 4-Протек.

Оценивая характер выполненных операций, следует отметить, что у пациентов пожилого и старческого возраста относительно чаще производилось эндопротезирование (особенно головки бедренной кости), в то время как у больных трудоспособного возраста существенно преобладали органосохраняющие операции в виде металлоостеосинтеза, а также костнопластические и реконструктивные вмешательства (МКО и РМКО).

Результаты обсуждения

Результаты лечения прослежены в сроки от 1 до 5 лет у 216 пациентов, среди которых 82 – лица трудоспособного возраста и 134 – старше 60 лет. При этом оценка их производилась по 3-х балльной системе. Хорошим считали результат в случае консолидации перелома, полного восстановления функции конечности; отсутствия или появления болей при продолжительной нагрузке и исчезновении в покое; отсутствия укорочения или наличия его в пределах 1,5-2 см; сохранения объема движений не менее 80% относительно нормального; отсутствия контрактуры; возможности ведения образа жизни аналогично тому, что было до травмы. При удовлетворительном результате отмечалась консолидация перелома с коллапсом головки до 1/3 ее или коксартроза I-II ст., наличие болей при умеренной нагрузке с ликвидацией их в процессе ночного отдыха, укорочение конечности до 3 см, восстановление объема движений в пределах 60% относительно нормального, наличие контрактуры в функционально благоприятном положении, восстановление опорной функции конечности в пределах возможности самообслуживания.

Неудовлетворительным считали результат при отсутствии консолидации перелома или наличии тотального аваскулярного некроза головки бедренной кости и коксартроза III ст., постоянных болях в тазобедренном суставе, усиливающихся при движении, укорочении конечности более 3 см, ограничения объема движений менее 60% от нормального, контрактура в функционально неблагоприятном положении, отсутствии возможности передвижения без костылей или вынужденный постельный режим, т.е. ограничение функциональной активности и невозможности самообслуживания.

Среди пациентов первой группы хорошие результаты отмечены у 51 (62,2%), удовлетворительные – у 21 (25,6%), и неудовлетворительные – у 10 (12,2%).

Во второй группе хорошие результаты отмечены у 57 (42,6%), удовлетворительные – у 54 (40,3%) и неудовлетворительные – у 23 (17,1%).

Таким образом, хорошие результаты получены у 108(50%), удовлетворительные – у 75 (37,7%) и неудовлетворительные – у 33 (15,3%).

Осложнения при лечении пациентов с медиальными переломами объясняются неоднозначно. Большинство исследователей указанные проблемы (несращение медиального перелома как основной показатель неудовлетворительных результатов) связывали с ошибками и осложнениями технического порядка при проведении оперативного вмешательства и послеоперационного ведения больных. Так, ряд авторов связывают это с неправильной адаптацией отломков, с погрешностями введения фиксатора, его миграцией и ранней нагрузкой на оперированную конечность. Ряд исследователей склонны считать неудовлетворительные результаты следствием анатомических и физиологических нарушений в тазобедренном суставе (и прежде всего с нарушением кровоснабжения проксимального фрагмента).

Есть мнение, что причины неудач связаны с характером перелома и нестабильностью, раздробленностью или большой степенью смещения фрагментов.

На наш взгляд, причинами неудовлетворительных результатов в значительной части

являются ошибки 18 из 216 (8,33%), допущенные в процессе лечения пациентов. Представляется возможным распределение их по следующим группам:

- 1) ошибки предоперационного планирования – 4 случая в наших наблюдениях;
- 2) ошибки технического порядка – 11;
- 3) ошибки послеоперационного ведения – 3.

К ошибкам первой группы следует отнести неадекватную оценку степени выраженности остеопороза (2 наблюдения), локализации перелома (2 наблюдения) и характеристики перелома (расположение плоскости излома по Павелсу, смещение фрагментов 4 степени по Гардену). В 2-х наблюдениях вследствие неадекватной оценки остеопороза была произведена фиксация винтами, в послеоперационном периоде отмечена миграция винтов с последующим смещением фрагментов, при этом у одной пациентки возникло несращение перелома (неудовлетворительный результат), в другом случае консолидация в варусном положении (результат лечения отнесен к удовлетворительному). Мы склонны расценивать как ошибку выполнение остеосинтеза двумя губчатыми винтами АО при базисцервикальных переломах у молодых пациентов. Основанием для этого послужили 2 наблюдения, когда при технически правильно осуществленной операции произошла консолидация с варусным смещением фрагментов и укорочением конечности.

К категории ошибок предоперационного планирования отнесены 2 наблюдения за пациентами с оскольчатыми переломами типа Π_3 , Γ_4 , которым произведен остеосинтез ангулярной пластиной. В последующем отмечен лизис шейки, смещение фрагментов, несращение перелома, пролабирование пластины (при развивающемся, в таком случае, укорочении шейки бедра) в вертлужную впадину и развитием коксартроза. Представляется, что применение в этих наблюдениях реконструктивного остеосинтеза способствовало бы достижению более благоприятных результатов.

Наибольшее число ошибок (9) отмечено при анализе оперативных вмешательств, при этом у 4-х пациентов отмечены по 2 техни-

ческие ошибки. К ошибкам технического порядка отнесены следующие: неправильная интерпретация рентгенограмм из-за низкого их качества – 2, недостаточная адаптация отломков – 3, неправильное расположение фиксатора – 3, неправильный подбор длины фиксатора – 3, диастаз между фрагментами – 2.

В 2-х наблюдениях при выполнении закрытого остеосинтеза после рентгенографии было констатировано правильное сопоставление отломков, на основании чего произведен остеосинтез ангулярной пластиной в одном наблюдении и двумя конструкциями в другом. Последующая рентгенография с помощью стационарного аппарата позволила установить наличие ротационного смещения головки при субкапитальных переломах (определение по косвенным признакам – неконгруэнтности плоскостей излома). В одном из этих наблюдений позже произведен открытый реостеосинтез, в другом – пациент отказался от повторной операции.

Ошибки, расцененные как неудачная адаптация отломков, отмечены в 3-х наблюдениях и заключались в 2-х из них в сохранении чрезмерного отклонения головки кзади (на $30-35^\circ$) и в одном – перерастяжение фрагментов и выполнение остеосинтеза при наличии шеечно-диафизарного угла 150° . В процессе выполнения остеосинтеза у одного из пациентов с неустранённой ретроверзией внутрикостная часть ангулярной пластины, была внедрена в передне-верхний полюс головки. В послеоперационном периоде произошло смещение фрагментов и несращение перелома. В 2-х других – переломы срослись, однако, развился аваскулярный некроз головки с ограниченным её коллапсом (удовлетворительные результаты).

В 3-х наблюдениях неудовлетворительные результаты связываем с недостаточно правильным введением ангулярной пластины (в верхний или передний полюс головки). Считаем, что наиболее оптимальным вариантом расположения фиксатора при медиальных переломах должно быть ниже и вблизи центра шейки и головки, с которой на нижний кортикальный слой, при этом направление введения фиксатора должно быть перпендикуляр-

но плоскости перелома. Такое размещение конструкции способствует созданию наиболее прочной фиксации фрагментов и даёт возможность физиологической компрессии в зоне перелома в послеоперационном периоде.

В 3-х наблюдениях были допущены ошибки, связанные с введением фиксаторов несоответствующей длины (в 2-х случаях – чрезмерно короткие, что привело ко вторичному смещению фрагментов и несращению перелома, в одном наблюдении – проникновение центрального конца пластины за пределы головки бедренной кости (произошла консолидация перелома, однако развился коксартроз II ст.). На основании литературных сведений и собственных наблюдений считаем целесообразным подбор металлических конструкций такой длины, чтобы они достигали субкортикального слоя головки бедренной кости (т.е. для фиксации использовать не менее 2/3 длины проксимального фрагмента).

И, наконец, среди допущенных технических ошибок у 2-х пациентов отмечена недостаточная импакция фрагментов при использовании в качестве фиксаторов в одном наблюдении ангулярной пластины, в другом – винтов. В этих наблюдениях на итоговых интраоперационных рентгенограммах ретроспективно установлен диастаз до 4-5 мм, что, вероятно, в последующем стало одной из причин неблагоприятных исходов.

Трудности в систематическом наблюдении за пациентами в послеоперационном периоде не позволяют дать исчерпывающую оценку факторам, способствующим развитию осложнений в этот период. На основании контактов с нашими пациентами мы установили в 3-х наблюдениях ошибки послеоперационного ведения в виде преждевременной нагрузки на оперированную ногу (спустя 4 мес. после операции). Консолидация перелома у этих пациентов произошла с развившимся асептическим некрозом и варусным смещением отломков, в связи с чем результаты их лечения отнесены к удовлетворительным.

Таким образом, ретроспективный анализ наблюдений за пациентами с неудовлетворительными исходами позволяет заключить, что

у подавляющего большинства из них допущены ошибки тактического и технического характера. Не исключена роль фактора нарушения кровоснабжения, поскольку у всех пациентов с неудовлетворительными результатами отмечено практически полное рассасывание шейки, а у подавляющего большинства – асептический некроз головки.

Основными факторами возникновения таких осложнений, как асептический некроз головки и коксартроз, скорее всего, явилось расстройство кровоснабжения проксимального фрагмента и допущенные ошибки при выполнении остеосинтеза и послеоперационного ведения больных. В какой-то мере в пользу первой из названных причин является увеличение частоты этих осложнений по мере возрастания сроков между травмой и операцией, а также степени смещения фрагментов.

Заключение

1. Сокращение числа ошибок лечебно-тактического характера является одним из вероятных направлений достижения более благоприятных результатов в лечении больных с медиальными переломами бедренной кости.

2. Выбор метода оперативного вмешательства, а также конструкций при остеосинтезе должен осуществляться с учетом характеристик перелома, степени остеопороза, соматического состояния пациента и его возможности в выполнении послеоперационных рекомендаций.

3. Основной причиной ошибок в процессе выполнения закрытого остеосинтеза является несоблюдение технологии операции: недостаточная репозиция, неадекватное направление введения фиксатора, недостаточная его длина и низкое качество рентгенологического обследования.

Литература

1. Абузьяров, Р. И. Современные методы лечения переломов шейки бедренной кости / Р. И. Абузьяров // Medline [Электронный ресурс]. – 2001.
2. Анкин, Л. Н. Практическая травматология. Европейские стандарты диагностики и лечения / Л. Н. Анкин, Н. Л. Анкин. – М.: Книга-плюс. – 2002. – 480 с.

3. Басов, С. В. Обоснование дифференцированного подхода к оперативному лечению несросшихся переломов шейки бедренной кости: автореф. дис. канд. мед. наук : 14.00.22 / С. В. Басов; ГУ ЦНИИ им. Н.Н. Приорова, Обл. клинич. больница г. Ростова-на-Дону. – М., 2003. – 22 с.
4. Восстановительное лечение больных пожилого и старческого возраста с переломами проксимального отдела бедренной кости в послеоперационном периоде / А. П. Николаев [и др.] // Кремлевская медицина. Клин. вестн. – 2001. – № 5. – С. 42-43.
5. Демичев, Н. П. Ошибки и осложнения при оперативном лечении переломов шейки бедренной кости у больных пожилого и старческого возраста / Н. П. Демичев, В. И. Сабодашевский. – М.: ЦИТО. – 1978. – С. 110-113.
6. Дифференцированный подход к лечению переломов шейки бедренной кости у больных пожилого и старческого возраста / Г. М. Кавалерский [и др.] / ММА им. И. М. Сеченова, Городская клин. б-ца им. С. П. Боткина // Медицинская помощь. – 2005. – № 1. – С. 27-30.
7. Закрытый компрессионный остеосинтез при переломах шейки бедренной кости способом авторов / Н. В. Белинов [и др.] // Вестник травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. – 2005. – № 1. – С. 16-18.
8. Зоря, В. И. Оперативное лечение ложных суставов шейки бедренной кости / В. И. Зоря, М. В. Паршиков, А. Г. Матвеев // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 1996. – № 2. – С. 25-27.
9. К вопросу о лечении пациентов с переломами шейки бедренной кости в молодом и среднем возрасте / Б. А. Карев [и др.] // Матер. У11 съезда травматологов-ортопедов РБ. – 2002. – С. 181-183.
10. Клюквин, И. Ю. Современные аспекты оказания помощи больным пожилого и старческого возраста с переломами проксимального отдела бедренной кости / И. Ю. Клюквин, В. В. Антонов // Медицина критических состояний. – М.: Анахарсис, 2005. – № 2. – С. 13-17.
11. Ломтатидзе, Е. Ш. Комплексная оценка результатов хирургического лечения внутрисуставных переломов шейки бедренной кости / Е. Ш. Ломтатидзе // Вестник травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. – 2005. – № 3. – С. 11-15.
12. Критерии выбора тактики лечения переломов шейки бедра в пожилом возрасте / Э. В. Пешехонов [и др.] // Военно-медицинский журнал. – 2007. – Т. 328, № 1. – С. 67.
13. Кузьмина, Л. И. Медико-социальные последствия перелома шейки бедра у пожилых / Л. И. Кузьмина, О. М. Лесняк, Н. Л. Кузнецова // Клини. геронтология. – 2001. – № 9. – С. 22-26.
14. Лирцман, В. М. Проблема лечения переломов шейки бедра на рубеже столетий / В. М. Лирцман, В. И. Зоря, С. Ф. Гнетецкий // Вестник травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова. – 1997. – № 2. – С. 12-19.
15. Alho, A. Internally fixed femoral neck fractures. Early prediction of failure in 203 elderly patients with displaced fractures / A. Alho, J. G. Benterud, S. Solovieva // Acta Orthop. Scand. – 1999. – Vol. 70. – P. 141-144.
16. Bachiller, F. G. Avascular necrosis of the femoral head after femoral neck fracture / F. G. Bachiller, A. P. Caballer, L. F. Portal // Clin. Orthop. – 2002. – Vol. 399. – P. 87-109.
17. Bonnaire, F. A. The influence of haemarthrosis on the development of femoral head necrosis following intracapsular femoral neck fractures / F. A. Bonnaire, A. T. Weber // Injury. – 2002. – Vol. 33. – Suppl. 3. – P. 33-40.
18. Bosch, U. Reduction and fixation of displaced intracapsular fractures of the proximal femur / U. Bosch, T. Schreiber, C. Krettek // Clin. Orthop. – 2002. – Vol. 399. – P. 59-71.
19. Fehr, H. R. Osteosynthesis in dislocated femoral neck fracture (Garden 3 and 4). Long-term results and treatment concept. Article in German / H. R. Fehr, W. Steiner, B. Noesberger // Helv. Chir. Acta. – 1993. – Vol. 59, N 4. – P. 539-42.
20. Femoral neck fracture. Osteosynthesis or which endoprosthesis is indicated? Article in German / G. Mollenhoff [et al.] // Orthopade. – 2000. – Vol. 29, N 4. – P. 288-293.

Поступила 02.03.2009 г.

Принята в печать 02.03.2009 г.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

САВИЦКИЙ С.Э.

*УО «Гродненский государственный медицинский университет»,
УОЗ «Гродненская областная клиническая больница»*

Резюме. Последние 25 лет были отмечены поистине революционными событиями в фундаментальной онкологии. Бурное развитие молекулярной генетики, в частности открытие онкогенов и антионкогенов, кардинально видоизменило представления о механизмах возникновения новообразований. В настоящее время необходимо масштабное внедрение молекулярно-генетических подходов на всех этапах онкологической помощи, т.е. в профилактике, диагностике, лечении и мониторинге пациентов.

Ключевые слова: рак молочной железы, наследственность, распространенность, мутации.

Abstract. Last 25 years have been really characterized by revolutionary events in the field of fundamental oncology. Rapid development of molecular genetics, in particular the discovery of oncogenes and antioncogenes, has cardinaly altered the notions about the mechanisms of neoplasms development. At present large-scale introduction of molecular-genetic approaches at all stages of the oncologic aid, i.e. in preventive medicine, diagnosing, treatment and monitoring of patients is necessary.

Современные тенденции нарастания показателей заболеваемости выдвигают рак молочной железы (РМЖ) на первое место в структуре онкологической заболеваемости женщин. Ежегодно в мире выявляют около 1 млн. случаев рака молочной железы. Прогнозируется рост числа заболеваний к 2010 г. до 1,45 млн. Рак молочной железы составляет 23% от всех новообразований у женщин. Социальное значение РМЖ настолько велико, что научные исследования с целью решения данной проблемы занимают одно из ведущих мест в современной онкологии. Предполагают, что на протяжении жизни одна из 8 женщин в США заболеет РМЖ и одна из 30 заболевших РМЖ умрет. По мнению бело-

русских ученых, при условии сохранения такой эпидемиологической ситуации риск возникновения рака молочной железы будет реальным для каждой десятой женщины [1]. Вероятность заболеть РМЖ в России в предстоящей жизни для новорожденной девочки составляет 3,5%, а умереть от него – 1,8%.

За последние 18 лет рак молочной железы является одной из наиболее частых причин смерти у женщин. В Республике Беларусь в течение последних десяти лет наблюдается (с 1998 по 2007 гг.) увеличение показателя заболеваемости РМЖ с 55,3 до 69,5 на 100 тыс. женского населения. Прирост заболеваемости оставил 25,7%. Абсолютное число вновь заболевших раком молочной железы в 2007 году 3632 против 2508 больных РМЖ в 1993 году. В структуре онкологической заболеваемости среди женского населения Беларуси РМЖ занимает второе место и удельный вес

Адрес для корреспонденции: 230017, г.Гродно. ул. БЛК, 52. УОЗ «Гродненская областная клиническая больница» тел. 8 0152 43 01 65, факс. 8 0152 43 62 30, e-mail: savicki@mail.grodno.by – Савицкий С.Э.

этой патологии составляет 17,7%, а в структуре общей заболеваемости – пятое место. В России за период с 1980 по 1999 г. заболеваемость РМЖ увеличилась на 70% – с 22,6 до 38,3 на 100 тыс. женского населения, а среди злокачественных новообразований – на 100 тыс. женского населения приходится 277,9 случаев РМЖ [2], или первое место в структуре заболеваемости; в течение первого года с момента установления диагноза РМЖ на 2003 год летальность составила 12,1%.

Молекулярные и генетические аспекты канцерогенеза при РМЖ

Главной причиной роста заболеваемости РМЖ является заметное увеличение доли людей, достигающих пожилого возраста. Вероятность заболеть РМЖ увеличивается с возрастом. Риск РМЖ в течение 10 лет составляет 1:72 для женщин 40–49 лет, 1:36 – для женщин 50–64 лет и 1:29 – для женщин старше 70 лет. Действительно, несмотря на относительно частую встречаемость РМЖ у молодых женщин, риск данного заболевания после 65 лет в 150 раз превышает таковой у лиц моложе 30 лет. Хотя известно несколько десятков факторов риска РМЖ, их можно условно разделить на две категории:

1) поведенческие или наследственные особенности, ассоциированные с гиперэстрогенией;

2) наследственная неполноценность систем обеспечения целостности генома [3].

Согласно современным представлениям о канцерогенезе, в основе злокачественной трансформации клеток лежит активация единичных или множественных клеточных онкогенов или генов-супрессоров опухолей (ГЕН p53, ГЕН RB) [3]. Онкогены – это активированные вследствие мутаций или по другим причинам клеточные протоонкогены, продукты которых стимулируют одну из стадий раковой прогрессии клетки, действуя доминантным образом, или гены онкогенных вирусов, вызывающие малигнизацию клеток и образование раковых опухолей.

Протоонкогены – гены, участвующие в регуляции транскрипции, росте, передаче сиг-

налов внутри клетки и т.д. При изменении их структуры или экспрессии нарушаются процессы нормального клеточного цикла.

Гены-супрессоры (антионкогены, рецессивные опухолевые гены) кодируют белки, участвующие в пролиферации.

Подсчитано, что, по крайней мере, шесть изменений на генетическом уровне требуется для развития злокачественного клона [4]. С точки зрения биологии опухолей ожидается, что эти гены влияют на разнообразные функции, включающие, среди прочих, имортализацию, независимый от закоривания рост, тканевую инвазионность и ангиогенез. Развитие опухолей – это сложный многоэтапный процесс, который контролируется большим числом разных генов. Каждый этап зависит от наличия или отсутствия целого ряда белков, т.е. от экспрессии или «молчания» ряда генов. Возможны разные пути реализации программы, ведущей к превращению относительно доброкачественной первичной опухоли в злокачественную и метастазирующую [4].

Изменения в геноме клетки могут быть закрепленными в геноме (абберации) и, следовательно, передаваться по наследству либо возникают в клетке в результате каких-то внешних или внутренних мутагенов.

К структурным компонентам генома, контролирующим возникновение, рост, гибель клетки относят протоонкогены, гены-супрессоры, гены-модуляторы. Гены-модуляторы – гены, способствующие распространению опухоли в организме, но не регулирующие само перерождение клетки в злокачественную [5].

Прогресс молекулярной генетики с привлечением биохимии позволяет по-новому рассмотреть некоторые стороны этиологии и патогенеза РМЖ, базируясь на результатах клинических и эпидемиологических исследований. На сегодняшний день патогенез РМЖ можно рассматривать как результат многоступенчатых генетических мутаций, происходящих в течение длительного промежутка времени в клетках протоков и долек молочной железы. Нормальная клетка трансформируется в атипическую – опухолевую в зависимости от изменений в геноме клетки. Ингибировать или индуцировать повреждения в генах

могут как внешние, так и внутренние агенты. К внешним причинам можно отнести влияние ионизирующего облучения, канцерогенное воздействие табачного дыма. К внутренним причинам относятся внеклеточное влияние эстрогенов (непосредственно эстрадиола), которые, связываясь с рецепторами эстрогенов, определяют пролиферацию эпителия ткани молочной железы. Внутренние внутриклеточные причины – это мутации ДНК, накапливающиеся при каждом синтезе. Особый интерес при раке молочной железы представляют онкоген *c-erb* (*HER2/neu*) и онкоген *bcl-2*. Экспрессии белка *p185*, кодируемого онкогеном *HER2/neu* определяется иммуногистохимически в 15-30% случаев РМЖ. Онкоген *bcl-2* определяет механизм клеточной смерти, подавляя апоптоз. Экспрессия *bcl-2* связана с благоприятным прогнозом клинического течения РМЖ. В настоящее время четко установлено, что амплификация онкогенов является общей характеристикой при раке груди [6]. Меньшее число амплификаций характерно для рецепторов факторов роста, т.е. рецепторов *EGF*, *IGF1* и *FGF*. Выявлено, что амплификация онкогенов включает *ERBB2*, *MYC* и *INT2*. До 40% опухолей груди могут иметь, по крайней мере, один из этих генов амплифицированным.

Дефекты ДНК происходят в онкогенах, ответственных за рост, гибель, дифференцировку, хромосомную репликацию. Гены, отвечающие за клеточное деление, способствуют передаче сигнала к ядру клетки, стимулируя в конечном итоге, клеточную репликацию и переход из фазы *G 0* в фазу *S*. Митогенные агенты напрямую либо опосредованно запускают деление мутированных клеток и их пролиферацию, а токсические агенты индуцируют развитие выживших клеток, таким образом репопулируется измененная ткань молочной железы [5, 6].

Необходимо оговориться, что самостоятельно пролиферация не ведет к клеточным повреждениям, а создает необходимую среду для деления и роста мутированных клеток. Таким образом, влияние повреждающих факторов должно быть направлено на оба типа молекулярных повреждений: мутацию ДНК и индукцию клеточной пролиферации. Но ве-

роятнее всего, одна из наиболее важных внутренних внутриклеточных причин - это наследование поврежденного гена, которое увеличивает индивидуальный риск РМЖ. Но наследование мутированных генов не является определяющим моментом, необходимы внешние повреждающие факторы.

Спорадический рак молочной железы не имеет признаков наследственной предрасположенности. Вероятность развития спорадического РМЖ в течение жизни составляет 12% [7]. Семейный РМЖ – это заболевание ауто-сомно-доминантным типом наследования, характеризующееся наследственной предрасположенностью. На сегодняшний день выделяют «семейный» и «наследственный» рак молочной железы. Совокупность больных опухолями молочной железы в пределах одной семьи, подверженных вероятнее всего общим внешним канцерогенным факторам, относят к «семейному» раку. Необходимо разделять понятия «семейный» и «наследственный» рак молочной железы. При семейном РМЖ имеется определенное количество случаев данного заболевания у кровных родственников в пределах одной семьи. При семейном РМЖ повреждений в геноме, на современном уровне развития молекулярной генетики, мы не находим. Приблизительно 15-20% случаев РМЖ – это семейный рак, не связанный с нарушением в генах *BRCA1*, *BRCA2*. Семейный рак молочной железы имеет генетические признаки предрасположенности к наследованию, но непосредственного повреждения генетического материала не обнаруживается, и вероятнее всего возникновение его связано с влиянием общих внешних или внутренних канцерогенных факторов в пределах одной семьи, которые на сегодняшний день еще не выявлены.

Только 5% случаев рака молочной железы имеют истинно наследственную природу, связанную с мутацией генов *BRCA-1*, *BRCA-2*.

Непосредственно «раковые мутации» являются основной причиной наследственных форм опухолей молочной железы. Люди с подобными генетическими повреждениями определенное время являются здоровыми, но риск возникновения рака молочной железы

достигает огромных величин. Кроме того, наличие BRCA-1, BRCA-2-мутаций увеличивает в 10 раз вероятность рака яичников, а также риск развития рака во второй молочной железе до 35% [8, 12].

Женщины, у которых родственники первой степени родства болели РМЖ, риск заболевания увеличивается в 2-3 раза по сравнению с общей популяцией, и в 8 раз – если болела родная сестра [9]. Если рак у родственников возник в пременопаузальном периоде или опухоль обнаружена и у других родственников, риск увеличивается еще больше. Если пять кровных родственников по одной линии родства страдали РМЖ, то вероятность развития этого заболевания 1 из 3; если таких родственников 10 и более, то риск возникновения выше: 1 из 2.

Характеристика мутаций высокопенетрантных генов позволяет по-новому взглянуть на этиологию и патогенез наследственного РМЖ и разработать меры ранней диагностики, профилактики и лечения. Обоснование генетической модели с учетом выявления генов предрасположенности позволило по-новому рассматривать спорадические и наследственные формы РМЖ [6, 7, 8].

Структура белка BRCA1, подтвержденная данными, полученными *in vitro*, предполагает его multifunctionальность, включая роль в репарации ДНК, транскрипционной трансактивации генов и регуляции клеточного цикла.

BRCA1 – большой ген, содержащий 22 кодирующих и 2 некодирующих экзона. Он занимает 100 Кб геномной ДНК на хромосоме 17, локус 17 q 21 и кодирует белок массой 200 кДа, включающий 1863 аминокислоты. Кодирующая последовательность распределена неравномерно, самый крупный 11-й экзон кодирует 60% пептидной цепи.

В составе белка идентифицировано несколько доменов связывания, связывающий RING finger домен, локализованный на N-конце пептида, необходим для белок-белковых взаимодействий, включая взаимодействия с относительно недавно обнаруженным белком BARD1 (BRCA-associated RING-domain protein) и убиквитинового гидролазой BAP1 (BRCA-

associated protein). BRCA1 также связывает RAD1, белок, вовлеченный в репарацию и рекомбинацию ДНК. Кроме того, BRCA1 связывается с некоторыми специфичными регуляторами транскрипции, такими, как p53, Мус, E2F, и имеет транскрипционный трансактивирующий домен на C-конце. Мутация гена BRCA1 увеличивает риск развития гормонозависимых опухолей (рак предстательной железы, РЯ, РМЖ) не только влиянием на апоптоз и пролиферацию, но и через взаимосвязь с эстрогенами: происходит угнетение эстроген-рецепторного механизма. Эстроген-зависимая транскрипция подавляется прямым влиянием «дикого» типа BRCA1 [9,10,14].

Ген BRCA2, локализованный на 13 хромосоме, локус 13 q 12-13, имеет 27 кодирующих экзона и кодирует пептид из 3148 аминокислот. Особенностью белка является наличие 8 копий из 30-80 аминокислотных повторов в участке белка, кодируемом экзоном 11. Сейчас этот регион известен как центр связывания белка RAD1. Таким образом, подобно BRCA1, белок BRCA2, вероятно, играет роль в репарации двунитевых разрывов ДНК. Кроме того, BRCA2 содержит также трансактивирующий домен и имеет область, связывающую гистонацетилтрансферазу, что, возможно, говорит о его способности участвовать в процессе транскрипции.

В некоторых популяциях часто встречающиеся мутации в BRCA1 и BRCA2 возникают в результате «эффекта основателя» (founder effect). Наилучшим примером являются мутации у потомков евреев Ашкенази, у которых было идентифицировано 3 характерные мутации с совокупной частотой встречаемости в популяции около 2,5%. Наиболее частой является мутация 6174 del T в BRCA2 (примерно 1,5% у евреев Ашкенази). BRCA1-мутации 185 del AG и 5382 ins C представлены у евреев Ашкенази с частотой 1% и 0,1%, соответственно. Иначе говоря, среди них каждый сотый является носителем однотипной мутации BRCA1- делеции двух нуклеотидов, обозначаемой 185delAG; такое единообразие объясняется наличием общего предка. Таким образом, эти наследственные мутации являются причиной примерно одной трети всех случа-

ев РМЖ, диагностированных у женщин еврейского (Ашкенази) происхождения в возрасте до сорока лет.

Относительно высокая частота founder мутаций была описана и в других популяциях: исландской, франко-канадской, голландской, норвежской и шведской. Напротив, в общей популяции мутации BRCA1 и BRCA2 представлены с частотой менее 0,2%. Популяционные исследования в Австралии, Великобритании и США позволяют предположить, что эти мутации характерны только для 5-10% случаев РМЖ у пациентов с диагнозом, установленным до 40-45 лет.

Носительство мутаций в BRCA1 и BRCA2 увеличивает индивидуальный риск развития РМЖ до 85-100%. Мутации генов BRCA1 встречаются в 1,5-2 раза чаще, чем BRCA2. Вероятность мутаций BRCA выше, если РМЖ выявляется в молодом возрасте, имеется двухстороннее поражение молочных желез, или РЯ был диагностирован у самой пациентки или ее ближайших родственников. Пациенты с синдромом Ашкенази и мужчины с диагнозом РМЖ, а также их родственники имеют высокую вероятность являться носителями дефектного гена BRCA1. Считается, что примерно 1 из 833 женщин и менее чем 5% больных РМЖ имеют мутацию гена BRCA1.

Мутации в генах BRCA ассоциированы не только с РМЖ, но и с РЯ. Пенетрантность BRCA-дефектов по отношению к РЯ несколько ниже и составляет примерно 30-60%. Вероятность мутаций BRCA представлена в таблице 1.

Мутации в этих генах объясняют примерно 20% семейной агрегации РМЖ на уровне общей популяции. Положительный семей-

ный анамнез в отношении РМЖ – один из самых значительных факторов риска развития заболевания. Относительно редко наследственные формы РМЖ связаны с носительством мутаций в других генах, таких как p53, ATM, CHEK-2 и т.д.

Клинические особенности и прогноз наследственного рака молочной железы

Полагают, что вследствие особенностей молекулярного патогенеза прогноз BRCA1- и BRCA2- ассоциированных РМЖ может отличаться от прогноза ненаследственных РМЖ. С целью изучения клинических особенностей и прогноза наследственного РМЖ, в основе которого лежат мутации BRCA1 и BRCA2, был проведен ряд исследований, однако все эти работы были ретроспективными и имели ряд методологических ограничений, вероятно объясняющих их разноречивые данные. Lynch H. [11] определил клинические особенности наследственного РМЖ:

1) ранний возраст возникновения РМЖ (средний возраст больных наследственным РМЖ 44 года; 2) высокий риск развития билатерального рака молочной железы – БРМЖ (вероятность возникновения рака во второй молочной железе с наследственным РМЖ 46% в течение 20 лет); 3) интегральный специфический наследственный синдром, характеризующийся сочетанием различных опухолей у кровных родственников (синдром Blooma, синдром Cowden, молочно-яичниковый синдром и т.д.).

В Великобритании 16% РМЖ, возникшего до 55 лет, определяется мутациями в генах BRCA1, BRCA2 [7].

Таблица 1

Вероятность мутаций в генах BRCA в зависимости от отдельных клинических групп

Клинические группы	Вероятность мутаций BRCA
РМЖ до 30 лет	30%
РМЖ до 40 лет	10-20%
РМЖ и синдром Ашкенази	30%
РМЖ и РЯ	80% преимущественно BRCA1
РМЖ и другой рак (не РЯ)	25%
РМЖ у мужчин	>90% преимущественно BRCA2

В необходимости проведения консультации врача-генетика и лабораторной диагностики ДНК нуждаются пациенты, имеющие следующие клинические особенности РМЖ или их сочетания:

1) случаи РМЖ и/или РЯ у кровных родственников больной (у сестёр, матери, дочери, бабушки);

2) выявление РМЖ в молодом возрасте (до 45 лет; в некоторых исследованиях ранний возраст рассматривался до 50 лет);

3) синхронный и метакхронный БРМЖ;

4) сочетание РМЖ и РЯ.

Для таких пациентов необходимость в определении статуса генов BRCA очевидна. У женщин с наличием мутации в генах BRCA1 риск развития РМЖ на протяжении жизни составляет 50-80%, развития рака во второй молочной железе – 40-60%, РЯ – 15-45% рака яичников. Женщины с мутацией гена BRCA2 имеют риск развития рака молочной железы на протяжении жизни 50-85%, и РЯ – 10-20%. У мужчин с мутацией гена BRCA2 риск развития РМЖ на протяжении жизни составляет 6%, что в 150-200 раз выше, чем в обычной популяции. Риск развития рака предстательной железы, кишки, гортани, кожи и эндометрия, также, как и лейкемии вследствие химиотерапии, повышается при наличии мутаций в генах BRCA.

Основываясь на данных о семьях с множественными случаями РМЖ, исследователи Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC) выяснили, что у женщин-носительниц мутации BRCA1 кумулятивный риск РМЖ и РЯ к 70 годам составляет 87% (95% доверительный интервал 72-95%) и 44%, соответственно (95% доверительный интервал 28-56%). Соответствующий риск (также основанный на данных BCLC) для женщин-носительниц BRCA2 мутаций составляет 84% (95% доверительный интервал 43-95%) и 27% (95% доверительный интервал 0-47%), соответственно.

Пятилетняя общая выживаемость пациентов с генетическими дефектами в генах BRCA1, BRCA2 составляет 86%; по продолжительности безрецидивного промежутка и частоты местных рецидивов нет существенных различий при сравнении со случаями спо-

радического РМЖ [7, 12]. У женщин с наследственной предрасположенностью к раку молочной железы профилактическая мастэктомия рассматривается как радикальный способ избежания столь грозного заболевания. У носителей BRCA1 и BRCA2-мутаций овариэктомия снижает вероятность развития РЯ до 90%, тогда как риск возникновения РМЖ снижается на 50%. Профилактическая мастэктомия у таких пациентов снижает риск развития РМЖ, однако не гарантирует пациентке полного избавления [15, 16].

Заключение

Все это определяет необходимость разработки и внедрения автоматизированных систем генетического скрининга и мониторинга онкологически отягощенных семей, идентификации наследственно обусловленных форм рака и предрасположенности к их развитию.

Знание прогноза чрезвычайно важно, поскольку возможно может в той или иной мере повлиять на выбор адъювантной терапии, а также на определение степени риска для профилактической хирургии и других возможных превентивных мероприятий. В этом отношении важным направлением является поиск высокоинформативных прогностических факторов среди многочисленных и активно изучаемых молекулярных маркеров опухоли. Производя прогностическую оценку, с использование всех известных факторов, генетик должен выработать для пациентки индивидуальный алгоритм наблюдения, который бы гарантированно обеспечил обнаружение начала канцерогенеза и соответственно полноценное радикальное лечение.

Идентификация высокопенетрантных к развитию РМЖ генов BRCA1 и BRCA2 привела к лучшему пониманию молекулярного патогенеза ряда наследственных форм рака и к открытию новой эры в изучении РМЖ, что обещает значительно снизить заболеваемость и смертность при этой патологии. Необходимо детально изучать характер распределения признаков наследственного РМЖ (подробное изучение семейного анамнеза, ранний возраст

возникновения РМЖ до 45 лет, первично-множественный характер процесса и т.д.), а также анализировать взаимосвязь между собой перечисленных особенностей и носительством «горячих» мутаций в генах BRCA1 и BRCA2. Необходимо четко определить сходные и различные признаки наследственного и sporadического РМЖ, используя, по показаниям, генетическое консультирование для пациентов с учетом клинических особенностей, перечисленных выше. Диагноз «наследственный» РМЖ имеет на сегодняшний день огромную клиническую значимость, т.к. позволяет обнаружить у женщин с помощью лабораторных тестов высокий риск возникновения РМЖ и РЯ. Необходимо определить, какое количество пациентов нуждается в подобном дополнительном обследовании, которое позволяет идентифицировать наследственные формы РМЖ; проанализировать связь между наличием мутаций в генах BRCA1, BRCA2 и клиническими характеристиками наследственного РМЖ.

Литература

1. Онкология: учебное пособие / Н. Н. Антоненкова [и др.]; под общ. ред. И. В. Залуцкого. – Минск: Выш. шк., 2007. – С. 298-299.
2. Петрова, Г. В. Показатели онкологической помощи больным раком молочной железы в России / Г. В. Петрова, О. П. Грецова, Н. В. Харченко // Рос. онкол. журн. – 2007. – № 4. – С. 42-46.
3. Imyanitol, E. N. Searching for cancer-associated gene polymorphisms: promises and obstacles / E. N. Imyanitol, A. V. Togo, K. P. Hanson // Cancer Lett. – 2004. – Vol. 204. – P. 3-14.
4. Weinberg, R. A. How cancer arises / R. A. Weinberg // Sci. Am. – 1996. – Vol. 275. – P. 62-70.
5. Заридзе, Д. Г. Канцерогенез / Д. Г. Заридзе. – М.: Медицина, 2004. – С. 57-88.
6. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer / L. J. Van de Vijver [et al.] // Nature. – 2002. – Vol. 415. – P. 530-536.
7. ACOG Committee on Genetics. Breast-ovarian cancer screening // Obstet. Gynecol. – 1996. – Vol. 176. – P. 1-2.
8. Имянитов, Е. Н. Молекулярно-генетические аспекты патогенеза билатерального рака молочной железы: автореф. ... дис. д-ра. мед. наук / Е. Н. Имянитов. – СПб., 2001. – С. 6-11.
9. Семиглазов, В. Ф. Опухоли молочной железы (лечение и профилактика) / В. Ф. Семиглазов, К. Ш. Нургазиев, А. С. Арзуманов. – СПб., 1997. – С. 6-24.
10. Якубовская, Р. И. Современные представления о молекулярных механизмах канцерогенеза и опухолевой прогрессии как основа для разработки новых методов терапии злокачественных новообразований / Р. И. Якубовская // Рос. онкол. журн. – 2000. – № 6. – С. 42-50.
11. A descriptive study of BRCA1 testing and reactions to disclosure of test results / H. Lynch [et al.] // Cancer. – 1997. – Vol. 79. – P. 2219-2228.
Vogelstein, B. The genetic basis of human cancer / B. Vogelstein, K. Kinszler. – New York: McGraw-Hill. – 1998. – P. 229-236.
12. Имянитов, Е. Н. Молекулярные аспекты патогенеза первично-множественных опухолей / Е. Н. Имянитов, К. П. Хансон // Рос. онкол. журн. – 1998. – №5. – С. 47-58.
13. Генетические аспекты метастатического рака молочной железы / Н. В. Лепкова // Рос. онкол. журн. – 2008. – № 2. – С. 4-8.
14. Имянитов, Е. Н. Молекулярная онкология: клинические аспекты / Е. Н. Имянитов, К. П. Хансон. – С.-Петербург: Изд. дом СПбМАПО, 2007. – С. 10-18.
15. Моисеенко, В. М. Современное лекарственное лечение местно-распространенного и метастатического рака молочной железы / В. М. Моисеенко, В. Ф. Семиглазов, С. А. Тюлядин. – СПб.: «Гриффон», 1997. – С. 11-16.
16. Молекулярная генетика опухолей человека / Е. Н. Имянитов [и др.] // Вопр. онкол. – 1996. – Т. 43, № 5. – С. 7-12.

Поступила 18.12.2008 г.
Принята в печать 02.03.2009 г.

© КОЗИНА Ю.В., 2009

ЭКСТРАКТ ДЛЯ ВАНН И ГЕЛЬ ИЗ БУРЫХ МОРСКИХ ВОДОРОСЛЕЙ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ ПСОРИАЗОМ

КОЗИНА Ю.В.

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;
кафедра дерматовенерологии*

Резюме. В настоящем клиническом исследовании приведены результаты курсового применения у 42 больных распространенным папулезно-бляшечным псориазом нового растворимого фитоэкстракта из бурых морских водорослей – «Бионорм В» в виде его добавок в общие теплые ванны 3 раза в неделю в сочетании с местными ежедневными 2-кратными аппликациями геля из аналогичного фитоэкстракта на протяжении 3-х недель.

Показано, что данные фитопродукты существенно повышают эффективность стационарного лечения, уменьшая клинические симптомы заболевания: эритему, шелушение, инфильтрацию папул и бляшек, что подтверждалось более выраженным снижением показателя PASI в испытуемой группе пациентов по сравнению с контрольной ($ХИ^2 < 0,004$). Бальнеоэкстракт и гель «Бионорм В» не аллергогенны, удобны в применении, хорошо переносятся пациентами и могут применяться в практике дерматологических отделений, бальнеоблоков поликлиник, профильных санаториев в комплексном лечении больных распространенным вульгарным псориазом, не включающем цитостатическую и иммунодепрессивную терапию.

Ключевые слова: псориаз, водорастворимый экстракт и гель из бурых морских водорослей, лечение.

Abstract. The results of the treatment course of 42 patients with generalized papular – plaque torpid psoriasis by new soluble phytoextract from brown seaweeds - “Bionorm B” as its additions to general warm baths thrice a week in combination with the local daily gel twofold applications from the analogous phytoextract during 3 weeks are presented in this clinical study.

It is shown that the given phytoproducts essentially increase the effectiveness of inpatient treatment, reducing the clinical symptoms of the disease: erythema, peeling, papule and plaque infiltration, that has been verified by more expressed reduction of PASI value in the studied group of patients in comparison with the control one ($CHI^2 < 0,004$).

Balneoextract and gel “Bionorm B” are not allergenic, they are comfortable in use, well tolerated and can be applied in practice of dermatological departments, balneoblocks, sanatoria, in the complex treatment of the patients with generalized torpid vulgar psoriasis which does not include cytostatic and immunodepressive therapy.

Основную биологическую активность экстрактов бурых морских водорослей связывают с фукоиданами – чаще сульфатированными фукозосодержащими полисахаридами (СФП). Эти природные полимерные

соединения проявляют антикоагулянтную, антитромботическую, противовоспалительную, иммуностропную, антиинфекционную, противоопухолевую, антипролиферативную активность, стимулируют фагоцитоз [2, 6]. СФП подобно гепарину эффективно подавляют образование фибрина (антикоагулянтные фибринолитические свойства), ингибируя синтез

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, Витебский медицинский университет, кафедра дерматовенерологии. – Козина Ю.В.

факторов свертывания крови, обладают высокой антикомплементарной активностью.

Воспалительный процесс при псориазе заключается в инфильтрации кожи различными лейкоцитами, в основном активированными Т-лимфоцитами, макрофагами, моноцитами, нейтрофилами, отложении в очагах фибрина, клеточного детрита, а также вовлечением системы гемостаза [3, 5, 9]. Иммунокомпетентные клетки выделяют различные вещества (цитокины, хемокины, факторы роста кератиноцитов и др.), а также молекулы, вызывающие неоваскуляризацию в сосочках дермы [1, 7, 8, 10, 11].

В псориазическом эпидермисе и дерме откладываются иммунные комплексы, содержащие Ig G, A, M, фрагменты компонента C3, C5, C6, C7, ускоряющие митотический режим эпидермоцитов, стимулирующие выделение факторов роста тромбоцитами, Т-лимфоцитами, кератиноцитами и ангиогенез [10].

Анализ изменений в пораженной коже и организме больных псориазом, а также выявленных в эксперименте исследователями возможных положительных лечебных эффектов экстрактов из бурых морских водорослей явились предпосылкой для разработки на их основе растворимого экстракта для ванн и геля «Бионорм В» (производитель ООО «Рубикон», г. Витебск) и исследования нами их лечебной эффективности у больных вульгарным псориазом.

Экстракт водный растворимый для ванн и гель «Бионорм В», полученные из бурых морских водорослей, отнесены к изделиям медицинского назначения (ИМН) и разрешены к применению в медицинской практике на территории Республики Беларусь (19.12.2006).

Цель настоящего исследования – изучение клинической эффективности бальнеопроцедур с экстрактом «Бионорм В» в сочетании с одноименным гелем в комплексной терапии больных распространенным папулезно-бляшечным псориазом.

Методы

Клиническая эффективность экстракта для ванн и геля «Бионорм-В» испытана у 42

больных распространенным вульгарным папулезно-бляшечным псориазом (L40.0, L40.4) в активной стадии (24 мужчины, 18 женщин). Контрольную группу составили 16 больных аналогичной формой заболевания (9 мужчин, 7 женщин). Наблюдаемые пациенты были в возрасте $38,2 \pm 7,4$ лет и страдали псориазом на протяжении ряда лет. Дизайн исследования: двойное слепое рандомизированное клиническое испытание.

Заболевание у пациентов носило распространенный характер: выявлялись эпидермально-дермальные папулы, бляшки (у некоторых пациентов до 10-15 см и более), покрытые серебристо-белыми чешуйками. Элементы локализовались на волосистой части головы, туловище, конечностях. Выявлялись положительные симптомы Ауспитца, Кебнера. Согласно методу PASI (Psoriasis Area and Severity Index) [4], тяжесть кожных проявлений у них составляла 15,7 (контрольная группа), 17,0 (испытуемая группа) баллов, т.е. среднетяжелые поражения. Однако они страдали часто рецидивирующим (77% пациентов) и непрерывно-рецидивирующим псориазом (23% больных) – практически не исчезающими высыпаниями.

Учитывая торпидное течение псориаза, испытуемой и контрольной группе пациентов назначали базисное лечение, включающее: внутривенное капельное введение 0,9% раствора натрия хлорида 400 мл (с целью детоксикации и улучшения микроциркуляции) с добавлением 2-4 мл 2% раствора папаверина гидрохлорида через день № 5 (папаверин стимулирует внутриклеточное накопление цАМФ, оказывает антифосфодиэстеразное действие). Кроме того, пациенты получали аевит по 1 капсуле 2 раза в день – 3 недели, лоратадин – 10 мг/сут 7-10 дней.

Больным контрольной группы базисную терапию сочетали с общими теплыми ваннами 3 раза в неделю, а местно применяли смазывание очагов 3% салициловой мазью 2 раза в день.

Пациентам испытуемой группы (дополнительно к базисной терапии) проводили через день бальнеолечение с добавлением в теплую ванну ($36-38^{\circ}\text{C}$) 150 мл экстракта «Био-

норм-В», экспозиция процедуры 15-25 мин, на курс 8-10 процедур. На основные очаги поражения ежедневно 2 раза в день наносили гель «Бионорм-В» легкими массирующими движениями (после ванны через 1ч и при вечерних перевязках). Гель достаточно быстро абсорбируется поверхностью кожи (обычно в течение 10-15 мин). Бальнеопроцедуры пациентам не назначали при лихорадочных состояниях, тяжелых заболеваниях сердца и сосудов, артериальной гипертензии, при тяжелых заболеваниях печени, почек, щитовидной железы, злокачественных опухолях, выраженных нарушениях психики и нервной системы. При склонности пациентов к аллергическим реакциям проводили кожное тестирование. Для этого небольшое количество экстракта или геля «Бионорм В» наносили на локтевой сгиб. При появлении в течение ближайших 3-х часов в этом участке признаков раздражения кожи (выраженная эритема, чувство жжения) применение данных ИМН исключали.

Эффективность терапевтических мероприятий у испытуемой и контрольной группы пациентов оценивали по результатам пребывания в стационаре в течение 3-х недель, исходя из следующих клинических критериев:

- клиническая ремиссия – исчезновение всех симптомов заболевания;
- значительное улучшение – исчезновение более 86% кожных симптомов заболевания;
- улучшение – исчезновение симптомов не менее чем на 50% от их проявлений при поступлении на лечение;
- незначительное улучшение – уменьшение симптомов заболевания менее чем на 50% от первоначальных;

- ухудшение – обострение проявлений псориаза.

Кроме того, для объективизации клинических изменений под влиянием проводимой терапии мы применили также полуколичественный метод PASI в соответствии с эталоном (табл.1) и расчетной таблицей (табл.2) [4].

При поступлении в клинику и выписке из стационара больным проводили параклинические исследования: общий анализ крови (эритроциты, гемоглобин, лейкоциты, лейкоцитарная формула), общий анализ мочи, биохимический анализ сыворотки крови (глюкоза, холестерин, общий белок, билирубин, мочевины, АЛТ, АСТ).

Оценивали переносимость экстракта и геля «Бионорм-В» по общей и местной реакциям:

- удовлетворительная переносимость – отсутствие побочных эффектов, легкая или умеренная их выраженность;
- неудовлетворительная переносимость – резкое обострение симптомов заболевания, появление других серьезных побочных реакций, требующих отмены применения бальнеопроцедур с экстрактом и гелем «Бионорм В».

Статистическую обработку результатов исследований проводили на основе метода доверительных интервалов. Доверительная вероятность полагалась равной 95% ($p=0,05$). Для расчетов точности оценки интервала значений случайной величины использовали распределение Стьюдента с числом степеней свободы $v=2(n-1)=10$. Соответствующее значение интервала оказалось близким к величине среднего квадратического отклонения.

Таблица 1

Эталон расчета тяжести и площади псориазических поражений

Симптомы кожных поражений	Оценка тяжести кожных поражений (в баллах)				
	0	1	2	3	4
Эритема	отсутствует	легкое	умеренное	тяжелое	очень тяжелое
Инфильтрация			(средне-тяжелое)		
Шелушение					
Площадь, %	0	<10	10<30	30<50	50<70 и более

Таблица 2

Расчет PASI больного распространенным крупно-бляшечным псориазом П., 52 лет

Критерии оценки поражений	ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОРАЖЕНИЙ И ИХ ТЯЖЕСТЬ (в баллах)				
	Голова	Туловище	Верхние конечности	Нижние конечности	Фотографии основных очагов
Эритема	3	4	3	3	
Инфильтрация	3	4	3	3	
Шелушение	3	4	3	3	
Суммарно	9	12	9	9	
х площадь	4	3	3	2	
=	36	36	27	18	
х коэффициент	х 0,1	х 0,3	х 0,2	х 0,4	
PASI топографической области	3,6	10,8	5,4	7,2	Общий PASI= 27

Достоверность различия между группой больных, получавших базисное лечение, бальнеотерапию с экстрактом и гелем из бурых морских водорослей, и больными псориазом, которым назначали аналогичную базисную терапию с гигиеническими ваннами (3 раза в неделю) и 3% салициловую мазь, вычисляли по критерию Chi-square (χ^2) согласно статистическому пакету Excel 2003.

Результаты и обсуждение

Анализ динамики регрессии псориазных высыпаний у больных распространенным папулезно-бляшечным псориазом в активной стадии в испытуемой и контрольной группах пациентов позволил выявить следующие особенности.

При назначении общей гидротерапии с экстрактом бурых морских водорослей (БМВ) и геля на их основе мы отмечали у большинства пациентов улучшение общего самочувствия, сна, быстрое уменьшение шелушения и зуда кожи в пораженных участках. Обычно эти положительные сдвиги наступали на 3-5-й дни нахождения больных в стационаре. Выраженный противовоспалительный эффект

(значительное уменьшение инфильтрации элементов сыпи) данной терапии наблюдали по завершении 3-ей недели лечения. При наиболее благоприятном регрессировании элементов по их периферии появлялся псевдоатрофический ободок Воронова. Эти изменения в дерматологическом статусе испытуемой группы пациентов регистрировали как «клиническое улучшение». Для достижения полученных клинических результатов в испытуемой группе потребовалось 8-10 общих теплых ванн с экстрактом БМВ и ежедневное применение геля «Бионорм В» (дважды в день).

Лечение больных контрольной группы не оказало столь выраженного клинического эффекта и характеризовалось более медленным рассасыванием высыпных элементов и сохранением у большей части пациентов по истечении 3-х недель пребывания в стационаре значительного количества только частично регрессирующих или фрагментированных элементов, т.е. «некоторым улучшением» со стороны кожного процесса.

Объективные исследования кожных проявлений у пациентов испытуемой группы (средний PASI 17,0 баллов, его колебания

Таблица 3

Клиническая эффективность (в баллах PASI) бальнеотерапии с экстрактом и гелем из бурых морских водорослей «Бионорм В» у больных распространенным торпидным псориазом

Группы обследованных	До лечения	После лечения	Коэффициент уменьшения индекса PASI	Достоверность отличий
Контрольная группа	15,7(12,1 ÷ 21,3)	8,4 (5,2 ÷ 12,2)	1,8	p<0,05*
Испытуемая группа	17,0 (8,2 ÷ 27,9)	5,1 (2,0 ÷ 4,85)	3,3	p<0,05 (0,004)**

Примечание: * p – достоверность отличий в контрольной группе больных до и после лечения.

** – достоверность отличий (повышение результатов лечения) между испытуемой и контрольной группой больных согласно критерию Chi-square (df=2).

8,2 ÷ 27,9), получавших базисное лечение+ гидротерапию с экстрактом и гелем «Бионорм В», позволили установить выраженное снижение показателя PASI (средний показатель 5,1 балла: его колебание 2,0 4,85) – в 3,3 раза, т.е. на 70% от первоначальных симптомов. В контрольной группе пациентов показатель PASI снизился в 1,8 раза – на 46,5%. Показатель χ^2 <0,004, (df=2) позволил установить достоверное отличие между сравниваемыми группами – более высокий клинический эффект в испытуемой группе больных псориазом (табл. 3).

Следует отметить хорошую переносимость пациентами общих теплых ванн с БМВ, а также желание больных к их проведению. У пациентов улучшался сон, настроение, что характерно для тепловой гидротерапии, создающей состояние психологического комфорта.

Общих бальнеореакций, сенсibilизирующего действия ИМН «Бионорм В» не отмечено. Некоторое обострение кожного процесса (усиление воспалительной реакции в области бляшек) отмечено только у двух мужчин, страдавших в течение ряда лет псориазом. Данное обострение мы связываем с временной бальнеологической реакцией. После отмены на 2-3 дня ИМН «Бионорм В» плановое курсовое бальнеолечение этих пациентов было продолжено с дальнейшим положительным клиническим результатом.

Существенных изменений в общем анализе крови, мочи, исследованных биохимических показателях не обнаружено.

Таким образом, применение базисной терапии с включением общих теплых ванн с экстрактом БМВ и геля на их основе в период курсовой терапии позволило получить более выраженные клинические результаты (улучшение кожного процесса) у больных распространенным торпидным псориазом по сравнению с аналогичной группой больных, не получавших подобную бальнеотерапию, и зарегистрированную как некоторое клиническое улучшение кожного процесса.

Заключение

1. Бальнеопроцедуры с фитоэкстрактом из бурых морских водорослей и гель на их основе в виде ИМН «Бионорм В» существенно улучшают результаты терапии больных распространенным торпидным псориазом, уменьшая основные симптомы заболевания: эритему, шелушение, инфильтрацию папул и бляшек.

2. Экстракт для ванн и гель «Бионорм В» хорошо переносятся пациентами, не вызывают общеаллергических и контактных реакций, удобны в применении, доступны по цене и могут применяться в практике дерматолога в качестве новых бальнеосредств для лечения больных псориазом.

Литература

1. Вавилов, А.М. Иммуноморфологические исследования Т-лимфоцитов в коже больных псориазом/

- А.М. Вавилов, В.А. Самсонов, Л.Е. Димант//Вестн. дерматол. -2000. -№4. -С.4-5
2. Дрозд, Н.Н. Антикоагулянтная активность сульфатированных полисахаридов/Н.Н. Дрозд, Г.Е. Банникова, В.А. Макаров//Экспериментальная и клиническая фармакотерапия. -2006. – Том 69 №6. – С.51-60.
 3. Евстафьев, В.В. Нарушение систем гемостаза у больных псориазом по данным электрокоагулографических исследований/В.В. Евстафьев, В.А. Лосева, М.М. Левин.//Вестн. дерматол. -1984. -№5. С.59-62.
 4. Козин, В.М. Псориаз (вопросы патогенеза, клиники, терапии): Монография/В.М. Козин. – Витебск: ВГМУ, 2007. -227с.
 5. Козина, Ю.В. Вариабельность систем гемостаза, антигемостаза и фибринолиза при прогрессирующей стадии псориаза/Ю.В. Козина/ Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации. Материалы 63-ей научной сессии университета 26-27марта 2008 года. - Витебск ВГМУ, - С.114-116.
 6. Кузнецова, Т.А. Биологическая активность фукоиданов из бурых водорослей и перспективы их применения в медицине/ Т.А. Кузнецова, Н.М. Шевченко, Т.Н. Звягинцева//Антибиотики и химиотерапия. - 2004. – 49; 5. –С.24-29.
 7. Мордовцев, В.Н. Псориаз (патогенез, клиника, лечение)/В.Н. Мордовцев, Г.В. Мушет, В.И. Альбанова/ /Кишинев: ШТИИИИЦА, 1991.-186с.
 8. Мяделец, О.Д. Морфофункциональная дерматология /О.Д. Мяделец, В.П. Адаскевич // М.; Медлит. - 2006. – 753с.
 9. Терлецкий, О.В. Псориаз. Дифференциальная диагностика «псориазоподобных» редких дерматозов. Терапия. Медицинский атлас./О.В. Терлецкий// СПб.: Издательство ДЕАН, 2007. – 512с.
 10. Шилов, В.Н. Псориаз – решение проблемы (этиология, патогенез, лечение)/ В.Н. Шилов //М.: Издатель В.Н. Шилов. 2001. -304с.
 11. Nickoloff, B., J. Nestle, F. O. 2004. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities// The journal of Clinical Investigation. - Vol. 113. № 12 – P.1664-1675.

Поступила 09.02.2009 г.

Принята в печать 02.03.2009 г.

ОСОБЕННОСТИ БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ РОЖЕЙ И ПНЕВМОНИЕЙ

ЖИЛЬЦОВ И.В.*, ВЕРЕМЕЙ И.С.***, СЕМЕНОВ В.М.*, ГЕНЕРАЛОВ И.И.***

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

кафедра инфекционных болезней,*

*Центральная научно-исследовательская лаборатория**,*

*кафедра микробиологии****

Резюме. Антибиотикоустойчивость болезнетворных бактерий считается одной из наиболее актуальных проблем современной инфектологии; тем не менее, до настоящего времени данное явление рассматривалось лишь как свойство микроорганизмов.

В процессе изучения каталитических антител (абзимов), обладающих бета-лактамазной активностью, мы случайно обнаружили необычно высокий уровень пенициллиназной активности плазмы человеческой крови, значительно превышающий таковой у ранее описанных нами абзимов (И.В. Жильцов, 2001). Настоящее исследование было предпринято с целью оценки уровня и частоты встречаемости выявленной активности, а также выявления ее возможной взаимосвязи с какими-либо патологическими состояниями. Мы обследовали 31 больного рожей и 35 больных пневмонией, находившихся на лечении в Витебской областной инфекционной больнице в 2007/08 гг. Для определения наличия и уровня бета-лактамазной активности сыворотки крови использовался модифицированный нами неocupроиновый метод (А. Menashi, 1988). В качестве субстратов реакции применялись ампициллин и бензилпенициллина натриевая соль. Бета-лактамазная активность была выявлена у 94,29% (95% ДИ: 86,6-100) больных пневмонией, средний уровень распада внесенного в пробу антибиотика за 20 минут инкубации составил 51,38% для ампициллина и 81,76% для бензилпенициллина. У больных рожей частота встречаемости бета-лактамазной активности крови оказалась равной 92,86% (95% ДИ: 83,32-100), причем средний уровень распада внесенных в пробу антибиотиков составил 50,73% для ампициллина и 75,42% для бензилпенициллина. Статистически значимых межгрупповых различий выявлено не было.

Полученные нами результаты указывают на то, что значительная часть устойчивости к бета-лактамам препаратам, наблюдаемой клиницистами, может быть обусловлена наличием в крови больных определенных факторов, обладающих пенициллиназной активностью.

Ключевые слова: бета-лактамазная активность, сыворотка крови, рожа, пневмония, природные- и аминопенициллины, неocupроиновый метод.

Abstract. Bacterial antibiotic resistance is known to be one of the most challenging problems of modern infectology, but this phenomenon is still analyzed from the side of bacteria only.

Examining human blood serum for the presence of catalytic antibodies (abzymes) we accidentally found uncommonly high level of penicillinase activity, significantly higher than that expressed by polyclonal IgG studied before (I. Zhiltsov, 2001). Thus, our study was undertaken to assess the blood serum activity found and to associate it with some pathological conditions. We examined 31 patients with erysipelas and 35 patients with pneumonia treated at the Vitebsk Regional Infectious Hospital in 2007/08. To determine the presence and level of beta-lactamase activity of blood serum, we applied modified neocuproine technique (A. Menashi, 1988), ampicillin and penicillin G were used as substrates. Beta-lactamase activity was found in 94,29% (95% CI: 86,6-100) of all pneumonia cases (the average level of antibiotic destruction for 20 minutes of incubation made up 51,38% for ampicillin and 81,76% for penicillin G). Beta-lactamase activity was also revealed in 92,86% (95% CI: 83,32-100) of erysipelas cases (the average level of destruction made up 50,73% for ampicillin and 75,42% for penicillin G). No reliable differences between two groups were found.

The obtained results indicate that a considerable part of penicillinase activity observed in clinical conditions may be explained by some properties of human blood.

Антибиотикоустойчивость бактерий на текущий момент является одной из наиболее важных и актуальных проблем инфектологии. Практически все известные науке бактерии – возбудители инфекционных заболеваний (за редким исключением) в большей или меньшей степени проявляют устойчивость к тем или иным антибактериальным препаратам.

Основным механизмом устойчивости бактерий к бета-лактамам является синтез разнообразных бета-лактамаз. В то же время, сам макроорганизм не безразличен к введению антибиотиков. В частности, в наших предыдущих работах было показано, что в крови у 33,82% больных шигеллезом определяются поликлональные антитела субклассов G1, 2 и 4, обладающие бета-лактамазной активностью (причем у некоторых препаратов иммуноглобулинов данная активность оказалась довольно значительной) [1]. Формирование в организме таких антител, обладающих каталитической активностью (абзимов), объясняется исходя из теории иммунологических сетей Эрне [2].

В целом необходимо отметить, что метаболизм бета-лактамов антибиотиков в организме изучен недостаточно, причем все крупные зарубежные исследования в этом направлении были свернуты к началу 90-х гг. прошлого века, сменившись узкоприкладными, сугубо специализированными научными работами. Так, известно, что введенные парентерально бета-лактамы связываются с различными белками крови (от 19 до 96% введенного препарата, в зависимости от его химических особенностей), преимущественно – с альбуминами [3]. В дальнейшем антибиотик взаимодействует с пенициллин-связывающими белками (ПСБ) бактерий, из которых наиболее известна D-аланин-карбоксипептидаза (всего число известных ПСБ у различных бактерий достигает 12). Бета-лактамы препараты являются аналогами переходного состо-

яния основного субстрата для данного фермента – ацил-D-аланил-D-аланиновых окончаний главной составляющей бактериальной стенки – мурамилпептида (пептидогликана); они вступают в конкуренцию с D-аланил-D-аланиновыми остатками за активный центр D-аланин-карбоксипептидазы; в процессе взаимодействия бета-лактамов связь антибиотика разрывается ферментом и ковалентно связывается с остатком цистеина (по другим данным, с остатком серина [4]), образуя тиюэфир. Получившийся в результате комплекс «фермент-пенициллоиловая кислота» стабилен (в отличие от комплекса «фермент-субстрат»), вследствие чего происходит необратимое ингибирование фермента (т.е. бета-лактамы – это т.н. «субстрат-убийца» - killing substrate) [5]. При этом происходит нарушение формирования перекрестных связей молекул пептидогликана между собой, клеточная стенка бактерий получается рыхлой и перестает предохранять бактерии от осмотического лизиса. Показано, в частности, что в гиперосмолярной среде лизиса бактерий, подвергшихся действию пенициллина, не происходит; кроме того, бета-лактамы эффективно воздействуют только на активно размножающиеся бактерии, не влияя на покоящиеся [5]. Остатки антибиотика, не связавшиеся бактериальной клеткой, достаточно быстро выводятся почками (так, период полувыведения бензилпенициллина – 0,5-1 час с момента введения) [6].

При внешней убедительности приведенные данные неполны. Например, доподлинно неизвестно, с какими белками в плазме крови связываются бета-лактамы, насколько прочна данная связь, происходят ли химические либо конформационные изменения молекул антибиотика в процессе транспортировки, какая именно фракция антибиотика (связанная либо несвязанная) имеет большее бактерицидное значение. В частности, имеются косвенные данные о том, что лишь малая часть введенных извне бета-лактамов достигает ПСБ бактерий. Так, по данным различных исследователей, грам-положительные микроорганизмы связывают от 4 до 15 нмоль пенициллина на 1 грамм сухого веса бактерий (от 100 до 10.000 молекул пенициллина на бактерию,

в среднем 1000-4000 молекул); грам-отрицательные микроорганизмы связывают в среднем в 5-10 раз меньше [5]. Таким образом, бета-лактамы вводятся в организм с огромным избытком, вероятно, необходимым для покрытия естественной убыли антибиотиков в процессе транспортировки и распределения в тканях.

Известно, что за разрушение бета-лактамовых антибиотиков отвечают бактериальные ферменты из группы бета-лактамаз, причем в человеческом организме аналоги данного фермента отсутствуют [7]. Тем не менее, имеются публикации, утверждающие, что гемолизированная кровь может разрушать 3-ацетоксиметил-цефалоспорины (цефалотин, цефотаксим) посредством деацетиляции 3-ацетоксиметильной группы; при этом плазма и сыворотка крови, не содержащие продуктов лизиса эритроцитов, такой активностью не обладали. Следует отметить, что в данном случае бета-лактамовая связь не разрушается, из-за чего цефалоспорины, не содержащие 3-ацетоксиметильной группы (цефалоридин, цефалексин, цефамандол, цефазолин), не утрачивали активности в присутствии гемолизированной крови [8]. Данное наблюдение показывает, что антибиотики бета-лактамового ряда в принципе могут разрушаться какими-либо компонентами цельной крови, и, возможно плазмы или сыворотки крови, кроме бета-лактамаз (в частности, каталитическими антителами, о чем говорилось выше) [1]. Более того, давно известно, что карбапенемы (в частности, имипенем) разрушаются почечными дегидропептидазами, причем продукты распада нейротоксичны для некоторых млекопитающих; именно поэтому в состав коммерческого препарата имипенема был введен ингибитор почечных дегидропептидаз циластатин [9].

Обнаружение в крови больных факторов (возможно, нескольких), эффективно разрушающих бета-лактамовые антибиотики, может прямо указывать на одну из причин низкой эффективности указанных антибиотиков в лечении таких больных. Возможно, именно инактивация антибиотиков макроорганизмом лежит в основе феномена появления антибиотикорезистентности *in vivo* при её отсутствии или незначительной выражен-

ности *in vitro*, неоднократно наблюдавшегося клиницистами. Ранее механизмы и проявления «биологической» антибиотикорезистентности не изучались.

Соответственно, целью нашей работы было выявление и оценка уровня собственной бета-лактамовой активности сыворотки человеческой крови. Для этого мы выбрали две категории доступных для обследования больных – с рожистым воспалением («рожей») и бактериальной пневмонией; при этом мы отталкивались от того факта, что указанные категории больных всегда получают длительную антибактериальную терапию, причем в схему указанной терапии почти всегда входит тот или иной бета-лактамовый препарат. Рожа, кроме того, склонна к рецидивирующему течению, виду чего такие больные получают пенициллины либо цефалоспорины неоднократно в течение жизни. В этой связи в крови указанных больных можно было ожидать наиболее высокий уровень β -лактамовой активности, превышающий таковой в генеральной совокупности.

Методы

1. Получение сыворотки крови

Сыворотка крови больных была получена центрифугированием крови, выдержанной в холодильной камере при 4°C в течение 4-6 часов для образования фибринового сгустка; использовалось центрифугирование в угловой центрифуге при 3000 об/мин в течение 15 минут. Полученная сыворотка крови сохранялась до момента эксперимента в морозильной камере при -20°C; допускалось только однократное размораживание пробы непосредственно перед экспериментом. Пробы с визуальными признаками гемолиза исключались из эксперимента.

2. Методика определения бета-лактамовой активности

Бета-лактамовая активность сыворотки крови определялась посредством модифицированного неокупроинового метода [10].

Все используемые реагенты имели квалификацию не ниже ч.д.а. Измерение оптических плотностей проводили на спектрофлу-

ориметре SOLAR-CM2203, (гос. рег. № РБ 03 11 2864 06) в режиме спектрофотометрии.

В качестве субстратов для определения каталитической активности сыворотки крови мы использовали бензилпенициллина натриевую соль и ампициллина тригидрат (химически чистые субстанции производства Sigma).

0,15 мл раствора каждого из двух упомянутых антибиотиков в концентрации 0,18 мг/мл смешивали с исследуемой сывороткой крови в соотношении 1:1 и помещали в термостат ($t=37^{\circ}\text{C}$) на 20 минут. Спустя указанное время к тест-объектам прибавляли 30 мкл 57% водного раствора хлорной кислоты для осаждения белковой матрицы.

В качестве контроля использовали модельные растворы бензилпенициллина и ампициллина, разведенные дистиллированной водой в соотношении 1:1 с последующим добавлением 30 мкл 57% водного раствора хлорной кислоты.

Все тест-объекты встряхивали на вортексе в течение 2 минут и центрифугировали при 3000 об/мин в продолжение 10 минут, после чего отбирали для анализа надосадочную жидкость. Учитывая вероятность потерь антибиотика с белковым осадком, был введен дополнительный контроль. Для этого растворы предварительно полностью гидролизованных кипячением с 0,2 М гидроокисью натрия антибиотиков вносили в испытуемые сыворотки в количестве, аналогичном опытным пробам, и далее проводили депротеинизацию, как указано выше.

Затем к исследуемым растворам прибавляли 0,2 мл ацетатного буфера ($\text{pH}=4,75$), 0,2 мл неокупроинового реагента и выдержива-

ли при комнатной температуре в течение 30 минут до развития стабильной желтой окраски. Спустя указанное время измеряли оптическую плотность образовавшихся комплексов при 454,5 нм. При этом длина оптического пути составляла 10 мм.

В дальнейшем определялась доля антибиотика, распавшегося в пробе за время инкубации, как отношение ОП в опытной пробе к ОП соответствующей контрольной пробы с полностью распавшимся антибиотиком (ампициллином либо бензилпенициллином). Вычисленное значение выражалось в процентах.

3. Дизайн исследования

Дизайн собственно исследования – срезное (cross-sectional; изучаемый признак оценивался одновременно и однократно во всех исследуемых подгруппах), основанное на наблюдении (observational, т.е. никаких тестовых медицинских вмешательств, в том числе смены и модификации проводимой терапии, не производилось).

4. Клиническая характеристика больных, вошедших в исследование

В данное исследование были включены 66 человек, находившихся на лечении в диагностическом отделении Витебской областной инфекционной клинической больницы (УЗ ВОИКБ) с 2005 по 2008 гг. Данные больные были разделены на 2 группы: 31 человек с клиническим диагнозом «рожистое воспаление» (далее «рожа») и 35 человек с подтвержденным рентгенологически диагнозом «пневмония».

Средний возраст больных в указанных группах, а также соотношение мужчин и женщин в каждой из групп показано в таблице 1.

Таблица 1

Распределение обследованных больных по возрасту и полу

Показатель		Вся группа	Рож	Пневмония
В целом	к-во	n=66	n=31	n=35
	средн. возраст (95% ДИ)	49,9 лет 95% ДИ: 45,4-54,4	58,0 лет 95% ДИ: 51,5-64,5	42,9 лет 95% ДИ: 37,4-48,4
Мужчины	к-во (%)	n=24 (36,4%)	n=12 (38,7%)	n=12 (34,3%)
	средн. возраст (95% ДИ)	49,04 лет 95% ДИ: 42,5-55,6	55,8 лет 95% ДИ: 45,2-66,3	42,8 лет 95% ДИ: 35,1-50,6
Женщины	к-во (%)	n=42 (63,6%)	n=19 (61,3%)	n=23 (65,7%)
	средн. возраст (95% ДИ)	50,4 лет 95% ДИ: 44,2-56,6	59,4 лет 95% ДИ: 50,4-68,5	43,0 лет 95% ДИ: 35,1-50,8

Из таблицы 1 видно, что соотношение мужчин и женщин во всех исследуемых группах больных составляет приблизительно 1:2, средний возраст мужчин и женщин в пределах групп не различается, основу группы больных рожистым воспалением составляют пожилые лица (средний возраст 58 лет), основу группы больных пневмонией – лица среднего возраста (средний возраст 43 года), что отражает естественную эпидемиологию данных заболеваний.

У 31 больного наблюдалось легкое течение заболевания (рожа – 16, пневмония – 15), у 23 – среднетяжелое течение (рожа – 13, пневмония – 10) и у 13 больных – тяжелое течение (рожа – 2, пневмония – 11).

Все больные, вошедшие в исследование, получали антибактериальную терапию. В группе больных рожей преобладало назначение бензилпенициллина (64,5% больных, средняя длительность курса лечения 6 сут), в группе больных пневмонией – назначение цефотаксима (85,7% больных, средняя длительность курса лечения 11 сут). Ампициллин в группе больных рожей получало 3 человека (9,67%), в группе больных пневмонией – 5 человек (14,3%). Бензилпенициллин в группе больных пневмонией получало 2 человека (5,71%).

5. Статистический анализ результатов исследования

Статистический анализ результатов исследования был выполнен с использованием аналитического пакета Statistica 7.0 (для проверки нормальности распределения изучаемых признаков применялся тест Колмогорова-Смирнова, для выявления корреляционных взаимосвязей – ранговый анализ Спирмена (Spearman), для проверки достоверности различий изучаемых признаков в независимых выборках – U-тест Манна-Уитни (Mann-Whitney), а при анализе малых групп – точный тест Фишера (Fisher's exact test). При проверке нормальности распределения выяснилось, что распределение всех изучаемых признаков нормальным не являлось; преобладали смещенные типы распределения. Соответственно, для дальнейшего статистическо-

го анализа полученных результатов использовались только непараметрические методы анализа (см. выше).

Результаты и обсуждение

1. Частота встречаемости пенициллиназной активности сыворотки крови у больных в исследуемых группах, особенности выявленной активности

Ускоренное разрушение ампициллина было выявлено в 59 случаях из 63 проанализированных (в 4 случаях уровень распада ампициллина в экспериментальных пробах достоверно не отличался от уровня самораспада антибиотика в контрольных пробах), что составляет 93,65% (95% ДИ: 87,63-99,67).

Ускоренное разрушение бензилпенициллина было выявлено в 63 случаях из 65 проанализированных (в 2 случаях уровень распада бензилпенициллина в экспериментальных пробах достоверно не отличался от уровня самораспада антибиотика в контрольных пробах), что составляет 96,92% (95% ДИ: 92,72-100).

При этом у 5 больных уровень распада ампициллина оказался менее 20% от внесенного в пробу препарата (7,93%, 95% ДИ: 1,26-14,61), у 12 – в интервале 20-39% (19,05%, 95% ДИ: 9,35-28,74), у 21 – в интервале 40-59% (33,33%, 95% ДИ: 21,69-44,97), у 10 – в интервале 60-79% (15,87%, 95% ДИ: 6,85-24,9), и у 11 – в интервале 80-100% (17,46%, 95% ДИ: 8,09-26,83).

Соответственно, лишь у 1 больного уровень распада бензилпенициллина оказался менее 20% от внесенного в пробу препарата (1,54%, 95% ДИ: 0-4,53), у 2 – в интервале 20-39% (3,08%, 95% ДИ: 0-7,28), у 2 – в интервале 40-59% (3,08%, 95% ДИ: 0-7,28), у 23 – в интервале 60-79% (35,38%, 95% ДИ: 23,76-47,01), и у 35 – в интервале 80-100% (53,85%, 95% ДИ: 41,73-65,97).

В целом, можно отметить, что у большинства больных отмечается средний уровень распада ампициллина и одновременно высокий уровень распада бензилпенициллина в сыворотке крови (рисунок 1); впрочем, тот или иной уровень бета-лактамазной активности

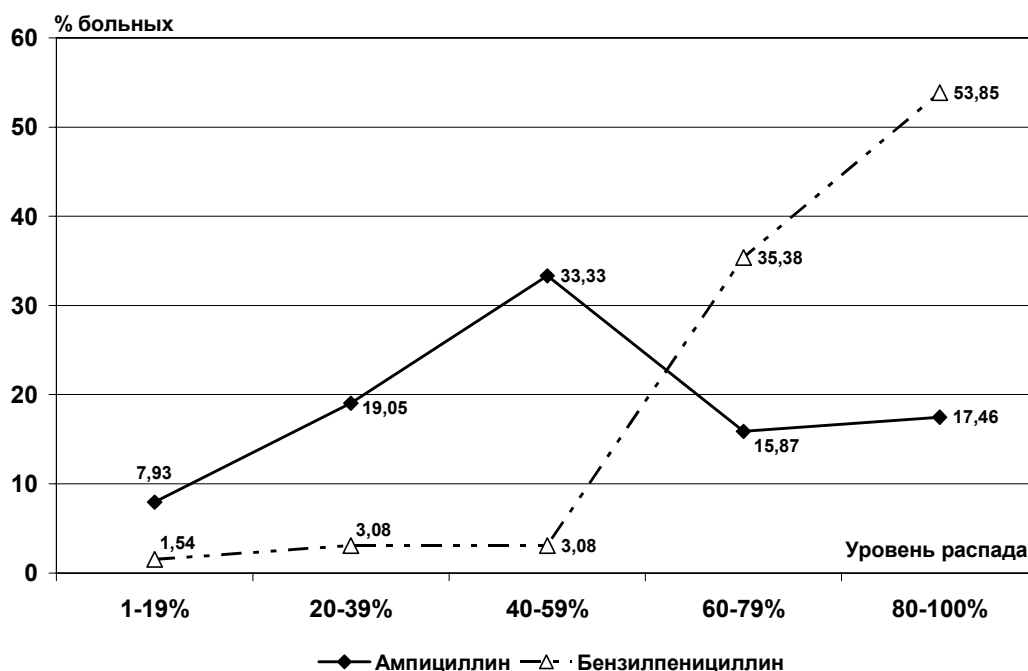


Рис. 1. Уровень бета-лактамазной активности у исследуемых больных в целом (отдельно для ампициллина и бензилпенициллина).

сыворотки крови был выявлен практически у всех больных.

Соответствующие уровни распада бензилпенициллина и ампициллина в группах больных рожей и пневмонией по отдельности приведены в таблицах 2, 3.

Частоты встречаемости повышенного (>0) распада ампициллина в группах больных рожей и пневмонией достоверно не различались (точный тест Фишера, односторонний $p=0,60$). Частоты встречаемости повышенного (>0) распада бензилпенициллина в группах больных рожей и пневмонией также достоверно не различались (точный тест Фишера, односторонний $p=0,21$). Не было выявлено и достоверных межгрупповых различий между уровнями бета-лактамазной активности в группах больных рожей и пневмонией (точный тест Фишера, односторонний $p=0,063...0,71$).

Тем не менее, различия между уровнями распада ампициллина и бензилпенициллина оказались весьма значительными как среди больных в целом, так и в группах больных рожей и пневмонией. Так, средний уровень распада ампициллина в группе больных ро-

жей составил 50,73% (95% ДИ: 39,16-62,3), а распада бензилпенициллина – 75,42% (95% ДИ: 64,07-86,78), разница статистически значима, $p<0,001$. Соответственно, средний уровень распада ампициллина в группе больных пневмонией оказался равен 51,38% (95% ДИ: 43,26-59,5), а распада бензилпенициллина – 81,76% (95% ДИ: 75,39-88,13), разница статистически значима, $p<0,0000001$. Для выявления достоверности различий использовался U-тест Манна-Уитни.

Соответственно, можно отметить закономерно более высокий уровень распада бензилпенициллина в сыворотке крови больных из всех изучаемых групп по сравнению с уровнем распада ампициллина; причина этого явления в настоящее время неясна и требует дальнейшего уточнения.

2. Взаимосвязь уровней выявленной бета-лактамазной активности и клинко-лабораторных показателей, характеризующих течение рожи и пневмонии

В процессе анализа взаимосвязей уровней выявленной бета-лактамазной активности и клинко-лабораторных показателей, характеризующих течение рожи и пневмонии

Таблица 2

Уровень распада ампициллина в сыворотке крови больных рожей и пневмонией

Уровень распада ампициллина	Рожа (n=28)	Пневмония (n=35)
0% (распад отсутствовал)	2 (7,14%) 95% ДИ: 0-16,68	2 (5,71%) 95% ДИ: 0-13,4
1-19%	4 (14,29%) 95% ДИ: 1,32-27,25	1 (2,86%) 95% ДИ: 0-8,38
20-39%	5 (17,86%) 95% ДИ: 3,67-32,04	7 (20%) 95% ДИ: 6,75-33,25
40-59%	6 (21,43%) 95% ДИ: 6,23-36,63	15 (42,86%) 95% ДИ: 26,46-59,25
60-79%	5 (17,86%) 95% ДИ: 3,67-32,04	5 (14,29%) 95% ДИ: 2,69-25,88
80-100%	6 (21,43%) 95% ДИ: 6,23-36,63	5 (14,29%) 95% ДИ: 2,69-25,88
Всего:	26 (92,86%) 95% ДИ: 83,32-100	33 (94,29%) 95% ДИ: 86,60-100

Таблица 3

Уровень распада бензилпенициллина в сыворотке крови больных рожей и пневмонией

Уровень распада бензилпенициллина	Рожа (n=30)	Пневмония (n=35)
0% (распад отсутствовал)	2 (6,67%) 95% ДИ: 0-15,59	0
1-19%	1 (3,33%) 95% ДИ: 0-9,76%	0
20-39%	1 (3,33%) 95% ДИ: 0-9,76%	1 (2,86%) 95% ДИ: 0-8,38
40-59%	1 (3,33%) 95% ДИ: 0-9,76%	1 (2,86%) 95% ДИ: 0-8,38
60-79%	10 (33,33%) 95% ДИ: 16,46-50,2	13 (37,14%) 95% ДИ: 21,13-53,15
80-100%	15 (50%) 95% ДИ: 32,11-67,89	20 (57,14%) 95% ДИ: 40,75-73,54
Всего:	28 (93,33%) 95% ДИ: 84,41-100	100%

(метод ранговых корреляций Спирмена, гамма-корреляция), были выявлены следующие корреляции, представляющие клинко-патогенетический интерес (таблица 4).

Прямая корреляция средней силы между уровнями распада ампициллина и бензилпенициллина указывает на общность факторов, катализирующих распад обоих антибиотиков, и, возможно, на общность собственно механизмов катализа.

Наличие зависимости между уровнем распада ампициллина в крови и фактом назначения ампициллина данному больному, а

также продолжительностью лечения ампициллином свидетельствует о том, что повышенный распад ампициллина в крови больных может быть ответной реакцией организма на длительное назначение данного антибиотика и, соответственно, опосредоваться каким-либо индуцибельным фактором.

Обратная корреляция между уровнем бета-лактамазной активности крови и концентрацией общего белка в крови косвенно указывает на то, что фактор, ответственный за проявление каталитических свойств, низкомолекулярный, и, связываясь с белками крови,

Таблица 4

Выявленные корреляционные взаимосвязи между наличием и уровнем бета-лактамазной активности крови и клинико-лабораторными показателями

Коррелирующие факторы	Коэффициент корреляции	Показатель вероятности нулевой гипотезы (p)	Метод вычисления корреляционной зависимости
Уровень распада ампициллина и уровень распада бензилпенициллина	+0,68	<0,005	Гамма
Уровень распада ампициллина и факт назначения ампициллина больному	+0,71	<0,05	Гамма
Уровень распада ампициллина и продолжительность лечения ампициллином	+0,66	<0,05	Гамма
Уровень распада бензилпенициллина и концентрация общего белка крови	-0,55	<0,05	Спирмена
Уровень распада бензилпенициллина и концентрация общего/ прямого билирубина в крови	+0,9...1,0	<0,05	Спирмена, гамма
Уровень распада бензилпенициллина и концентрация мочевины в крови	+0,51	<0,05	Спирмена

частично либо полностью утрачивает свою активность.

Наличие сильной прямой коррелятивной зависимости между уровнем распада бензилпенициллина в крови и концентрацией общего, прямого билирубина и мочевины, возможно, указывает на конкретные низкомолекулярные вещества, которые (не исключено, что в комплексе с альбуминами крови) могут оказаться способны осуществлять специфический катализируемый распад антибиотиков бета-лактамной группы. Данное предположение требует обязательной экспериментальной проверки.

Анализ с использованием U-теста Манна-Уитни показал, что уровень распада бензилпенициллина несколько выше в крови мужчин ($p=0,04$).

Уровень распада ампициллина оказался достоверно выше в крови лиц, получавших ампициллин в ходе антибактериальной терапии ($p=0,049$).

Никаких иных достоверных различий частоты встречаемости и уровня бета-

лактамазной активности сыворотки крови в зависимости от значений каких-либо еще существенных клинико-лабораторных показателей выявлено не было.

3. Возможная практическая значимость выявленного феномена

В этом разделе мы представили очень приблизительный анализ вклада обнаруженного и описанного нами явления в общую структуру разрушения изученных бета-лактамных антибиотиков (ампициллина и бензилпенициллина) в процессе их циркуляции в крови. В частности, с учетом того, что:

1) объем циркулирующей крови у взрослого человека составляет около 5 литров,

2) и ампициллин, и бензилпенициллин назначаются парентерально по 1-1,5 грамма препарата 4 раза в сутки (4-6 раз в сутки для пенициллина), и, соответственно, период активной циркуляции препарата в крови составляет 4-6 часов, то концентрация обоих препаратов в крови непосредственно после инъекции составляет около 0,2-0,3 мг/мл, что хорошо соотносится с использованной нами в

эксперименте концентрацией указанных антибиотиков (0,18 мг/мл).

Можно предположить, что при выявленном нами среднем уровне распада ампициллина в 51% и бензилпенициллина в 79% от исходно введенного (за 20 минут инкубации при 37°C) концентрация обоих антибиотиков в крови существенно снижается за небольшой (не более 1 часа) срок с момента их парентерального введения, что подчеркивает *практическую значимость* обнаруженного и описанного феномена: при идентификации фактора (или нескольких), ответственных за проявление столь высокой собственной бета-лактамазной активности крови, и нахождении способа его (их) эффективного ингибирования можно было бы радикально снизить используемые в клинической практике дозировки бета-лактамных антибиотиков, что повлекло бы за собой как существенную экономию средств, ассигнуемых на этиотропную терапию, так и заметное сокращение частоты побочных эффектов лечения.

Заключение

1. Не вызывает сомнения, что кровь больных как рожей, так и пневмонией способна осуществлять эффективный специфический (по бета-лактамной связи) гидролиз бета-лактамных антибиотиков. Степень выраженности бета-лактамазной активности сыворотки крови не зависит от пола, возраста больных и характера заболевания.

2. Уровень описанной собственной бета-лактамазной активности крови достаточен для существенного снижения концентрации исследованных антибиотиков в крови за время их эффективной циркуляции (вплоть до полного распада), что указывает на большую практическую значимость обнаруженного феномена.

3. Природа факторов, опосредующих указанную активность крови, остается неизвестной. Тем не менее, получены косвенные указания на то, что данные факторы являются низкомолекулярными веществами (прямой и общий билирубин, мочевины), возможно, проявляющими свою бета-лактамазную актив-

ность в комплексе с альбуминами. При этом катализируемый распад ампициллина и бензилпенициллина осуществляется одними и теми же факторами и по сходному механизму.

Выявленный феномен имеет большое клиническое значение, т.к., будучи подтвержденным, может объяснить многие из наблюдаемых случаев неэффективности антибактериального препарата *in vivo* при его доказанной микробиологической эффективности *in vitro*. Кроме того, распознав фактор (или факторы), ответственный за аномально высокий распад бета-лактамов в крови, и разработав эффективную методику его/их ингибирования, можно резко повысить «относительную» эффективность бета-лактамов, и, соответственно, многократно снизить их терапевтические дозировки, что приведет в итоге к существенной экономии средств, выделяемых на эмпирическую антибактериальную терапию. Помимо этого, в случае выявления высокой бета-лактамазной активности крови возможно изменение проводимой конкретному больному антибактериальной терапии – назначение какого-либо из ингибитор-защищенных бета-лактамов либо антибактериального препарата из других фармакологических групп; своевременная коррекция проводимой этиотропной терапии позволит ускорить выздоровление и сократить продолжительность госпитализации больного.

Несомненно, необходимы дальнейшие углубленные лабораторные и клинические исследования обнаруженного феномена, который представляет существенный теоретический и практический интерес для клиники инфекционных болезней.

Литература

1. Особенности «биологической» антибиотикоустойчивости при шигеллезах: выявление *in vivo* поликлональных IgG, обладающих пенициллиназной активностью / И. В. Жильцов [и др.] // Медицинская парадоксы. – 2006. – №5 (62). – С. 46–48.
2. Jerne, N. K. Towards a network theory of the immune system / N. K. Jerne // Ann. Immunol. (Inst. Pasteur). – 1974. – Vol. 125, № 1-2. – P. 373–389.
3. Bactericidal Killing Activities of Cefepime, Ceftazidime, Cefotaxime, and Ceftriaxone against *Staphylococcus aureus* and β -Lactamase-Producing Strains of *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae*

- in an In Vitro Infection Model / M. Shirley Palmer [et al.] // *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. – 1995. – Vol. 39, N 8. – P. 1764-1771.
4. Mechanism of penicillin action: Penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases (B-lactam/peptidoglycan/ membrane enzyme/ penicillinase/ acyl enzyme) / R. Rogers Yocum [et al.] // *Biochemistry*. – 1979. – Vol. 76, № 6. – P. 2730-2734.
5. Blumberg, P. M. Interaction of Penicillin with the Bacterial Cell: Penicillin-Binding Proteins and Penicillin-Sensitive Enzymes / M. Peter Blumberg, L. Jack Strominger // *Bacteriological Reviews*. – 1974. – Vol. 38, N 3. – P. 291-335.
6. Страчунский, Л. С. Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей / под ред. Л.С.Страчунского, С. Н. Козлова. – М.: Боргес, 2002. – 432 с.
7. Livermore, D. M. b-lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. / D. M Livermore / *Antibiotics in laboratory medicine* / ed. V. Lorian D.M. – Williams Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. – P. 503-578.
8. Walter, E. Hydrolysis of 3-Acetoxymethyl Cephalosporins by Lysed WholeBlood / E. Walter Wright, A. Judith Frogge // *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. – 1980. – Vol. 17, N 1. – P. 99-100.
9. Moellering, R. C. The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics / R. C. Moellering, G. M. Eliopoulos, D. E. Sentochnik // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1989. – Vol. 24. – Suppl. A. – P. 1-7.
10. Menashi, A. C. A colorimetric procedure for measuring b-lactamase activity / A. C. Menashi, J. Abraham, A. M. Antone Menashi // *Analytical Biochemistry*. – 1988. – Vol. 168. – P. 252-258.

Поступила 15.12.2008 г.
Принята в печать 02.03.2009 г.

© ЛОГВИНЕНКО С.М., 2009

ОПЫТ ОРГАНИЗАЦИИ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ ИНФЕКЦИОННЫМ БОЛЬНЫМ В РЕСПУБЛИКЕ АФГАНИСТАН

ЛОГВИНЕНКО С.М.

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;
кафедра военной подготовки и экстремальной медицины*

Резюме. Статья посвящается 20-летию вывода Советских войск из Республики Афганистан. Пребывание Советских войск в Республике Афганистан стало новым этапом развития и приобретения огромного опыта оказания медицинской помощи инфекционным больным и противозидемического обеспечения личного состава войск в сложных условиях горно-пустынной местности.

Ключевые слова: военная медицина, инфекционные больные, противозидемическое обеспечение личного состава войск.

Abstract. The article is dedicated to the 20-th anniversary of the withdrawal of the Soviet Army from the Republic of Afghanistan. The presence of the Soviet Army there became a new stage in the development and gaining broad experience in rendering medical aid to infected patients and in preventing infectious diseases among the troops in the highland deserts.

Исторически инфекционная заболеваемость личного состава во время войн и вооруженных конфликтов существенно влияла на величину и характер санитарных потерь. Армии и болезни шли нога в ногу на протяжении всей истории военных конфликтов. Смертность от болезней зачастую превышала смертность на поле боя. Тиф, чума, холера и дизентерия, а не генералы предreshали исход многих военных кампаний. За все годы войны в Республике Афганистан число инфекционных больных в 40-й армии превысило число боевых санитарных потерь в 8 раз, составив 56,8% всех санитарных потерь. Инфекционные болезни во многом определяли и уровень общей заболеваемости военнослужащих.

Структура инфекционной заболеваемости военнослужащих во многом отражала эту патологию среди местного населения. Главной ее компонентой были кишечные инфекции (КИ), вирусные гепатиты с фекально-оральным механизмом передачи (ВГ), тифо-паратифозные инфекции (ТПИ), шигеллезы и другие диарейные болезни недизентерийной этиологии, малярия, амебиаз. В некоторые годы эти болезни занимали в структуре инфекционной патологии 58-75,4%. В большинстве районов Афганистана, особенно на востоке (провинции Нангархар, Лагман и Кунар), постоянно имелась угроза распространения холеры. Более чем из 80% частных колодцев выделялись холерные вибрионы, в том числе патогенные. В большинстве провинций страны имели место случаи тяжелых инфекционных заболеваний с диареей, рвотой, обезвоживанием и летальными исходами [1].

Адрес для корреспонденции: г. Витебск, ул. Терешковой, д. 28, к. 1, кв. 30, р.тел. 24-15-78, д.тел. 24-88-16.
– Логвиненко С.М.

Особенности оказания медицинской помощи инфекционным больным

В системе оказания специализированной медицинской помощи больным и пораженным терапевтического профиля ведущее место занимало лечение инфекционных больных, на долю которых приходилось от 45 до 70% от всех санитарных потерь. Вследствие слабой материальной базы военных госпиталей, дислоцированных на территории Афганистана, лечение основной массы инфекционных больных (45-75%) в 1980-1983 гг. было организовано за пределами страны в госпиталях ТуркВО. В 1985 г. в 40-й армии создается мощная госпитальная база для лечения таких больных, состоящая из четырех инфекционных госпиталей (на 1250 штатных коек) и нескольких инфекционных отделений в трех многопрофильных госпиталях (на 420 коек). Во всех инфекционных госпиталях были организованы отделения реанимации и интенсивной терапии, операционно-перевязочный блок с врачом-хирургом и операционной медицинской сестрой. В период с июня по декабрь, когда происходило резкое повышение инфекционной заболеваемости, число развернутых коек достигало 6000. Такая коечная емкость инфекционных стационаров армии позволяла обеспечить оказание медицинской помощи всем нуждающимся в полном объеме, несмотря на 3-4 кратную перегрузку. В октябре 1980 г. создан реабилитационный центр в г. Азаббаше (ТуркВО), а в ноябре 1983г. – в гарнизоне Баграм (Афганистан) [1].

Основными принципами медицинской помощи инфекционным больным были их раннее активное выявление и своевременная госпитализация, разработка и применение новых схем и методов комплексного лечения и интенсивной терапии, реабилитация и диспансеризация переболевших военнослужащих. В ходе войны доля своевременно госпитализированных инфекционных больных увеличилась с 10-15% (1982-1983гг.) до 70% (1984-1989 гг.). Совершенствование действовавшей в 40-й армии системы оказания медицинской помощи способствовало улучшению исходов инфекционных заболеваний:

общая смертность в 1983 – 1988 гг. снизилась в 16 раз, при вирусных гепатитах она уменьшилась в 8 раз, амебиазе – в 5 раз. В 1988 г. уже не было зарегистрировано смертельных исходов при брюшном тифе, малярии, дифтерии. В среднем за годы войны возвращено в строй 99,6% переболевших инфекционными заболеваниями. Главным критерием эффективности деятельности военно-медицинской службы является число раненых и больных, возвращенных в строй. В Афганистане было возвращено в строй 77,9% раненых. Больше всего было возвращено в строй во втором периоде войны (1985-1988 гг.) – 82,4%, по сравнению с 74,1% за первый период (1980-1984 гг.). У больных по периодам войны эти показатели были следующими: первый – 87,2%, второй – 91,4%, в среднем – 89%. Высокий уровень инфекционной заболеваемости личного состава воинских частей, ограниченные возможности изоляторов медицинских пунктов, сложности ранней диагностики болезней, связанные со своеобразием клинических проявлений инфекционного процесса и частым сочетанием инфекционных заболеваний (тифо-паратифозные инфекции + малярия, инфекция + обезвоженность организма, инфекция + ранение), отсутствие наземных путей эвакуации в горных регионах, трудности использования для этих целей авиатранспорта в значительной мере затрудняли деятельность медицинской службы, отрицательно сказывались на эффективности медицинской помощи инфекционным больным [1].

Основные проблемы в ранней диагностике инфекционных заболеваний

В Республике Афганистан медицинская служба впервые столкнулась с совершенно особой медицинской обстановкой, характеризовавшейся массовой заболеваемостью личного состава полиинфекцией. До этого, в периоды гражданской и Великой Отечественной войн и в мирное время, военные и гражданские медики имели опыт работы только при эпидемических вспышках какой-либо одной инфекции. Во время войны в Афганистане в

эпидемический период, с июня по декабрь, в большинстве войсковых частей отмечались эпидемические вспышки инфекций одновременно несколькими (3-5) нозологическими формами. Массовая инфекционная заболеваемость обусловила 79-88% трудопотерь от всех заболеваний и ранений.

Основными причинами многих дефектов на догоспитальном этапе являлись недостаточная квалификация войсковых врачей и отсутствие практических навыков ранней диагностики и неотложной помощи при инфекционных заболеваниях. В целях улучшения организации оказания помощи инфекционным больным внедрялись новые формы и методы активного выявления заболевших: осмотры инфекционистом и врачами частей всего личного состава, вернувшегося с боевых действий, немедленная госпитализация больных и подозрительных на инфекционные заболевания, использование в войсковом звене пробы Розина для выявления желчных пигментов в моче при подозрении на вирусный гепатит, микроскопия «толстой» капли на малярийный плазмодий у всех больных с повышенной температурой тела и др. Это позволило повысить число своевременно изолированных и госпитализированных больных (в 1986-1988 гг. до 65-70%). Эффективным оказалось создание в отдельных войсковых частях гарнизонных изоляторов на 60-100 коек при медицинских ротах или ОМедБ и расширение объема медицинской помощи инфекционным больным до квалифицированной в случаях вынужденной задержки их эвакуации в инфекционные госпитали.

На основании изучения клинической симптоматики начального периода актуальных нозологических форм в целях улучшения ранней диагностики инфекционных заболеваний с учетом особенностей их течения в условиях Афганистана были составлены диагностические таблицы, их использование врачами медицинских пунктов способствовало уменьшению числа диагностических ошибок в 2-3 раза. Профессорско-преподавательским составом кафедры инфекционных болезней ВМедА им. С.М. Кирова, разработаны и внедрены в практику комплексные схемы неот-

ложной помощи в войсковых частях при наиболее часто встречающихся в Афганистане синдромах критических состояний (дегидратационный синдром, инфекционно-токсический шок, инфекционно-токсическая энцефалопатия) и больным в тяжелом состоянии при наиболее актуальных инфекциях (малярия, холера, менингококковая инфекция, дифтерия). Внедрение в практику в войсковых частях новых методов и организационных форм раннего активного выявления, своевременной диагностики и оказания неотложной помощи инфекционным больным способствовало уменьшению числа больных, поступавших в госпитали в тяжелом состоянии, например, при брюшном тифе с 1985 по 1988 г. с 20,5% до 3,1% больных.

Вклад профессорско-преподавательского состава кафедры инфекционных болезней ВМедА им. С.М. Кирова

На качество медицинской помощи инфекционным больным оказывало значительное влияние отсутствие адекватной госпитальной базы на территории Афганистана. Поэтому большая часть больных в 1980-1983 гг. эвакуировалась в госпитали Туркестанского военного округа, тем самым нарушался принцип выноса инфекции за пределы эпидемического очага. К 1986 г. на территории Афганистана была создана мощная, хорошо оснащенная госпитальная база для лечения инфекционных больных. В периоды эпидемического повышения заболеваемости число развернутых коек достигало 6000. Это позволило полностью прекратить эвакуацию инфекционных больных на территорию СССР и обеспечить оказание им медицинской помощи в полном объеме даже в условиях 4-кратной перегрузки.

На госпитальном этапе оказания медицинской помощи решающее значение в улучшении исходов заболеваний имели разработанные и внедренные профессорско-преподавательским составом кафедры инфекционных болезней ВМедА им. С.М. Кирова при активном участии главных инфекционистов 40-й армии новые методы медицинской сортировки, новые схемы комплексного лечения раз-

личных нозологических форм и новые организационные принципы интенсивной терапии. При массовом поступлении в госпитали больных из эпидемических очагов полиинфекции особую роль приобретала медицинская сортировка, которая проводилась с учетом степени эпидемической опасности больных, тяжести состояния и течения болезни, нуждаемости в неотложной и интенсивной терапии. На сортировочной площадке выделялись группы больных по предназначениям: в отделение (блок) интенсивной терапии и реанимации (ОИТР, БИТ) – нуждавшиеся в интенсивной терапии и экстренных оперативных вмешательствах; в боксы диагностического отделения – с неясной клинической картиной; в профильные отделения (для брюшного тифа, вирусного гепатита, кишечных или сочетанных инфекций) и полубоксовое отделение – с воздушно-капельной инфекцией и малярией. В военных инфекционных госпиталях лечебные отделения профилировались не только для каждой отдельной нозологической формы, но и для наиболее массовых инфекций (вирусный гепатит, брюшной тиф) и по степени тяжести заболевания (для тяжелых, среднетяжелых и легких форм). В профильных отделениях сортировка продолжалась по принципу «пропускной системы» с разделением больных в периоды разгара, реконвалесценции, нуждавшихся в интенсивном наблюдении, а также бактериовыделителей. Для всех потоков и групп больных в приемном, диагностическом, профильных отделениях, а также в ОИТР (БИТ) были составлены рациональные комплексные схемы обследования и лечения. Разработка и внедрение системы медицинской сортировки при массовом поступлении больных с полиинфекцией в госпитали позволили улучшить организацию диагностических и лечебных мероприятий однородным группам больных, более рационально использовать медицинские силы и средства, улучшить эффективность лечебно-диагностической работы и уменьшить возможность внутригоспитального заражения. В целях улучшения исходов заболеваний потребовалась разработка новых комплексных схем лечения и интенсивной терапии при инфекционных заболеваниях

ях, а также новых организационных принципов их применения [1].

С учетом развития синдрома изотонической дегидратации, возникавшего у инфекционных больных под влиянием высокой лихорадки и температуры воздуха и сочетавшегося при кишечных инфекциях с гипертоническим обезвоживанием, составлены эффективные схемы инфузионно-трансфузионной терапии различных инфекционных заболеваний. Важное значение в этих схемах имело преобладающее использование изотонических кристаллоидных растворов и ограничение коллоидных растворов, приводивших к повышению осмотического давления крови, усилению клеточной дегидратации и сердечной недостаточности. С дезинтоксикационной и заместительной целью потребовалось повышение доз глюкокортикоидов, инсулина, аскорбиновой кислоты. При лечении больных с дефицитом массы тела применялось зондовое энтеральное введение белковых гидролизатов отечественного производства.

Существенное значение для восстановления трудо- и боеспособности переболевших инфекционными заболеваниями имело создание системы реабилитационных мероприятий, которые вначале осуществлялись в центре выздоравливающих на 1500 коек, а затем в филиалах (ротах) центров выздоравливающих при госпиталях. Последняя организационная форма оказалась оптимальной в связи с исключением безвозвратных потерь и материальных затрат на транспортировку выздоравливающих. В результате реабилитации трудопотери у переболевших вирусным гепатитом и брюшным тифом удалось снизить в среднем на 12,6 дня и вернуть в строй 98% реконвалесцентов после этих заболеваний [1].

Новая система оказания медицинской помощи инфекционным больным на догоспитальном и госпитальном этапах, включавшая раннее активное выявление, неотложную помощь и своевременную госпитализацию больных, систему медицинской сортировки, новые комплексные схемы лечения и организационные принципы интенсивной терапии, системе реабилитации, способствовала улучшению исходов инфекционных заболеваний и сокра-

щению сроков восстановления трудо- и боеспособности. Общая летальность при эпидемических инфекционных заболеваниях с 1983 по 1989 г. снизилась в 16 раз (с 0,49% до 0,03%), существенно уменьшилась летальность при всех актуальных инфекциях, например, при вирусном гепатите – в 8 раз (с 0,33% до 0,04%), амебиазе – в 5 раз (с 1,2% до 0,22%). На фоне прогрессивного улучшения исходов заболевания в 1988 г. удалось предотвратить летальные исходы при брюшном тифе (1982 г. – 3,3%), малярии (1983 г. – 0,27%), дифтерии (1985 г. – 2,5%) [1].

Социальные факторы, влияющие на возникновение и распространение инфекционных заболеваний

Причины и условия высокой инфекционной заболеваемости в большинстве соединений и частей были весьма разнообразными. Использование для питьевых и хозяйственных нужд загрязненной воды рек, арыков, кяризов, употребление овощей, зелени и фруктов, приобретенных у местного населения, поддерживало постоянный занос инфекции в военные городки, а низкий уровень коммунального обустройства способствовал «закреплению» возбудителей инфекций и создавал условия для активной их циркуляции в коллективах.

Наиболее значимым эпидемиологическим фактором, снижавшим заболеваемость личного состава, являлось обеспечение, достаточным количеством доброкачественной воды, учитывая одну из главных природных особенностей Афганистана – жаркий климат и горно-пустынная местность. К сожалению, коммунальное обустройство гарнизонов велось недостаточно быстрыми темпами. Так, в 1980 г. обеспечение личного состава водой даже по полевым нормам составило лишь 54,7%. В отдельных гарнизонах воду подвозили из местных водоисточников, имевших признаки фекального загрязнения. Лишь в 1984 г. в большинстве мест была достигнута достаточная водообеспеченность. К исходу 1987 г. дебит артезианских скважин уже двукратно превышал норму водообеспечения. В то же время в большинстве гарнизонов около

половины скважин имели признаки фекального загрязнения воды, а из-за частого выхода из строя глубинных насосов и срывов в энергообеспечении городков наблюдались значительные по времени перебои в подаче воды. Загрязнение воды артезианских скважин обуславливалось проникновением в водоносные горизонты нечистот, чему способствовала повышенная проницаемость грунтов в большинстве гарнизонов. Водонепроницаемые слои здесь залегают на глубине более 100 м, а многие скважины, особенно в первые годы, оборудовались на меньших глубинах. Именно в таких местах отмечались крупные вспышки кишечных инфекций, связанные с попаданием фекалий в водоносные горизонты. Загрязнению водоисточников способствовало также бесконтрольное строительство наружных туалетов поглощающего типа. После наполнения их закапывали без обеззараживания и строили новые. Лишь с 1985 г., по настоятельному требованию военно-медицинской службы, в военных городках началось строительство туалетов с бетонированными выгребными. Практически за все время войны в Афганистане решалась проблема обеспечения водой мелких групп военнослужащих на сторожевых заставах. Для этой цели использовались в основном открытые водоемы, вода которых без предварительной очистки и обеззараживания была непригодна для питьевых и хозяйственных нужд. Имевшиеся в достаточном количестве технические средства очистки и обеззараживания воды использовались на заставах редко и с серьезными нарушениями технологии, что приводило к возникновению групповых инфекционных заболеваний.

Существенное влияние на распространение кишечных инфекций оказывали многочисленные нарушения санитарно-гигиенических норм и правил при организации питания личного состава. В первые годы пребывания войск в Афганистане приготовление пищи организовывалось на полевых пунктах питания, где проявлялось отсутствие опыта приготовления пищи в полевых условиях со стороны личного состава продовольственной службы. По мере строительства стационарных столовых питание личного состава стало осу-

ществляться из столовой посуды. Централизованное обеспечение водой и условия для мытья посуды и кухонного инвентаря имелись только в каждой третьей столовой, а местная канализация – в 72%. Недостатки в организации питания сопровождались загрязнением разделочных столов, кухонного инвентаря и посуды кишечной микрофлорой. Обсемененность кишечной палочкой в разные годы составляла 10-40%. Отсутствие условий для мытья и обеззараживания столовой посуды приводило к росту заболеваемости вирусным гепатитом и дизентерией. По требованию медицинской службы и эпидемическим показаниям в солдатских столовых стали использоваться индивидуальные котелки, с целью разрыва механизма передачи инфекции.

Крайне негативное влияние на санитарно-эпидемическую обстановку оказывало несвоевременное выявление и изоляция инфекционных больных. В отдельные годы первые 3 суток изолировалось не более 55-80%. В условиях низкого санитарно-гигиенического состояния воинских частей длительное пребывание заболевших в подразделениях, как правило, имело следствием возникновение новых заболеваний. Осложняло эпидемическую обстановку и несвоевременное проведение в эпидемических очагах заключительной дезинфекции, особенно при размещении личного состава в палатках. Отсутствие в подразделениях необходимых условий для соблюдения правил личной гигиены, в частности умывальников, приводило к использованию для умывания и чистки зубов воды из открытых водоемов.

Строительство военных городков не отличалось комплексностью. Особенно отставала прокладка канализационных сетей, которая так и не была завершена в большинстве военных городков. Обычно сточные воды в военных городках собирались в септики и выводились ассенизационными машинами. Лишь в отдельных гарнизонах они по самотечной канализации выводились за пределы военных городков и сбрасывались в «арыки», реки или на грунт. Из-за сложностей обстановки мусор и пищевые отходы вывозили на прилегающую к военным городкам территорию. К 1986 г. во

многих гарнизонах свалки находились в непосредственной близости от мест размещения личного состава. Это, а также большое количество наружных туалетов поглощающего типа способствовало интенсивному выплоду мук. Существенным фактором, повышавшим восприимчивость личного состава к инфекционным заболеваниям, стал так называемый синдром эколого-эмоционального перенапряжения, приводивший к иммунодепрессивным состояниям. На этом фоне существенно снижались резистентность организма к возбудителям инфекций и эффективность иммунопрофилактики.

Опыт оказания медицинской помощи инфекционным больным

Анализ противэпидемической работы в Афганистане, в условиях недостаточной обустроенности военных городков в районах с жарким климатом, указывает на возрастание практического значения медицинских мероприятий, направленных на выявление и нейтрализацию источников инфекции, разрыв путей передачи возбудителей и повышение невосприимчивости личного состава к инфекционным заболеваниям. Необходимы дальнейшие научные исследования механизмов развития эпидемического процесса в воинских коллективах, поиск эффективных средств и методов профилактики возникновения и распространения инфекционных заболеваний. Реализованный в 40-й армии комплекс санитарно-гигиенических мероприятий, связанных с обустройством войск, совершенствованием функционирования и улучшением санитарного состояния объектов тыла и жизнеобеспечения, в конечном счете, обеспечил вначале стабилизацию, а затем и снижение инфекционной заболеваемости. Опыт профилактической работы медицинской службы, приобретенный в Афганистане, положен в основу ряда руководящих документов, в том числе и вновь изданного руководства по медицинскому обеспечению Вооруженных Сил. В Афганистане медицинская служба приобрела огромный опыт борьбы с инфекционными заболеваниями. Наиболее сложной задачей

было проведение санитарно-гигиенических и противоэпидемических мероприятий для предупреждения возникновения инфекционных заболеваний и состояний, вызываемых специфическими природными факторами данного региона. Опыт оказания медицинской помощи инфекционным больным в Афганистане необходимо использовать всем врачам, врачам-инфекционистам, для оказания медицинской

помощи военнослужащим и населению в стационарных и полевых условиях, в чрезвычайных ситуациях мирного и военного времени.

Литература

1. Опыт медицинского обеспечения Советских войск в Афганистане и вопросы дальнейшего развития военной медицины: материалы Всесармейской науч. конф., Москва, 6-8 апр. 1992 г.

*Поступила 12.01.2009 г.
Принята в печать 02.03.2009 г.*



© ЯНЧЕНКО В.В., 2009

ВЫЯВЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IGE АНТИТЕЛ ОКТАПЕПТИДОМ, АНАЛОГОМ FcεRI РЕЦЕПТОРА

ЯНЧЕНКО В.В.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;
кафедра клинической иммунологии и аллергологии

Резюме. Предложено новое диагностическое направление – выявление антител с использованием пептидов, структурных аналогов Ig-связывающего сайта активного центра рецептора для иммуноглобулинов. Высокоаффинный рецептор для иммуноглобулина E (FcεRI) – ключевая высокоспециализированная структура на поверхности ряда клеток системы иммунитета, связывающая иммуноглобулин E. Классическими методами пептидной химии синтезирован фрагмент активного центра FcεRIα – октапептид WRNWDVYK. С использованием иммуоферментной тест-системы доказана способность синтезированного октапептида связывать специфические антитела E класса к аллергену клеща рода *Dermatophagoides pteronyssinus*. Полученный пептид является потенциальным диагностическим средством.

Ключевые слова: пептид, иммуноглобулин E, IgE, высокоаффинный рецептор для иммуноглобулина E, FcεRI, аллергия, бронхиальная астма.

Abstract. Such new diagnostic direction as antibody detection with the help of peptides which are the analogues of Ig-binding site, located in the active centers of receptors for immunoglobulins is suggested in this article. High affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI) is a key highly specialized structure on the surface of a number of immune cells. Fragment of active FcεRIα center – octapeptide WRNWDVYK has been synthesized by means of classical methods of peptide chemistry. The synthesized octapeptide's capacity to bind specific IgE to allergen of mite *Dermatophagoides pteronyssinus* has been proved with the help of immunoenzyme test-system. The obtained peptide may potentially be used for diagnostic purposes.

Лабораторные технологии постоянно совершенствуются. Для определения одного показателя могут использоваться несколько методов. Классическим иммунологическим методом выявления антител определённых классов является использование вторичных антител против константного фрагмента тяжёлой цепи иммуноглобулина [1]. Нами предложено новое диагностическое направление – выявления антител с использованием коротких пептидов, входящих в активный центр рецепторов для иммуноглобулинов. Так, высокоаффинный рецептор для иммуноглобулина E (FcεRI) – ключевая высокоспециализированная структура на поверхности ряда

клеток системы иммунитета [2, 3], связывающая иммуноглобулин E. Высокоаффинный Fc-рецептор иммуноглобулина E состоит из нескольких субъединиц: α, β, γ, образующих комплекс. Когда говорят про специфичные к Fc-фрагменту иммуноглобулина рецепторы, подразумевают именно α-субъединицу. Возможны только 2 варианта активных комплексов FcεRI: α-β-γ-γ и α-γ-γ [4, 5].

Альфа-субъединица FcεRI (FcεRIα) выполняет роль стыковочного узла с молекулой иммуноглобулина, основная часть этой молекулы расположена вне клетки. В 1988 году впервые установлена локализация гена FcεR1A и получен его клон в виде комплементарной ДНК [6]. Ген альфа-цепи высокоаффинного рецептора иммуноглобулина E человека локализован в 1 хромосоме, в локусе 1q23 [7, 8].

Адрес для корреспонденции: 210027, г. Витебск, пр. Черняховского, д. 22, к.3, кв. 23, р.тел. 8-0212-22-53-80, д.тел. 8-0212-22-73-78, моб. 651-4321 (Velcom). – Янченко В.В.

Связывание иммуноглобулина Е с FcεRIα является высокоспецифичным. Период полураспада комплекса FcεRIα-IgE на поверхности клетки составляет 2 недели. Установлено, что кинетика диссоциации комплекса FcεRIα-IgE больше всего зависит от C2 домена IgE [9].

Цель данного исследования – разработать и апробировать *in vitro* новое потенциальное диагностическое средство, связывающее и выявляющее IgE. Определить способность WRNWDVYK-октапептида, фрагмента FcεRIα связывать специфический IgE крови человека.

Методы

Используя компьютерную программу Биоскан 9.0 ОДО «НИКП Ресан», базу данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) – локус NM_002001, базу данных известных структур протеинов и нуклеиновых кислот Великобритании (PDB) – файл 1f6a (авторы: S.C.Garman, B.A.Wurzburg, S.S.Tarchevskaya, J.P.Kinet, T.S.Jardetzky) был произведен анализ структуры альфа цепи высокоаффинного рецептора иммуноглобулина Е (FcεRIα), выбран установленный в результате компьютерного анализа пептидный фрагмент, предположительно принимающий участие в лиганд-рецепторном взаимодействии с C2 доменом IgE.

В Институте биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси классическими методами пептидного синтеза был получен фрагмент FcεRIα – октапептид WRNWDVYK [10]. Для способности визуальной оценки связывания октапептида с IgE был получен конъюгата WRNWDVYK пептида с пероксидазой хрена (Sigma, product № P8375). Синтез конъюгата WRNWDVYK-пероксидаза хрена осуществляли по описанной ранее методике [11]. Концентрацию пероксидазы хрена в конъюгате определяли спектрофотометрически, используя при расчете коэффициенты экстинкции $A_{280\text{ нм}, 1\text{ см}, 1\text{ мг/мл}} = 0,73$, $A_{403\text{ нм}, 1\text{ см}, 1\text{ мг/мл}} = 2,275$, $\epsilon_{403} = 109\,000\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$. Концентрация пероксидазы хрена в конъюгате составила 0,8 мг/мл, концентрация конъюгата – 5,2 мг/мл. Для стабилизации конъюгата

применяли стабилизатор для белков (“Диа+”, фирма “Хема-медика”) в объемном соотношении конъюгат:стабилизатор 1:2. Конъюгат хранили до использования при +4°C.

Такая конструкция, пептид-фермент, позволяет оценить связывание синтезированного WRNWDVYK-октапептида с IgE по изменению ферментативной активности пероксидазы хрена после взаимодействия с субстрат-хромогенной смесью.

Готовили экспериментальные тест-системы *Dermatophagoides pteronyssinus* №DP0004. Рабочий раствор (100 PNU/мл) дилизованного аллергена из *Dermatophagoides pteronyssinus* (5000 PNU/мл, ОАО «Биомед им. И.И. Мечникова») на 0,1 М Na-карбонатном буфере вносили по 100 мкл в каждую лунку планшетов (Nunc MaxiSort 468667). Инкубировали закрытые планшеты 18 часов при температуре +4°C. Удаляли после 18 часов инкубации содержимое лунок и промывали немедленно лунки промывочным раствором 3 раза, каждый раз заполняя лунку 300 мкл промывочного раствора на 1 минуту. Хранили до использования при +4°C.

Сравнивали способность конъюгата WRNWDVYK-пероксидаза хрена выявлять специфические антитела Е класса к аллергену *Dermatophagoides pteronyssinus* с аналогичной способностью Anti-Human IgE (ε-chain specific) peroxidase conjugate (Sigma, product № A9667).

Anti-Human IgE (ε-chain specific) peroxidase conjugate (Sigma, product № A9667) 2 мл разводили 1:10 PBS-T, делили на аликвоты по 1 мл и замораживали. Хранили до использования при -20°C.

Исследовано 24 образца сывороток крови больных бронхиальной астмой лёгкой и средней тяжести с разной степенью сенсibilизации к аллергенам *Dermatophagoides pteronyssinus*. Диагноз аллергической бронхиальной астмы был документально подтверждён на основе критериев “Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention” [12] и кожных тестов с аллергеном *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Схема опыта №DP0004 WRNWDVYK- и Анти-Е конъюгаты

На 1 пробу использовали 2 лунки

- вносили в 2 лунки по 180 мкл фосфатного буферного раствора с твином 20 (PBS-T) и по 20 мкл исследуемой сыворотки, перемешивали;

- инкубировали 60 мин при температуре +37°C;

- промывали 3 раза PBS-T;

- вносили в первую лунку 150 мкл раствора конъюгата WRNWDVYK-октапептида с пероксидазой хрена, разведенного PBS-T 1:200;

- вносили во вторую лунку 150 мкл на лунку раствора конъюгата Anti-Human IgE с пероксидазой хрена, разведенного PBS-T 1:200;

- инкубировали 60 мин при температуре 37°C;

- промывали 3 раза PBS-T;

- вносили по 150 мкл раствора 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (ТМБ) (Sigma, product № Т8665);

- инкубировали 60 мин при +18°C в темном месте;

- вносили по 100 мкл на лунку стоп-реагента;

- регистрировали результаты реакции фотометрически, с помощью иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С производства РУПП «Витязь», Беларусь, при длине волны 450 нм.

Определение общего IgE WRNWDVYK-октапептидом с использованием стандартного сертифицированного набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации общего иммуноглобулина класса Е в сыворотке крови производства ЗАО «Вектор-Бест», Россия, каталожный номер А-8660 проводили по описанной в инструкции методике в небольшой модификации. В качестве конъюгатов использовали конъюгат из набора и конъюгат октапептида.

Также определяли связывание конъюгатов с первичными моноклональными антителами, сорбированными в лунки тест системы А-8660.

Схема опыта А-8660 + конъюгаты

- вносили в лунки 1 колонки планшета раствор для разведения сывороток (PPC) и

конъюгат WRNWDVYK-октапептида, разведенного PBS-T 1:100;

- вносили в лунки 2 колонки планшета раствор для разведения сывороток (PPC) и конъюгат моноклональных антител клона 8Е/4F4, разведенного PBS-T 1:100;

- вносили в лунки 3 колонки планшета раствор для разведения сывороток (PPC) и конъюгат контрольного октапептида (цитруллинированного октапептида, фрагмент филлагрина, аминокислотная последовательность которого абсолютно отлична от любого октапептидного фрагмента FcεRIα) [13], разведенного PBS-T 1:100;

Соотношение PPC и конъюгатов было следующим:

1 ряд – 180 мкл PPC + 20 мкл конъюгата; 2 ряд – 160 мкл PPC + 40 мкл конъюгата; 3 ряд – 120 мкл PPC + 80 мкл конъюгата; 4 ряд – 100 мкл PPC + 100 мкл конъюгата; 5 ряд – 80 мкл PPC + 120 мкл конъюгата; 6 ряд – 60 мкл PPC + 140 мкл конъюгата; 7 ряд – 40 мкл PPC + 160 мкл конъюгата; 8 ряд – 20 мкл PPC + 180 мкл конъюгата;

- инкубировали 30 минут при +37°C;

- промывали 3 раза PBS-T;

- вносили по 100 мкл раствора 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine с перекисью водорода;

- инкубировали 30 минут при +18°C в темном месте;

- вносили по 100 мкл на лунку стоп-реагента;

- регистрировали результаты реакции фотометрически, с помощью иммуноферментного анализатора АИФ-Ц-01С, при длине волны 450 нм.

Результаты и обсуждение

В результате исследования было установлено, что синтетический WRNWDVYK-октапептид связывался со специфическими антителами Е класса к аллергену *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Результаты оптической плотности в параллельных лунках, отражающих связывание специфических IgE к аллергену *Dermatophagoides pteronyssinus* WRNWDVYK-октапептидом и антителами против IgE из раство-

Таблица 1

Связывание специфических IgE к аллергену *Dermatophagoides pteronyssinus* WRNWDVYK-октапептидом и антителами против IgE из раствора сывороток больных аллергической бронхиальной астмой

ОП в лунках с WRNWDVYK-конъюгатом	ОП в лунках с Анти-Е конъюгатом	% ОП WRNWDVYK от Анти-Е	ОП в лунках с WRNWDVYK-конъюгатом	ОП в лунках с Анти-Е конъюгатом	% ОП WRNWDVYK от Анти-Е
0,516	0,829	62,2	0,887	1,386	64,0
0,641	0,806	79,5	0,938	1,260	74,5
0,624	0,864	72,2	1,552	1,323	117,3
0,902	0,446	201,9	1,050	1,155	90,9
0,816	0,848	96,3	1,571	1,532	102,5
1,061	0,965	110,0	1,012	1,077	94,0
0,732	0,760	96,3	1,216	1,285	94,7
0,916	1,031	88,8	1,832	2,012	91,1
1,288	1,229	104,8	1,405	1,719	81,7
1,871	1,745	107,2	0,711	1,177	60,4
1,344	1,391	96,7	1,396	1,495	93,4
0,657	1,435	45,8	1,616	1,675	96,4

Примечание. ОП - оптическая плотность.

ра сывороток больных аллергической бронхиальной астмой, представлены в табл.1, из которой видно, что WRNWDVYK-октапептид эффективно связывал специфические IgE. Связывание специфических IgE к аллергену *Dermatophagoides pteronyssinus* WRNWDVYK-октапептидом и антителами против IgE имели высокую прямую корреляцию ($r = 0,783$, $n=24$) и высокие значения оптических плотностей растворов.

При сравнении результатов кожных тестов с аллергеном *Dermatophagoides pteronyssinus* и результатов оптической плотности, отражающих связывание специфических IgE к аллергену *Dermatophagoides pteronyssinus* антителами против IgE Anti-Human IgE и WRNWDVYK-октапептидом корреляционная связь не наблюдалась ($r = -0,093$ для Anti-Human IgE и $r = -0,168$ для WRNWDVYK-октапептида).

Следующим шагом исследования было использование конъюгата WRNWDVYK-октапептида с пероксидазой хрена для определения общего IgE в сыворотке крови больных бронхиальной астмой. Для этого был взят набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации общего иммуноглобулина класса E в сыворотке крови производ-

ства ЗАО «Вектор-Бест», Россия, каталожный номер А-8660.

При определении общего IgE в сыворотке крови больных бронхиальной астмой конъюгатом WRNWDVYK-октапептида и конъюгатом из набора А-8660 корреляционная связь показателей оптических плотностей отсутствовала.

В результате исследования было выявлено, что внесение только одного WRNWDVYK-октапептида, меченного пероксидазой хрена, в лунки планшета тест-системы А-8660 с сорбированными первичными моноклональными антителами 8Е/5D4 против С_ε2 домена IgE приводило к резкому увеличению оптической плотности раствора после добавления субстрат-хромогенной смеси. Оптическая плотность раствора в лунках с WRNWDVYK-конъюгата была дозо-зависимой. Оптические плотности растворов в лунках с конъюгатами моноклональных антител клона 8Е/4F4 и контрольного пептида (цитруллинированный октапептид, фрагмент филагрина, аминокислотная последовательность которого абсолютно отлична от любого октапептидного фрагмента Fc ϵ RI α) почти во всех лунках были одинаковыми. Линии, отражающие зависимости оптических плотностей этих растворов от количества конъюгатов,

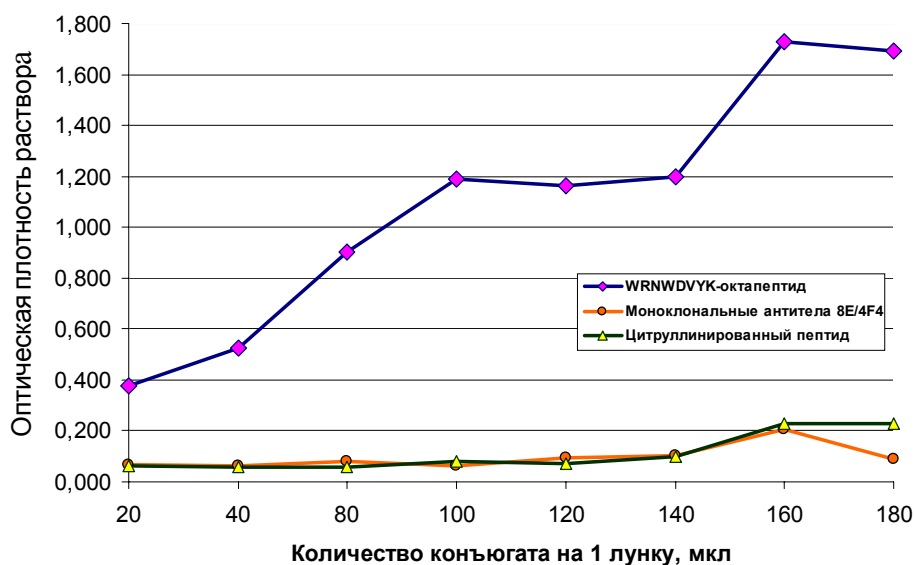


Рис. 1. Связывание моноклональными антителами 8E/5D4 против Cε2 домена IgE пептидов и антител клона 8E/4F4.

были почти на всём протяжении параллельны линии оси X (рис. 1).

Степень соответствия между антигенной детерминантой и антигенсвязывающей областью активного центра антитела определяется химической и пространственной комплементарностью. Если структуры антигена и активного центра антитела не соответствуют друг другу, то их притяжение будет слабым, а отталкивание сильным, и антитело не свяжет антиген. Важным моментом в образовании прочных специфических комплексов является наличие множественных контактов, позво-

ляющих, несмотря на слабость отдельных единичных взаимодействий, прочно удерживать антиген в активном центре. С количественной стороны специфичность взаимодействия антиген-антитело характеризуется аффинностью антител или равновесной константой образования иммунного комплекса.

Оптические плотности растворов, после связывания WRNWDVYK-, цитруллинированных пептидов и антител клона 8E/4F4 моноклональными антителами против человеческого Cε2 домена IgE (клон 8E/5D4), представлены в табл. 2.

Таблица 2

Связывание пептидов и антител клона 8E/4F4 моноклональными антителами против человеческого Cε2 домена IgE (клон 8E/5D4)

Количество компонентов, вносимое в лунки тест-системы А-8660 с первичными моноклональными антителами против IgE	ОП в лунках с WRNWDVYK-конъюгатом	ОП в лунках с Анти-Е (клон 8E/4F4) - конъюгатом	ОП в лунках с контрольным пептидным конъюгатом
180 мкл РРС + 20 мкл конъюгата	0,375	0,069	0,062
160 мкл РРС + 40 мкл конъюгата	0,523	0,064	0,058
120 мкл РРС + 80 мкл конъюгата	0,904	0,081	0,060
100 мкл РРС + 100 мкл конъюгата	1,191	0,064	0,083
80 мкл РРС + 120 мкл конъюгата	1,161	0,093	0,073
60 мкл РРС + 140 мкл конъюгата	1,200	0,101	0,098
40 мкл РРС + 160 мкл конъюгата	1,728	0,207	0,228
20 мкл РРС + 180 мкл конъюгата	1,691	0,092	0,228

Примечание. ОП - оптическая плотность.

Три исследованных конъюгата имели одинаковую пероксидазу хрена, но дозозависимое изменение оптической плотности было только в лунках с WRNWDVYK-конъюгатом. Объяснение этого феномена требует дополнительных исследований.

Анализируя результаты проведенных исследований с использованием иммуноферментных тест-систем, можно считать доказанным факт связывания WRNWDVYK-октапептидом специфических антител Е класса.

Заключение

Впервые для определения иммуноглобулинов использован короткий активный фрагмент рецептора иммуноглобулина.

Впервые доказана способность WRNWDVYK-октапептида, фрагмента высокоаффинного рецептора для иммуноглобулина Е, связывать специфические антитела Е класса к аллергену *Dermatophagoides pteronyssinus* из раствора сывороток больных аллергической бронхиальной астмой.

Установлена высокая прямая корреляционная связь ($r = 0,783$, $n=24$) между WRNWDVYK-октапептидом и Anti-Human IgE антителами в способности связывать специфические антитела Е класса к аллергену *Dermatophagoides pteronyssinus* из раствора сывороток больных аллергической бронхиальной астмой.

Использование более доступных и дешёвых синтетических пептидных соединений представляется перспективным направлением создания диагностических средств.

Октапептид WRNWDVYK обладает биологическим действием, связывается с иммуноглобулинами Е класса и может быть использован в качестве перспективного диагностического средства для выявления специфических антител Е класса у больных.

Литература

- Егоров, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова - М.: Высш. шк., 1991. - 288 с.
- Wang, B. Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via Fc epsilon RI. / B. Wang, A. Rieger, O. Kilgus, K. Ochiai, D. Maurer, D. Fodinger, J.P. Kinet, G. Stingl // J. Exp. Med. – 1992. – Vol. 175, № 5. - P. 1353-1365.
- Новиков, Д.К. Клеточная Fc-рецепторная сеть для антител и механизмы аллергии. / Д.К. Новиков, Н.Д. Титова, В.В. Янченко // Медицинская иммунология. - 2006. - Том 8, № 2-3. - С.207.
- Гущин, И.С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль. / И.С. Гущин -М.: Фарма-рус принт, 1998. – 252 с.
- Kawakami, T. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. / T. Kawakami, S.J. Galli // Nat. Rev. Immunol. – 2002. - Vol.2, № 10. - P. 773-786.
- Shimizu, A. Human and rat mast cell high-affinity immunoglobulin E receptors: characterization of putative alpha-chain gene products. / A. Shimizu, I. Tepler, P.N. Benfey, E.H. Berenstein, R.P. Siraganian, P. Leder // Proc. Nat. Acad. Sci. - 1988. - Vol.85. - P. 1907-1911.
- Tepler, I. The gene for the human mast cell high-affinity IgE receptor alpha chain: chromosomal localization to 1q21-q23 and RFLP analysis. / I. Tepler, C.C. Morton, A. Shimizu, R.F. Holcombe, R. Eddy, T.B. Shows, P. Leder // Am. J. Hum. Genet. -1989. Vol.45. - P. 761-765.
- Le Coniat, M. The human genes for the alpha and gamma subunits of the mast cell receptor for immunoglobulin E are located on human chromosome band 1q23. / M.Le Coniat, J.P. Kinet, R. Berger // Immunogenetics. – 1990. - Vol.32, № 3. P. 183-186.
- McDonnell, J.M. The structure of the IgE Ce2 domain and its role in stabilizing the complex with its high-affinity receptor FcεRIβ. / J.M. McDonnell, R. Calvert, R.L. Bevilacqua et al. // Nature structural biology. – 2001. - Vol.8, № 5. - P. 437-441.
- Martinovich, V.P. A study of immunobiological activity of the WRNWDVYK octapeptide. / V.P. Martinovich, O.V. Gribovskaya, V.V. Yanchenko [et al.] // 30th European Peptide Symposium (30EPS), Helsinki, Finlandia Hall, 30 August–5 September, 2008. - P. 112.
- Wilson, M.B. Recent developments of the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. / M.B. Wilson, P.K. Nakane // Immunofluorescence and Related Staining Techniques; edited by W. Knapp, K. Holubar, G. Wick. / Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978. – P. 215–224.
- Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NYLB / WHO Workshop Report 1993.
- Голубович, В.П. Синтез цитруллинсодержащих пептидов и исследование возможности их использования для диагностики ревматоидного артрита. / В.П. Голубович, В.П. Мартинович, О.В. Мельник [и др.] // Молекулярная медицина и биохимическая фармакология. Материалы республиканской научной конференции. Гродно, 28-29 июня 2007. - С. 259-261.

Поступила 18.02.2009 г.

Принята в печать 02.03.2009 г.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ЭРАДИКАЦИОННОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЭРОЗИВНО-ЯЗВЕННЫХ ПОРАЖЕНИЯХ ЖЕЛУДКА, ВЫЗВАННЫХ ВЕЩЕСТВАМИ РАЗЪЕДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ

КОНАХОВИЧ И.И.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Резюме. Обследовано в динамике 49 пациентов с острыми отравлениями веществами разъедающего действия (ООВРД). Выделены 3 группы пациентов: больные с наличием инфекции, в схему лечения которых включалась антисекреторная терапия либо эрадикационная терапия и больные с отсутствием инфекции *H. pylori*, в схему лечения которых включалась антисекреторная терапия. Больным проводилась фиброгастроуденоскопия с биопсией из сохраненных участков слизистой оболочки желудка (СОЖ). Сравнение морфологических и эндоскопических изменений СОЖ осуществлялось попарно внутри группы до лечения и через $10 \pm 1,4$ суток. Проводилась оценка проявлений побочных эффектов эрадикационной терапии в соответствии с Терминологией неблагоприятных реакций ВОЗ. В результате исследования было установлено, что у *H. pylori*-негативных пациентов более быстро происходило заживление эрозий в СОЖ, достоверно ($p < 0,05$) снижалась выраженность воспаления и атрофии в верхней трети СОЖ, в сравнении с *H. pylori*-позитивными пациентами. Эрадикация *H. pylori* у больных с эрозивно-язвенным гастритом приводила к более быстрым темпам эндоскопического и морфологического заживления эрозивно-язвенных поражений СОЖ, достоверно ($p < 0,05$) снижалась выраженность атрофии в антральном отделе СОЖ, хронического воспаления и активности гастрита в верхней трети желудка. Эрадикационная терапия при ООВРД имеет хороший профиль безопасности.

Ключевые слова: острые отравления веществами разъедающего действия, *Helicobacter pylori*, эрадикационная терапия.

Abstract. 49 patients with acute poisonings by corrosive substances (APCS) were studied in dynamics. All patients were divided into 3 groups: patients with the presence of infection whose scheme of treatment included antisecretory therapy or eradication therapy and patients with the absence of *H. pylori* infection whose scheme of treatment included antisecretory therapy. The patients underwent fibrogastroduodenoscopy with biopsy from the preserved sites of gastric mucous membrane (GMM). The comparison of morphological and endoscopical changes in GMM was carried out in pairs in the group before treatment and $10 \pm 1,4$ days after it. The estimation of side effects of eradication therapy according to Terminology of adverse reactions of WHO was given. As a result of the research it was determined, that in *H. pylori*-negative patients the healing of erosions in GMM occurred more quickly, inflammation and atrophy expressiveness in the upper third of GMM, in comparison with the *H. pylori*-positive patients decreased reliably ($p < 0,05$). Eradication of *H. pylori* in patients with an erosive-ulcerous gastritis led to faster rates of endoscopic and morphological healing of erosive-ulcerous damages of GMM, the atrophy expressiveness in the antral part of GMM, as well as that of chronic inflammation and activity of gastritis in the upper third of the stomach decreased reliably ($p < 0,05$). Eradication therapy in APCS has a good profile of safety.

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет. - Конахович И.И.

Заболееваемость острыми отравлениями веществами разъедающего действия (ООВРД) не имеет тенденции к снижению. Частота встречаемости ООВРД возрастает в группе лиц трудоспособного возраста (73,4% больных), что имеет важное социальное значение [5, 7]. Одной из задач Национальной программы демографической безопасности Республики Беларусь на 2007-2010 годы является реализация мер, направленных на профилактику и сокращение травматизма, отравлений, инвалидности, снижение предотвратимой смертности, что позволит в перспективе улучшить ситуацию в Беларуси [8].

В ответ на химическую травму развивается бурная воспалительная реакция, сопровождающаяся нарушением барьерной антибактериальной функции желудка. Отторжение слизистой оболочки в пищеварительном тракте ведет к образованию эрозий, язв и нередко сопровождается кровотечением [10].

В настоящее время доказано негативное действие инфекции *Helicobacter pylori* на цитопротективные свойства слизистой оболочки желудка (СОЖ) [1, 2, 3, 12, 16]. Сами бактерии нарушить целостность СОЖ не могут, они вызывают умеренные воспалительные изменения эпителия. Повреждающее действие *H. pylori* основано на ее способности выделять ферменты (уреазы, протеазы, фосфолипазы) и бактериальные цитотоксины [15]. Повреждение полиморфно-ядерными клетками эндотелия микрососудов ведет к нарушению микроциркуляции в СОЖ [7].

В Республике Беларусь до сих пор не проведены масштабные исследования, позволяющие оценить распространенность *H. pylori*, однако в целом у населения Беларуси выявляется высокая частота инфицированности *H. pylori* [11]. Так, инфицированность *H. pylori* населения молодого и среднего возраста только Витебской области составляет около 73,4% [5]. Обсемененность данным возбудителем больных с ООВРД составляет 76,5% [9]. В 88,2% случаев химический ожог желудка возникает на фоне хронического повреждения СОЖ инфекцией *H. pylori* [9]. У пациентов с ООВРД, злоупотребляющих алкоголем, инфицированность *H. pylori* меньше (39% случаев),

чем у больных, не злоупотребляющих алкоголем (84,4% случаев), что связано с атрофическими изменениями СОЖ при систематическом воздействии этанола, что также подтверждается данными литературы [18]. В связи со всем вышесказанным целесообразно включение эрадикационной терапии в схему лечения больных с ООВРД.

Устранение геликобактерной инфекции приводит к уменьшению воспалительных и моноклеарных клеток, которые являются основными признаками активности и выраженности гастрита, способствует обратному развитию атрофических изменений СОЖ и кишечной метаплазии, что также подтверждено отдельными исследованиями, в том числе и рандомизированными [7, 21, 22]. Динамическое наблюдение за больными с эрозиями или язвой желудка демонстрирует эффективность успешной антигеликобактерной терапии: проявление более частого и быстрого заживления эрозивно-язвенных повреждений СОЖ [7]. Проведение эрадикации инфицированным *H. pylori* пациентам позволяет предупредить развитие отдаленных последствий обсемененности данной инфекцией: кишечная метаплазия, дисплазия слизистой оболочки желудка, MALT-лимфома, рак желудка [13].

По данным рандомизированного двойного-слепого контролируемого исследования, проведенного В.А. Исаковым [и др.], нежелательные явления во время использования тройной схемы эрадикации *H. pylori* при эрозивно-язвенных поражениях гастродуоденальной зоны наблюдались у 31,3% пациентов, из них лишь 4,8% прекратили прием лекарственных средств из-за побочных эффектов. Такими побочными эффектами чаще всего являлись нарушение вкуса, диарея, головная боль, тошнота, кожный зуд, метеоризм. Процент отмены терапии вследствие нежелательных явлений не превышал порогового значения 5% [6].

Целью исследования было оценить репаративную способность слизистой оболочки желудка при эрозивно-язвенных поражениях, вызванных веществами разъедающего действия, в зависимости от фармакотерапии, изучить профиль безопасности эрадикационной терапии у пациентов с ООВРД.

Методы

Обследовано в динамике 49 пациентов (13 женщин и 36 мужчин) с ООВРД, проходивших лечение в отделении острых отравлений УЗ «Витебская областная клиническая больница», средний возраст составил $51 \pm 2,8$ лет. Этиологическими факторами являлись: кислоты – у 24 пациентов, щелочи – у 10, неизвестные ВРД – у 11, окислители – у 4. В исследуемой группе каждый второй больной страдал хроническим алкоголизмом.

Всем больным проводилось общепринятое клиническое обследование, включающее фиброгастродуоденоскопию (ФГДС) с биопсией из сохраненных участков СОЖ по схеме: передняя стенка антрального отдела желудка, задняя стенка антрального отдела желудка, передняя стенка верхней трети желудка, задняя стенка верхней трети желудка с последующим гистологическим исследованием [1]. Морфологические изменения СОЖ оценивались в соответствии с критериями Хьюстонской модификации Сиднейской системы. Все показатели оценивались в баллах (0, 1, 2, 3), и проводился анализ количественных значений выраженности признака [12]. Сравнение морфологических признаков осуществлялось попарно внутри группы до лечения и через $10 \pm 1,4$ суток, считая выборки связанными. Статистическая обработка результатов осуществлялась в программном пакете Microsoft Excel 2003, достоверность различия ($p < 0,05$) средних величин сравниваемых показателей оценивалась по критерию Стьюдента.

Все пациенты с эрозивно-язвенным гастритом, вызванным ООВРД, были разделены на 3 группы: первая – больные с наличием инфекции *H. pylori*, в схему лечения которых включалась антисекреторная терапия (блокатор H_2 -гистаминовых рецепторов (фамотидин) или ингибитор протонной помпы (омепразол); вторая – больные с отсутствием инфекции *H. pylori*, в схему лечения которых включалась антисекреторная терапия, третья – пациенты с наличием инфекции *H. pylori*, в схему лечения которых включалась эрадикационная терапия.

Согласно рекомендациям Маастрихтского консенсуса III 2005 г., при подтверждении

наличия *H. pylori* показана ее эрадикация. Эрадикационная терапия основывалась на рекомендациях Маастрихтского консенсуса III [20]. У пациентов в течение 10-14 дней использовали схему тройной терапии, включавшую ингибитор протонной помпы (омепразол), кларитромицин и амоксициллин (или метронидазол). В соответствии с Терминологией неблагоприятных реакций ВОЗ проводилась оценка побочных эффектов эрадикационной терапии со стороны различных органов и систем на основании жалоб пациентов, результатов общеклинического обследования (общий анализ крови, биохимический анализ крови, общий анализ мочи, электрокардиограмма, ультразвуковое исследование органов брюшной полости и почек) [17].

Сроки заживления данных поражений СОЖ больных с ООВРД оценивались в соответствии с эндоскопическими критериями поражения СОЖ по A. Euler (1989, 1990) (таблица 1). Критерием эндоскопического заживления эрозивно-язвенного поражения СОЖ было принято отсутствие эрозий и язв в СОЖ, т.е. их полная эпителизация, наличие катаральных явлений СОЖ либо восстановление СОЖ до нормальной.

Результаты и обсуждение

В группе *H. pylori*-позитивных больных с эрозивно-язвенным гастритом до лечения, включавшего антисекреторную терапию, в антральном отделе СОЖ наблюдался хронический гастрит у 70,4% пациентов, поверхностный гастрит – у 14,3 %, острые эрозии – у 14,3%. В динамике после проведенного лечения в антральном отделе СОЖ отмечался хронический гастрит в 88,4% случаев, наблюдалось заживление эрозий, последние сохранялись у 7,7% пациентов, поверхностный гастрит слабой активности на месте заживших эрозий выявляли у 3,9% пациентов. В СОЖ антрального отдела (таблица 2) после лечения отмечались умеренное хроническое воспаление, слабая активность воспаления и атрофию, показатели которых в динамике несколько снижались. Сохранялись слабо выраженные кишечная метаплазия и реактивность лимфоид-

Таблица 1

Эндоскопические критерии поражения СОЖ по А. Euler (1989)

Повреждение	Выраженность	Количество баллов
Эритема	Отсутствие	0
	Легкая	1
	Умеренная/сильная	2
Геморрагии	Отсутствие	0
	Одна	1
	2-5	2
	6-20	3
	более 20	4
Эрозии	Отсутствие	0
	Одна	2
	2-5	4
	6-20	6
	более 20	8
Язвы	Отсутствие	0
	Каждая язва менее 3 мм	4
	Каждая язва более 3 мм	10
	Наличие видимого сосуда в кратере язвы	13

ных фолликулов. Данные морфологические изменения не являлись статистически значимыми ($p > 0,05$). В верхней трети СОЖ у данной группы пациентов до лечения наблюдался хронический гастрит у 55,6% больных, поверхностный гастрит – у 33,3 %, острые эрозии – у 11,1%. После проведенного лечения в верхней трети СОЖ отмечался хронический гастрит в 40% случаев, поверхностный гастрит – в 45%, острые эрозии имели место у 15% больных. После проведенного лечения в верхней трети СОЖ (таблица 2) наблюдались умеренное хроническое воспаление, слабые активность воспаления и атрофия, степень выраженности которых в динамике несколько снижалась. Лимфоидные фолликулы были выражены слабо, кишечная метаплазия не выявлялась. Однако данные морфологические изменения не являлись статистически достоверными ($p > 0,05$). В СОЖ до лечения, включавшего антисекреторную терапию, отмечали слабую плотность колонизации *H. pylori* в 53% случаев, умеренную и выраженную – в 23,5 % случаев соответственно. После проведенного лечения в 21,4% случаев инфекцию не выявляли, у 35,7% пациентов наблюдали слабую обсемененность, у 14,3% – умеренную, у 28,6% – выраженную.

В группе неинфицированных *H. pylori* пациентов с эрозивно-язвенным гастритом, до начала лечения, включавшего антисекреторную терапию, в антральном отделе СОЖ наблюдали хронический гастрит у 57,1% больных, острые эрозии – у 42,9 %. После терапии в антральном отделе СОЖ отмечали заживление эрозий, на месте которых выявляли поверхностный гастрит, при этом эрозии сохранялись у 5,9% пациентов, хронический гастрит наблюдали у 70,6% больных. В СОЖ антрального отдела (таблица 2) после лечения наблюдали умеренное хроническое воспаление, слабую атрофию и кишечную метаплазию, степень выраженности которых в динамике снижалась, сохранялись слабые реактивность лимфоидных фолликулов и кишечная метаплазия. Данные морфологические изменения СОЖ не являлись статистически достоверными ($p > 0,05$). В верхней трети СОЖ у данной группы пациентов до начала терапии наблюдали хронический гастрит у 66,7% пациентов, поверхностные эрозии – у 33,3%. После проведенного лечения в слизистой оболочке верхней трети желудка наблюдали заживление эрозий, на месте которых выявляли признаки поверхностного гастрита слабой активности (37,5% случаев), эрозии сохраня-

Таблица 2

**Морфологические изменения (в баллах, $M \pm \sigma$) при эрозивно-язвенном гастрите
у *H. pylori*-позитивных и *H. pylori*-негативных больных
на фоне применения антисекреторной терапии**

признак	Наличие <i>H. pylori</i>				Отсутствие <i>H. pylori</i>			
	антральный отдел		верхняя треть желудка		антральный отдел		верхняя треть желудка	
	до лечения (n=17)	после лечения (n=13)	до лечения (n=17)	после лечения (n=13)	до лечения (n=4)	после лечения (n=9)	до лечения (n=4)	после лечения (n=9)
Атрофия	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,8 ± 0,3	0,7 ± 0,2
<i>p</i>	0,7		0,06		0,01		0,01	
Воспаление	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,2
<i>p</i>	0,5		0,5		0,3		0,01	
Активность	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,4	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,5	0,6 ± 0,1
<i>p</i>	0,3		0,5		0,3		0,1	
Лимфоидные фолликулы	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0	0,4 ± 0,2	0,8 ± 0,5	0,1 ± 0,1
<i>p</i>	0,3		0,4		0,1		0,3	
Кишечная метаплазия	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0	0,7 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0,7 ± 0,4	0,1 ± 0,1
<i>p</i>								

лись лишь у одного пациента (6,7%), хронический гастрит отмечали у 56,3% пациентов. В динамике в верхней трети СОЖ (таблица 2) уменьшились до слабо выраженных хроническое воспаление ($p < 0,05$), атрофия ($p < 0,05$), снизилась до слабо выраженной активность воспаления ($p > 0,05$). После лечения отмечали слабо выраженные лимфоидные фолликулы и кишечную метаплазию, показатели которых в динамике несколько снижались ($p > 0,05$).

При сравнении исходных морфологических данных *H. pylori*-позитивных и *H. pylori*-негативных больных с эрозивно-язвенным гастритом до лечения выявили, что во второй группе пациентов атрофия в верхней трети желудка была больше ($p < 0,05$), других статистически значимых отличий не выявили. На фоне применения антисекреторной терапии лекарственными средствами различных групп (ингибиторов протонной помпы и H_2 -блокаторов гистаминовых рецепторов) у *H. pylori*-негативных больных эпителизация эрозий происходила более интенсивно.

Исходные морфологические данные двух *H. pylori*-позитивных групп пациентов с

эрозивно-язвенным гастритом (первая и третья группы) достоверно не отличались между собой ($p > 0,05$) (таблица 3).

В группе *H. pylori*-позитивных больных с эрозивно-язвенным гастритом, получавших эрадикационную терапию, до лечения в антральном отделе наблюдался хронический гастрит у 60% больных, острые эрозии имели место в 40 % случаев. После проведенной эрадикации в антральном отделе отмечалась эпителизация эрозий, на месте которых выявляли поверхностный гастрит слабой активности (17,6% пациентов), хронический гастрит наблюдали у 76,5% больных, эрозии сохранялись у одного пациента (7,7%). В СОЖ антрального отдела (таблица 4) после лечения наблюдалась слабая атрофия, показатели которой в динамике снижались ($p < 0,05$); отмечались умеренное воспаление, слабые активность гастрита, реактивность лимфоидных фолликулов, кишечная метаплазия, степень выраженности которых на фоне лечения снижалась ($p > 0,05$). В верхней трети СОЖ до лечения у половины пациентов данной группы отмечался хронический гастрит, поверхностный гастрит – в 25% случаев, эрозии об-

Таблица 3

Исходные морфологические данные (в баллах, $M \pm \sigma$) у пациентов с эрозивно-язвенным гастритом, вызванным ООВРД

признак	до лечения			
	антральный отдел		верхняя треть	
	антисекреторная терапия (n=17)	эрадикационная терапия (n=7)	антисекреторная терапия (n=17)	эрадикационная терапия (n=7)
Атрофия	$1,2 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,4$
<i>p</i>	0,7		0,06	
Воспаление	$1,6 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$
<i>p</i>	0,9		0,2	
Активность	$1,3 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$
<i>p</i>	0,9		0,3	
Лимфоидные фолликулы	$0,1 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,1$	0
<i>p</i>	0,3		0,3	
Кишечная метаплазия	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,3$
<i>p</i>	0,7		0,2	

наруживались у каждого четвертого. После лечения в верхней трети СОЖ у данной группы пациентов наблюдалось полное заживление эрозий, на месте которых в 41,2% случаев выявлялся поверхностный гастрит слабой активности, хронический гастрит имел место у 58,8% пациентов. В верхней трети СОЖ (таблица 4) в динамике хроническое воспаление уменьшалось до слабого ($p < 0,05$), слабо выраженная активность воспаления также несколько снижалась ($p < 0,05$). После лечения наблюдалась слабая атрофия и кишечная метаплазия, показатели которых в динамике несколько уменьшались ($p > 0,05$), выявлялись слабо выраженные лимфоидные фолликулы ($p > 0,05$). В СОЖ до лечения слабая колонизация *H. pylori* отмечалась у 71,4% пациентов, умеренная – у 28,6%. После проведения эрадикации у 92,3% инфекция не выявлялась, у 7,7% пациентов сохранялась слабая обсемененность *H. pylori*.

При сравнении морфологических данных групп после проведения антисекреторной и эрадикационной терапии было установлено, что *H. pylori*-ассоциированная инфекция способствует хронизации процессов воспаления в СОЖ и нарушает цитопротективные ее свойства. Так, у *H. pylori*-позитивных пациентов, которым проводилась эрадикация, заживление острых эрозий происходило значительно

но быстрее, в отличие от группы сравнения. Кроме того, у *H. pylori*-позитивных пациентов после проведения эрадикации активность гастрита в антральном отделе и в верхней трети желудка были достоверно менее выраженными ($p < 0,05$), в отличие от группы больных, которым не проводилась эрадикация.

При оценке эндоскопического заживления эрозивно-язвенных поражений желудка у *H. pylori*-позитивных пациентов в зависимости от лечения было выявлено, что до лечения сравниваемые между собой группы *H. pylori*-позитивных больных с эрозивно-язвенными поражениями желудка (на фоне антисекреторной терапии и при включении эрадикации *H. pylori*) не имели достоверных отличий по степени повреждения СОЖ ($p > 0,05$) (таблица 5). У *H. pylori*-позитивных пациентов заживление эрозивно-язвенных повреждений желудка, вызванных воздействием веществ разъедающего действия, наиболее быстро происходило на фоне включения в схему лечения эрадикационной терапии, что свидетельствовало о негативном влиянии *H. pylori* на цитопротективные свойства СОЖ (таблица 5).

У пациентов с ООВРД на фоне применения эрадикационной терапии наблюдались нежелательные эффекты у 10 пациентов. Среди них имели место дисбиоз (кандидоз ротовой полости) наблюдался у 60% пациентов,

Таблица 4

Морфологические изменения (в баллах, $M \pm \sigma$) при эрозивно-язвенном гастрите у *H. pylori*-позитивных больных при включении в схему лечения эрадикационной терапии

признак	Эрадикационная терапия			
	антральный отдел		верхняя треть желудка	
	до лечения (n=7)	после лечения (n=12)	до лечения (n=7)	после лечения (n=12)
Атрофия	$1,3 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,1$
<i>p</i>	0,04		0,3	
Воспаление	$1,9 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$
<i>p</i>	0,2		0,04	
Активность	$1,1 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$
<i>p</i>	0,2		0,03	
Лимфоидные фолликулы	$0,3 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,1$	0	$0,2 \pm 0,2$
<i>p</i>	0,6		0,3	
Кишечная метаплазия	$0,4 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,1$
<i>p</i>	0,8		0,3	

Таблица 5

Сравнительная характеристика эндоскопических данных сроков заживления эрозивно-язвенных поражений СОЖ у *H. pylori*-позитивных пациентов в зависимости от фармакотерапии

Степень поражения СОЖ	Лечение	Эндоскопические данные				Сроки заживления СОЖ
		До лечения		После лечения		
		баллы	<i>p</i>	баллы	<i>p</i>	дни
Эрозивно-язвенное поражение желудка	Антисекреторная терапия (n=17)	3,2 ± 0,3	> 0,05	2,1 ± 0,4	> 0,05	17 ± 3,1
	Эрадикационная терапия (n=15)	3,9 ± 0,6		2,0 ± 0,6		15 ± 2,3

кандидоз пищевода – у 10%), а также головная боль и головокружение, сонливость, диспепсия – по 10% больных соответственно.

Заключение

1. *H. pylori* негативно влияет на репаративные процессы слизистой оболочки желудка при ее поражении веществами разъедающего действия. По данным морфологического исследования биоптата у *H. pylori*-негативных пациентов более быстро происходит заживление эрозий в слизистой оболочки желудка, достоверно ($p < 0,05$) снижается выраженность воспаления и атрофии в верхней трети желудка, в сравнении с *H. pylori*-позитивными пациентами.

2. Проведение эрадикации *H. pylori* больным с эрозивно-язвенным гастритом способствует ускорению темпа репарации эрозий во всех отделах слизистой оболочки желудка, достоверно ($p < 0,05$) снижает выраженность атрофии в антральном отделе СОЖ, хронического воспаления и активности гастрита в верхней трети желудка.

3. У инфицированных *H. pylori* больных при включении в схему лечения эрадикационной терапии эндоскопически наблюдаются более быстрые темпы заживления эрозивно-язвенных поражений желудка, что ведет к сокращению сроков госпитализации пациентов с ООВРД.

4. Лекарственные средства, входящие в схему эрадикации *H. pylori*, имеют хороший

профиль безопасности. Наиболее частыми побочными эффектами эрадикационной терапии у больных с ООВРД является кандидоз полости рта и пищевода, требующий включения в схему лечения противогрибковых средств.

Литература

1. Аруин, Л. И. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника / Л. И. Аруин, Л. Л. Капулер, В. А. Исаков. – Москва: Триада-Х, 1998. – С. 69-119.
2. Динамическое наблюдение за больными язвенной болезнью желудка после эрадикации / Е. Г. Бурдина [и др.] // Эффективная фармакотерапия в гастроэнтерол. – 2008. – № 1. – С. 12-15.
3. Васильев, Ю. В. Язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, осложненная кровотечением, и *Helicobacter pylori* / Ю. В. Васильев // Consilium medicum. – 2002. – № 5. – 11 с.
4. Дыбаль, А. Б. Острые отравления веществами раздражающего действия: эпидемиологические аспекты / А. Б. Дыбаль, М. М. Сачек, А. В. Коробейников // Достижения фундаментальной и клин. медицины и фармации: мат. 61 науч. сессии ун-та, Витебск, 21-22 март. 2006 г. – Витебск, 2006. – С. 449-452.
5. Инструкция по применению Эмпирической эрадикационной терапии при дуоденальных язвах: утв. м-вом здравоохранения Респ. Беларусь 20.07.05. – Минск, 2006. – 3 с.
6. Сравнительный анализ эффективности двух схем эрадикации НР на основе омепразола, кларитромицина и амоксициллина у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки: результаты рандомизированного двойного-слепого контролируемого исследования / В. А. Исаков [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2003.
7. Касьяненко, В. И. Результаты динамического наблюдения за больными язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки после эрадикации *Helicobacter pylori* / В. И. Касьяненко // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2007. – № 4. – С. 19-24.
8. Заболеваемость острыми отравлениями веществами разъедающего действия / И. И. Конахович [и др.] // Достижения фундаментальной и клин. медицины и фармации: мат. 63 сессии ун-та, Витебск, 26-27 март. 2008 г. / Витебск. гос. мед. ун-т; редкол.: В. П. Дейкало [и др.]. – Витебск, 2008. – С. 21-23.
9. Острые отравления веществами разъедающего действия и *Helicobacter pylori*-ассоциированная инфекция / И. И. Конахович [и др.] // Тезисы докладов VII съезда анестезиол.-реаниматол. / Бел. общ-во анестезиол.-реаниматол., Бел. мед. акад. последиплом. образования. – Минск, 2008. – Вып. VI: Новые технологии в анестезиологии и интенсивной терапии. – С. 90-91.
10. Лужников, Е. А. Острые отравления: руководство для врачей / Е. А. Лужников, Л. Г. Костомарова. – Москва: Медицина, 2000. – 308 с.
11. Макаренко, Е. В. Диагностика и лечение *Helicobacter pylori*: достижения и проблемы / Е. В. Макаренко, С. И. Пиманов, Р. Х. Аль-Бадани // Медицинская панорама. – 2003. – Т. 27, № 2. – С. 68-70.
12. Влияние эрадикации *Helicobacter pylori* на морфологические изменения слизистой оболочки желудка / С. И. Пиманов [и др.] // Архив патологии. – 2006. – Т. 68, № 5. – С. 22-27.
13. Пиманов, С. И. Что происходит после эрадикации *Helicobacter pylori*: ожидаемые, доказанные и спорные эффекты / С. И. Пиманов, Е. В. Макаренко, Ю. И. Королева // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2007. – Т. 17, № 1. – С. 48-55.
14. Об утверждении Национальной программы демографической безопасности Республики Беларусь на 2006 - 2010 годы: Постановление Совета Министров Республики Беларусь от 22 сентября 2005 г., №1049. – Пер. № 5/16544.
15. Сукало, А. В. Современная антихеликобактерная терапия у детей и подростков / А. В. Сукало, И. Э. Бовбель, В. Ю. Малюгин // Медицинская панорама. – 2007. – Т. 7, № 2. – С. 82-85.
16. Jang, T. J. Proliferation and apoptosis in gastric antral epithelial cells of patients infected with *Helicobacter pylori* / T. J. Jang, J. R. Kim // J. Gastroenterol. – 2000. – Vol. 35, № 4. – P. 265-271.
17. International Monitoring of Adverse Reactions to Drugs: WHO Adverse Reaction Terminology. – Philadelphia: UPPSALA MONITORING CENTRE, 1999. – 2045 p.
18. Kuepper-Nybelen, J. Relationship between lifetime alcohol consumption and *Helicobacter pylori* infection / J. Kuepper-Nybelen, D. Rothenbacher, H. Brenner // Ann. Epidemiol. – 2005. – N 15 (8). – P. 607-13.
19. Malfertheiner, P. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht 2 – 2000 consensus report / P. Malfertheiner, F. Megraud, C. O'Morain [et al.] // Aliment. Pharmacol. Ther. – 2002. – N 16. – P. 167-180.
20. Malfertheiner, P. The Maastricht 3 Consensus Report: Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection / P. Malfertheiner, F. Megraud, C. O'Morain // [Electronic resource]. – Eur. Gastroenterol. Rev. – 2005. – Vol. 59, N 62. – P. 1-4. – Mode of access: <http://www.helicobacter.org/download/>. – Date of access: 12.03.2008.
21. Satoh, K. Does eradication of *Helicobacter pylori* reverse atrophic gastritis or intestinal metaplasia? Data from Japan / K. Satoh // Gastroenterol. Clin. North. Am. – 2000. – Vol. 29. – P. 829-835.
22. Walker, M. M. Is intestinal metaplasia of the stomach reversible? / M. M. Walker // Gut. – 2003. – Vol. 16. – P. 198-203.

Поступила 01.12.2008 г.

Принята в печать 02.03.2009 г.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦВЕТКОВ ДЕВЯСИЛА ВЫСОКОГО

ДЕРГАЧЁВА Ж.М., ГУРИНА Н.С.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Резюме. Одним из распространенных растений европейской флоры является девясил высокий (*Inula helenium*) сем. Сложноцветные (*Asteraceae*), официальным лекарственным растительным сырьем (ЛРС) которого являются корневища и корни. В статье представлены результаты качественного анализа нового вида ЛРС – цветков девясила высокого. Для цветков девясила высокого разработаны критерии подлинности, включающие качественные реакции на флавоноиды и тонкослойную хроматографию (ТСХ). Проведен анализ хлороформной, эфирной, этилацетатной фракций извлечения из цветков девясила высокого методом бумажной хроматографии в системе 15% уксусная кислота. Обнаружено, что во всех исследованных фракциях цветков девясила высокого содержится кверцетин. Проведено изучение флавоноидного состава цветков методом ТСХ на пластинках со слоем силикагеля в системах: А. толуол – этилацетат – уксусная кислота (36:12:5), Б. этилацетат – муравьиная кислота – уксусная кислота – вода (100:11:11:26); а также на целлюлозных пластинках методом двумерной хроматографии в системе растворителей: первое направление – н-бутанол – кислота уксусная – вода (6:8:3); второе направление – 15%-ная уксусная кислота.

Ключевые слова: *девясил высокий, хроматографическое исследование.*

Abstract. One of the widespread plants of the European flora is *Inula helenium* (fam. *Compositae*), medicinal vegetative raw materials of which are rhizomes and roots. The results of the qualitative analysis of a new kind of medicinal vegetative raw materials – of *Inula helenium* flowers are presented in this article. The criteria of authenticity for *Inula helenium* flowers including qualitative reactions to flavonoids and thin-layer chromatography (TLC) have been developed. The analysis of chloroformic, etheric, ethyl acetate fractions of extraction from *Inula helenium* flowers has been carried out by the method of paper chromatography in the system of 15% acetic acid. Quercetine has been found to be present in all investigated fractions of *Inula helenium* flowers. The flavonoids composition of *Inula helenium* flowers has been investigated by TLC method on plates with a layer of silicagel in the systems: A. toluene – ethyl acetate – acetic acid (36:12:5), B. ethyl acetate – formic acid – acetic acid – water (100:11:11:26); and also on cellulose plates by the method of two-dimensional chromatography (2D-TLC) in the system of solvents: the first direction – n-butanol – acetic acid – water (6:8:3); the second direction – 15% acetic acid.

С каждым годом растёт интерес современной медицины к лекарственным растениям. Расширяется и углубляется изучение целебных растений, растёт их заготовка, всё больше выпускается лекарственных средств растительного происхождения [1, 2].

В настоящее время изучение лекарственных растений невозможно представить без хроматографических методов анализа [3, 4].

В анализе биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения

наибольшее распространение получили методы хроматографии на бумаге, в тонких слоях сорбента и газожидкостная хроматография.

Из перечисленных хроматографических методов первым получил официальное признание в фармацевтическом анализе метод хроматографии на бумаге. Однако бумажная хроматография (БХ) имеет ряд существенных недостатков (большая затрата времени – от 5 до 36 ч, малая разделяющая способность и др.) и поэтому в настоящее время используется сравнительно редко.

Недостатки метода хроматографии на бумаге, отмеченные выше, легко устранимы при использовании метода хроматографии в

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, каф. фармакогнозии и ботаники. - Дергачёва Ж.М.

тонких слоях сорбента. Преимуществами данного метода перед БХ является не только быстрота, но и более четкое разделение (меньшее расширение пятен), открытие пятен путем обработки хроматограмм агрессивными проявителями при повышенных температурах [5].

Хроматографические методы анализа используются как для обнаружения и идентификации, так и для количественного определения БАВ растительного происхождения [6, 7].

Одним из распространенных растений европейской флоры, требующих тщательного изучения, является девясил высокий (*Inula helenium*) сем. Сложноцветные (*Asteraceae*), широко применяемый как в научной, так и в народной медицине.

Девясил высокий – многолетнее травянистое растение, высотой до 250 см, с толстым, коротким, многоглавым корневищем, от которого отходят довольно длинные (до 50 см), немногочисленные придаточные корни. Стебель (один или несколько) прямостоячий, бороздчатый, опушенный короткими, густыми, белыми волосками, в верхней части коротковетвистый. Листья очередные крупные, сверху жестко-волосистые, снизу мягкие, серо-войлочные, по краям неравнозубчатые. Прикорневые листья продолговато-эллиптические, крупные – до 50 см длиной и 25 см шириной, с суженным в длинный черешок основанием. Стеблевые листья продолговато-яйцевидные, полустеблеобъемляющие, с сердцевидным основанием, нижние на черешках, верхние сидячие. Цветки собраны в соцветия – корзинки до 8 см в диаметре. На верхушке главного стебля и ветвей корзинки образуют рыхлые кисти или щитки. Цветки золотисто-желтые, с грязно-белым хохолком волосков. Обертка полушаровидная из многочисленных черепитчато-расположенных листочков. Плод – четырехгранная, бурая, гладкая семянка, 4-5 мм длиной, с хохолком из одного ряда буровато-белых зазубренных волосков, превышающих в два раза длину плода. Цветет девясил высокий в июле-августе, плоды созревают в августе-сентябре [8, 9].

В медицинской практике применяют корневища и корни девясила высокого (*rhizomata et radices Inulae helenii*). Цветки девя-

сила высокого содержат различные действующие вещества, благодаря чему они нашли свое широкое применение в народной медицине. Чай из цветков пьют от удушья, истощения. Имеются литературные данные о том, что водно-спиртовые вытяжки из листьев и из цветочных корзинок с семенами обладают противовирусной активностью, угнетают рост золотистого стафилококка и мицелиевых грибов. Перспективно применение цветков девясила высокого при сахарном диабете [10, 11].

Однако цветки девясила высокого не являются официальным ЛРС, хотя его сырьевые ресурсы в Беларуси достаточны и доступны: девясил высокий возделывается плантационно ради заготовки корневищ и корней. При этом сбор соцветий не ведет к угнетению растений, а, наоборот, стимулирует рост вегетативной массы растения. Поэтому актуальным является разработка нормативной документации на новый вид ЛРС – цветки девясила высокого.

Целью данной работы было хроматографическое исследование цветков девясила высокого.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) предварительный анализ основных групп БАВ цветков девясила высокого с использованием качественных реакций;
- 2) качественный анализ БАВ цветков девясила высокого:
 - а) методом бумажной хроматографии;
 - б) методом тонкослойной хроматографии.

Методы

Объектами исследования служили цветки девясила высокого, которые были заготовлены на учебно-полевом участке в п. Улановичи (окрестности г. Витебска) в июле – августе 2008 г.

Фитохимический анализ проводился по общепринятым методикам с использованием качественных химических реакций, бумажной и тонкослойной хроматографии [12].

Для хроматографического анализа 1,0 г цветков девясила высокого, измельченных до размера частиц, проходящих сквозь сито с ди-

аметром 2 мм, экстрагировали 20 мл метанола на горячей водяной бане в течение 1,5 часов. Полученный экстракт фильтровали (экстракт А). 10,0 г цветков девясила высокого (2 мм) экстрагировали 100 мл метанола при 60 °С под воздействием ультразвука в течение 20 мин. Полученный экстракт фильтровали (экстракт В1). К оставшемуся сырью добавили 100 мл метанола и экстрагировали при тех же условиях, что и экстракт В1. Полученный экстракт фильтровали (экстракт В2). К этому же сырью добавили 55 мл 50% метанола и провели экстракцию при вышеописанных условиях (экстракт В3).

Полученные экстракты исследовали методом бумажной хроматографии в системе 15% уксусная кислота. Хроматограммы просматривали в УФ-свете до и после проявления. Хроматограммы проявляли следующими реагентами: 0,5% метанольным NEU-реагентом (β -aminodiethylester of diphenylboric

acid); 1% метанольным $AlCl_3$; смесью сульфаниловой кислоты, нитрита натрия и 20% раствора карбоната натрия [13].

Экстракты А, В1, В2, В3 объединяли и выпаривали на ротаторном аппарате до полного отсутствия запаха метанола. Полученный остаток переносили в мерный цилиндр и доводили водой до 100 мл. Эти 100 мл последовательно обрабатывали хлороформом, диэтиловым эфиром и этилацетатом в делительной воронке. Из полученных фракций удаляли под вакуумом растворители, сухие остатки растворяли в метаноле и использовали для анализа фенольных соединений.

Полученные фракции исследовали хроматографическими методами в тонком слое сорбента и на бумаге в различных системах растворителей.

В системе 15% уксусная кислота исследование проводили методом бумажной хроматографии, хроматограмму проявляли NEU-

Таблица

**Последовательность пятен на бумажной хроматограмме
после обработки NEU-реагентом**

Эталонные растворы	Линия старта			
	Испытуемые растворы			
	Хлороформная фракция	Эфирная фракция	Этилацетатная фракция	Водная фракция
Кверцетин: желтое пятно ($R_f=0,03$)	Желтое пятно ($R_f=0,02-0,04$)	Желтое пятно ($R_f=0,02-0,04$)	Желтое пятно ($R_f=0,02-0,04$)	Желтое пятно ($R_f=0,02-0,04$)
	Насыщенное желтое пятно ($R_f=0,15-0,17$)	Насыщенное желтое пятно ($R_f=0,15-0,17$)	Темное фиолетовое пятно ($R_f=0,04-0,06$) Оранжевое пятно ($R_f=0,15-0,17$)	Оранжевое пятно ($R_f=0,15-0,17$)
		Оранжево-желтое пятно ($R_f=0,34-0,36$) Лимонно-желтое пятно ($R_f=0,48-0,52$)	Оранжево-желтое пятно ($R_f=0,34-0,36$) Лимонно-желтое пятно ($R_f=0,48-0,52$)	Оранжево-желтое пятно ($R_f=0,34-0,36$) Лимонно-желтое пятно ($R_f=0,48-0,52$)
	Фиолетовое пятно ($R_f=0,66-0,69$)	Голубое пятно ($R_f=0,86-0,89$)	Голубое пятно ($R_f=0,86-0,89$)	Голубое пятно ($R_f=0,75-0,77$) Коричневое пятно ($R_f=0,87-0,89$)

реагентом, просматривали в УФ-свете до и после проявления. Полученные результаты приведены в таблице.

Хроматографическое исследование химического состава цветков девясила высокого в тонком слое сорбента проводили с использованием пластинок «*Silica gel 60*» фирмы «*Merck*» восходящим способом в системах растворителей:

А. толуол – этилацетат – уксусная кислота (36:12:5).

Б. этилацетат – муравьиная кислота – уксусная кислота – вода (100:11:11:26).

Испытуемый раствор получали следующим образом. В коническую колбу вместимостью 50 мл помещали 1,00 г измельченного сырья (2 мм), прибавляли 20 мл спирта (96%, об/об) и нагревали на водяной бане с обратным холодильником 30 мин. Охлаждали и фильтровали через бумажный фильтр. Для приготовления раствора сравнения около 0,025 г (точная навеска) кверцетина помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и растворяли в спирте (96%, об/об), доводили объем раствора этим же растворителем до метки, перемешивали. Наносимый объем пробы: 30 мкл испытуемого раствора в виде полосы длиной 2 см и 5 мкл раствора сравнения в виде точки. Фронт подвижной фазы составлял не менее 15 см от линии старта. Высушивание проводили в течение 10 мин при 100-105°C, затем охлаждали на воздухе. Хроматограммы проявляли с помощью 2% раствора алюминия хлорида в спирте (96%, об/об). Просматривали в ультрафиолетовом свете при 365 нм.

Описанные условия являлись одинаковыми для двух испытуемых систем растворителей А и Б (см. выше).

Спектр фенольных соединений изучали методом двумерной хроматографии на целлюлозных пластинках фирмы «*Merck*» в системе растворителей: первое направление – н-бутанол – кислота уксусная – вода (6:8:3); второе направление – 15%-ная уксусная кислота. Детектирование фенольных соединений проводили в УФ-свете до и после проявления хроматограмм 2% спиртовым раствором алюминия хлорида.

Во всех случаях идентификацию веществ проводили по свечению в УФ-свете до и после проявления хроматограмм 2% спиртовым раствором алюминия хлорида и по величинам R_f в сравнении со стандартными веществами.

Результаты и обсуждение

На предварительном этапе нами было установлено наличие основной группы БАВ в цветках девясила высокого – флавоноидов с использованием качественных реакций. По общепринятым методикам проведены следующие качественные реакции на флавоноиды:

1) цианидиновая проба: появление розово-оранжевого окрашивания;

2) реакция с раствором едкой щелочи: появление желтого окрашивания (флавоны, флавонолы, флавононы);

3) реакция комплексообразования с хлоридом алюминия: появление лимонно-желтого окрашивания, флюоресцирующего в УФ-свете;

4) реакция осаждения раствором основного ацетата свинца: наблюдалось образование желто-оранжевого осадка.

С целью подтверждения результатов качественных реакций дальнейшую идентификацию флавоноидов проводили бумажной хроматографией восходящим способом.

При исследовании извлечений А, В1, В2, В3 методом бумажной хроматографии в системе 15% уксусная кислота установлено, что наиболее подходящим реагентом для детектирования, при котором разнообразие и количество пятен на хроматограмме наибольшее, является NEU- реагент.

Результаты исследования фракций методом бумажной хроматографии в системе 15% уксусная кислота приведены в таблице.

Из таблицы можно сделать вывод о том, что в цветках девясила высокого содержится большое разнообразие веществ фенольной природы, имеющих специфическую для флавоноидов и фенольных кислот окраску с NEU-реагентом. Идентифицирован кверцетин.

Особый интерес представляет ТСХ, которая в последнее время все более широко используется в методиках качественного анализа.

Результаты хроматографического исследования химического состава цветков девясила высокого в тонком слое сорбента с использованием пластинок «*Silica gel 60*» фирмы «*Merck*» восходящим способом в системах растворителей толуол – этилацетат – уксусная кислота (36:12:5) (далее система А) и этилацетат – муравьиная кислота – уксусная кислота – вода (100:11:11:26) (далее система Б) приведены на рисунках 1, 2.

На хроматограмме раствора свидетеля обнаруживается зона адсорбции кверцетина желтого цвета (4) с R_f от 0,32 до 0,34. На хроматограмме спиртового извлечения из цветков девясила высокого обнаруживается зона фиолетового цвета (1) с R_f от 0,37 до 0,39, зона желтого цвета (2) с R_f (относительно кверцетина) от 0,32 до 0,34, зона желто-коричневого цвета (3) с R_f от 0,29 до 0,31. Таким образом, основываясь на сопоставлении значений R_f и окраске зон адсорбции раствора свидетеля и извлечения из цветков девясила высокого, в цветках девясила высокого идентифицирован кверцетин.

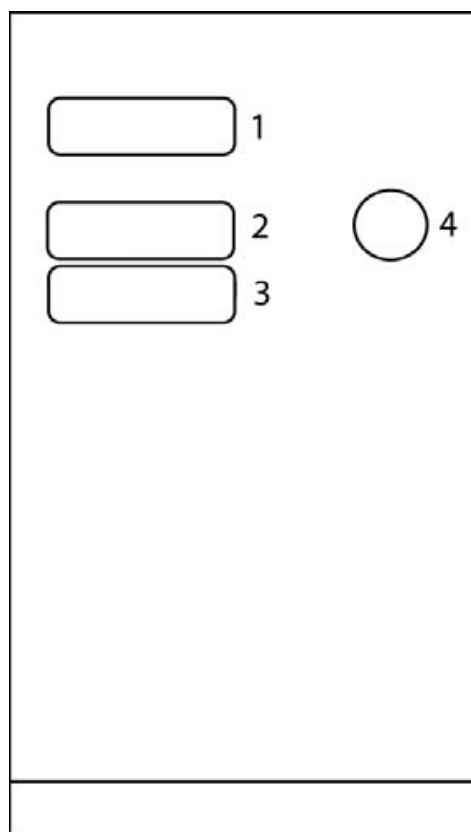


Рис. 1. Хроматограмма для извлечения из цветков девясила высокого в системе А.

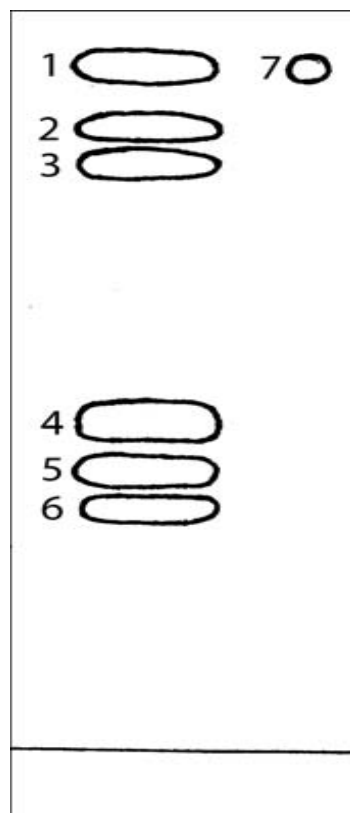


Рис. 2. Хроматограмма для извлечения из цветков девясила высокого в системе Б.

На хроматограмме идентифицирована следующая последовательность зон адсорбции: 1 – зона адсорбции желтого цвета ($R_f \sim 0,37-0,39$); 2 – зона адсорбции фиолетового цвета ($R_f \sim 0,32-0,34$); 3 – зона адсорбции голубого цвета ($R_f \sim 0,29-0,31$); 4 – зона адсорбции желтого цвета ($R_f \sim 0,32-0,34$), 5 – зона адсорбции желтого цвета ($R_f \sim 0,32-0,34$), 6 – зона адсорбции фиолетового цвета ($R_f \sim 0,32-0,34$); 7 – зона адсорбции ГСО кверцетина ($R_f \sim 0,32-0,34$) желтого цвета. Таким образом, полученные данные, подтвердили наличие кверцетина в цветках девясила высокого.

Схематический вид двумерной хроматограммы приведен на рисунке 3.

Первое направление: н-бутанол – кислота уксусная – вода (6:8:3) (R_{f1}); второе направление: 15%-ная уксусная кислота (R_{f2}).

На двумерной хроматограмме после обработки 2% раствором алюминия хлорида обнаружены зоны адсорбции: 1 – зона адсорбции желто-салатового цвета ($R_{f1} \sim 0,18-0,22$); 2 – зона адсорбции желто-салатового цвета ($R_{f1} \sim 0,4-0,5$); 3 – зона адсорбции желтого

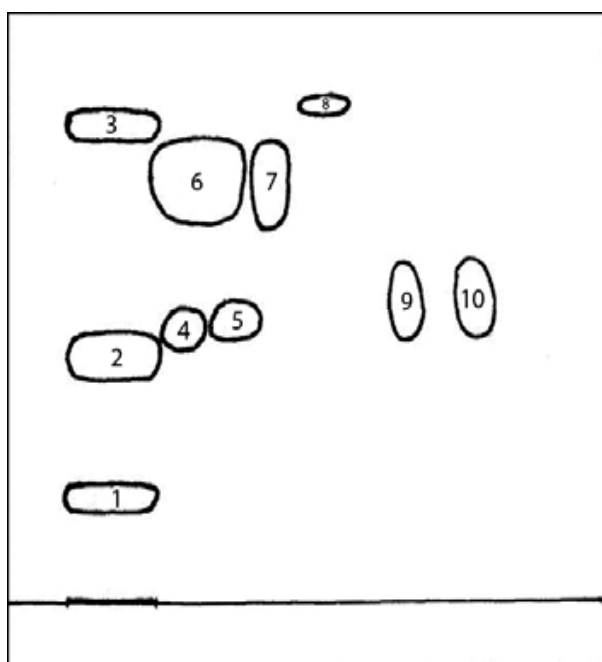


Рис. 3. Двумерная хроматограмма для извлечения из цветков девясила высокого.

цвета ($Rf_1 \sim 0,65-0,8$); 4 – зона адсорбции желтого цвета ($Rf_2 \sim 0,15-0,25$); 5 – зона адсорбции желтого цвета ($Rf_2 \sim 0,2-0,4$); 6 – зона адсорбции голубого цвета ($Rf_2 \sim 0,2-0,3$); 7 – зона адсорбции голубого цвета ($Rf_2 \sim 0,3-0,5$); 8 – зона адсорбции фиолетового цвета ($Rf_2 \sim 0,4-0,5$); 9 – зона адсорбции голубого цвета ($Rf_2 \sim 0,55-0,7$); 10 – зона адсорбции голубого цвета ($Rf_2 \sim 0,7-0,85$).

До обработки двумерной хроматограммы 2% раствором алюминия хлорида пятна 1 и 2 имели желтую окраску, пятно 3 – коричневую, а пятна 4 и 5 не обнаруживались.

Таким образом, на полученной хроматограмме обнаружено 10 пятен, что может использоваться для качественного анализа извлечения из цветков девясила высокого. Основываясь на значениях Rf и окраске полученных пятен, можно предполагать, что вещества 1, 2, 3, 4, 5 относятся к флавоноидам, а 6, 7, 8, 9, 10 – к фенолкислотам.

Заключение

Установлено наличие основной группы БАВ в цветках девясила высокого – флавоноидов с использованием качественных химических реакций.

На основании проведенного анализа методом бумажной хроматографии можно утверждать, что во всех исследованных фракциях (хлороформная, эфирная, этилацетатная) цветков девясила высокого содержится кверцетин.

Проведены исследования по выбору оптимальных условий тонкослойного хроматографирования, позволяющие эффективно разделить основные компоненты сырья и однозначно идентифицировать одно из доминирующих БАВ – кверцетин.

Обнаружено множество неидентифицированных веществ, имеющих при обработке раствором алюминия хлорида в УФ-свете окраски, характерные для фенольных соединений (флавоноиды, фенолкислоты). Полученные результаты являются предпосылкой для дальнейшего исследования цветков девясила высокого как возможного источника БАВ и введения его в номенклатуру официальных растений.

Литература

1. Фитохимическое исследование растений флоры Сибири / Д.Л. Макарова [и др.] // Фармация. – 2008. – №3. – С. 19-22.
2. Фогт, В.П. Содержание флавоноидов в противодиабетическом экстракте / В.П. Фогт, Т.А. Степанова // Фармация. – 2007. – №4. – С. 24-25.
3. Soczewinski, E. Retention behavior of some flavonoids in 2D-TLC systems on cyano bonded polar phases / E. Soczewinski, M. A. Hawryl, A. Hawryl // Chromatographia. – 2001. – Vol. 54, № 11/12. – P. 789-793.
4. Budzianowski, J. Chromatographic and spectrophotometric analyses of the DPPH free radical scavenging activity of the fractionated extracts from *Lamium album* L., *Lamium purpureum* L. and *Viscum album* L. / J. Budzianowski, A. Budzianowski // Herba Polonica. – 2006. – Vol. 52, № 1/2. – P. 51-57.
5. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук – Новосибирск: Наука, 1990. – 333 с.
6. Vanhaelen, M. Quantitative determination of biologically active constituents in crude extracts of medicinal plants by thin-layer chromatography – densitometry / M. Vanhaelen, R. Vanhaelen // J. of Chromatography. – 1984. – 312. P. 497-503.
7. Comparison between high-performance thin-layer chromatography – densitometry and high-performance liquid chromatography for the determination of ajmaline, reserpine and rescinnamine in *Rauwolfia vomitoria* root bark /

-
- P. Duez, [et al.] // J. of Chromatography. – 1986. – 356. P. 334-340.
8. Курганская, С.А. Девясил высокий / С.А. Курганская / Биология. – 2004. – № 9. – С. 19-20.
9. Лекарственные растения. Энциклопедия / сост. И.Н. Путырский, В.Н. Прохоров. – Мн.: Книжный Дом, 2003. – С. 118-120.
10. Николайчук, Л.В. Растения-целители / Л.В. Николайчук, Е.С. Козюк. – Мн.: Ураджай, 1996. – С. 75-77.
11. Носаль, М.А. Лекарственные растения и способы их применения в народе / М.А. Носаль, И.М. Носаль. – Мн.: Полымя, 1997. – С. 82-85.
12. Коноплева, М.М. Фармакогнозия: природные биологически активные вещества: Учеб. пособие. 2-е издание, дополненное / М.М. Коноплева. – Витебск, ВГМУ, 2007. – 273 с.
13. Wagner, H., Plant drug analysis / H. Wagner, S. Bladt // Springer. – 2000. – 362 p.

*Поступила 30.10.2008 г.
Принята в печать 02.03.2009 г.*

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДИНАМИКИ РОСТА КАЛЛУСА ЛИСТОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ СИРЕНИ, КУЛЬТИВИРУЕМОГО НА МОРФОГЕННЫХ СРЕДАХ

ЛЮБАКОВСКАЯ Л.А.*, КОРОБОВ Г.Д.*, РЕШЕТНИКОВ В.Н.**

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»*,
Центральный ботанический сад НАН Беларуси **

Резюме. Оценка ростовых параметров каллуса листового происхождения сирени, сорта «М.Шолохов», при культивировании клеток на морфогенных средах в присутствии экзогенных фенольных соединений проводилась с помощью подбора адекватных регрессионных моделей. На основании анализа графического представления моделей установлено, что регрессионные модели для всех сред оказались идентичными. Достоверность различий ростовых параметров оценивали на 40 день культивирования на средах различного состава. Максимальное накопление сырой биомассы каллуса, выращенного на среде 2, было на 80% выше, чем на средах 3 и 4, и на 64% выше, чем на среде 1. На основании пошагового регрессионного анализа было установлено, что среды 3 и 4 являются идентичными и описываются одним уравнением модели. Следовательно, средой, обеспечивающей высокую пролиферативную активность каллуса, является среда 2, содержащая рутин.

Ключевые слова: сирень, динамика роста, каллус.

Abstract. The estimation of growth parameters of leaf origin callus of «M. Sholokhov» kind lilac at cells cultivation on morphogene media in the presence of exogenous phenol compounds was made with the help of adequate regression models selection. On the basis of the analysis of models graphic presentation it has been established that regressive models for all media turned out to be identical. The reliability of differences in growth parameters was estimated on the 40-th day of cultivation on the media of different composition. Maximum accumulation of raw callus biomass, grown on the medium 2 was 80% higher, than that on the media 3 and 4, and 64% higher than that on the medium 1. On the basis of step-by-step regressive analysis it has been determined that media 3 and 4 are identical and are described by one model equation. Thus, the medium, that provides high proliferative callus activity is medium 2, containing rutin.

Рациональное использование растительных ресурсов и сохранение их видового разнообразия является актуальной проблемой, которую приходится решать в интересах устойчивого развития индустриального общества. Большое значение для ресурсоведения имеет разработка методов микроклонального размножения растений с ценными хозяйственными признаками [1], а также биотех-

нологические подходы к использованию клеточных культур растений как альтернативных источников растительного сырья.

Культуры клеток являются экспериментально созданной биологической системой, в большинстве случаев гетерогенной (генетически, эпигенетически и физиологически) популяцией клеток, фенотип и генотип которой соответствуют условиям выращивания. Однако особенности функционирования данной системы пока мало изучены.

Особенностью растений является наличие веществ вторичного метаболизма, опре-

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, каф. фармакогнозии и ботаники. - Любаковская Л.А.

деляющих фармакологические свойства этих организмов и выполняющих самые разнообразные функции. Среди вторичных метаболитов значительное место занимают фенольные соединения – низкомолекулярные соединения с высокой биологической активностью [2].

Одним из фактов, влияющих на процессы роста клеточных культур растений, может быть присутствие фенольных соединений. Однако в большинстве случаев уровень их накопления в условиях *in vitro* ниже, чем в исходных тканях, что может являться следствием генетических и биохимических изменений клеток культуры ткани [3-5]. Известно также, что любое механическое повреждение способствует активации синтеза в растениях разнообразных соединений фенольной природы [6]. Следовательно, не исключено влияние вторичных метаболитов на процессы роста и морфогенеза в культурах *in vitro*. Широким спектром исследования характеризуются работы по изучению влияния различных фитогормонов на ростовые характеристики и процессы морфогенеза в культуре *in vitro*. Однако влияние вторичных метаболитов на эти процессы практически не изучено. Поскольку процессы морфогенеза тесно связаны с процессами пролиферации, роста и дифференциации в очагах органогенеза [7-9], следовательно, на молекулярном уровне морфогенез, по-видимому, сопряжен с активностью пролиферации [10, 8, 11]. Поэтому установление связи между процессами роста и морфогенеза в условиях *in vitro* и влияние на эти процессы фенольных соединений является актуальной задачей.

Цель данного исследования – изучение влияния экзогенных фенольных соединений и их предшественников на процессы роста каллуса сирени листового происхождения при культивировании на морфогенных средах.

Методы

Объект исследования – стабильная каллусная культура листового происхождения сирени (*Syringa vulgaris* (L.)), сорта «М.Шолохов», поддерживаемая в культуре Центрального ботанического сада НАН Беларуси (г. Минск) с

2001 г. на модифицированной среде Мурасиге и Скуга (МС) (половинное содержанием NH_4NO_3 , KH_2PO_4), в присутствии ростовых гормонов 2, 4- дихлорфеноксиуксусной кислоты (2, 4-Д) и 6-бензинаминопурина (БАП) [12]. При изучении ростовых параметров каллусных линий, способных к морфогенезу, использовали среды следующего состава:

Среда 1 – модифицированная МС среда, содержащая (мг /л): аскорбиновую кислоту – 50, гидролизат казеина – 500, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 185, глютамин – 500, аланин – 30, аргинин – 80, аспарагин – 250, сахароза – 30, 0,6% агар, $13,5 \mu\text{M}$ 2.4-Д и $4,4 \mu\text{M}$ БАП, pH 5,7 до автоклавирования. Среда 2 – среда того же состава, что и среда 1, с добавлением 6,1 мг/л рутина. Среда 3 – среда того же состава, что и среда 1, с добавлением 1,65 мг/л фенилаланина. Среда 4 – среда того же состава, что и среда 1, с добавлением 6,1 мг/л рутина и 1,65 мг/л фенилаланина.

Для каждого типа экспланта было взято по 10 параллелей. Продолжительность культивирования 60 суток. В качестве анализируемых промежутков взяты 10, 15, 20, 30, 40 и 60 дни, соответствующие лаг-, экспоненциальной и стационарной фазам ростового цикла.

На анализируемых участках определяли следующие ростовые параметры: масса каллуса в конце цикла выращивания (W_t), прирост сырой биомассы с учетом времени культивирования (P_t), увеличение сырой биомассы каллуса (M), индекс скорости роста (I), удельную скорость роста (μ), время удвоения биомассы (G), максимальное накопление сырой биомассы (X), экономический коэффициент (ЭК) и продуктивность по сырой биомассе (P) [12].

В качестве аналитического инструмента был использован лицензионный пакет прикладных программ Statistica 6,0 (RUS) фирмы STATSOFT-RUSSIA [13] с использованием следующих модулей: основного анализа вариационных рядов; регрессионного анализа динамических рядов; разведочного анализа путем 3-D моделирования; дискриминантного анализа с предварительной редукцией данных на основе корреляционной матрицы [14].

Результаты и обсуждение

Исходя из того, что процессы морфогенеза тесно связаны с активностью пролиферации в культуре *in vitro* [14, 12, 15], нами наряду с цитологическими изменениями, в анализируемые промежутки времени, были изучены ростовые характеристики каллуса листового происхождения сирени, сорта «М.Шолохов», культивируемого на морфогенных средах, а также влияние экзогенных фенольных соединений и их предшественников на ростовые характеристики культивируемой каллусной ткани.

Оценка особенностей динамики роста каллуса сирени проводилась с помощью подбора адекватных регрессионных моделей. В качестве инструмента моделирования было применено средство статистики – графика с ошибками, входящее в качестве модуля в ППП «STATISTICA» 6.0 RUS.

Из всех анализируемых показателей роста нами были выбран показатель максимального накопления сырой биомассы (X), значе-

ние которого является доказательством высокой пролиферативной активности листового каллуса сирени, культивируемого на различных морфогенных средах. Следовательно, значение максимального накопления сырой биомассы (X) являлось зависимой переменной. Независимой переменной служило время в сутках. Адекватность модели оценивалась с помощью F-критерия Фишера. Таким образом, было установлено, что наиболее адекватной моделью является полином 4-й степени (рисунки 1).

Адекватность описания регрессионных моделей составила:

среда: 1 X: $F(11,48) = 18,747144, p = 0,0000$;

среда: 2 X: $F(11,48) = 78,3964206, p = 0,00000$;

среда: 3 X: $F(11,48) = 21,4078474, p = 0,0000$;

среда: 4 X: $F(11,47) = 10,2708232, p = 0,000000003$,

что соответствует высокой степени статистической достоверности.

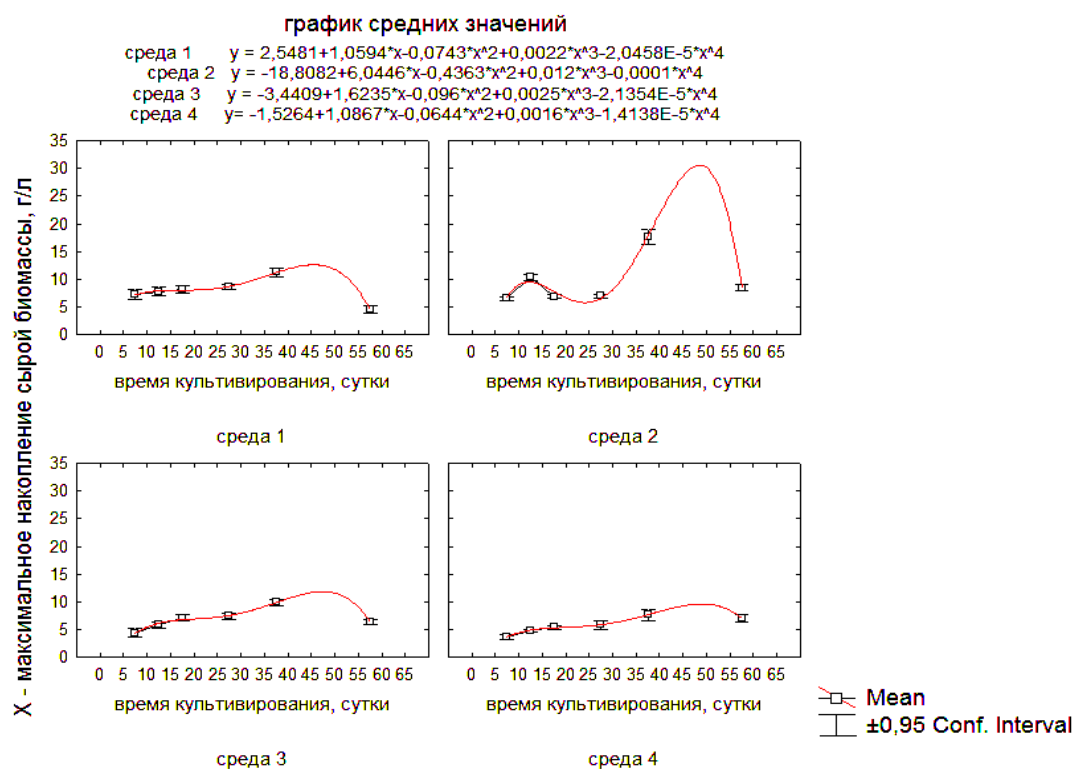


Рис. 1. Динамика максимального накопления сырой биомассы (X) каллуса листового происхождения сирени.

На основании анализа графического представления моделей было установлено, что регрессионные модели для всех сред оказались идентичными. Для всех сред было характерно наличие лаг-фазы до 30-х суток культивирования. Экспоненциальная фаза роста отмечалась с 25-30 суток до 35-40. Максимальное накопление биомассы наблюдали на 40 день культивирования. По-видимому, максимальное накопление сырой биомассы происходило за счет пролиферации, а не за счет оводненности клеток в сочетании с их растяжением, так как в этом случае каллус приобрел бы рыхлую консистенцию, а он оставался плотным.

С целью установления закономерностей роста сырой биомассы, с учетом веса исходного экспланта и установления его оптимальных значений, было проведено графическое 3-D моделирование с подбором адекватных моделей (рисунок 2).

При анализе полученных данных, были подтверждены периоды основных фаз роста

калусной культуры и определено влияние веса исходного экспланта на максимальное накопление сырой биомассы. При этом установлено, что при использовании среды 1 оптимальными для культивирования являются экспланты весом 0,2-0,3 г. Для среды 2 диапазон значений оказался несколько выше и составил 0,3-0,4 г. Для сред 3 и 4 четких зависимостей между изученными параметрами выявить не удалось.

По парное сравнение анализируемых показателей роста, полученных на разных средах, проведено с помощью t-критерия Стьюдента. Было установлено, что несмотря на казалось бы, достоверные результаты, принять их к рассмотрению по большей части следует считать некорректным. Об этом свидетельствуют ненадежные значения F-критерия Фишера. Резюмируя вышесказанное, можно утверждать, что для анализа показателей роста калусной культуры, культивируемой на разных морфогенных средах, простое использование t-критерия Стьюдента явно недостаточно.

график поверхностей (3D)
 $X = 1,9132 + 0,3369 \cdot x - 16,5896 \cdot y - 0,0058 \cdot x^2 + 0,565 \cdot x \cdot y + 115,8934 \cdot y^2$
 среда 1

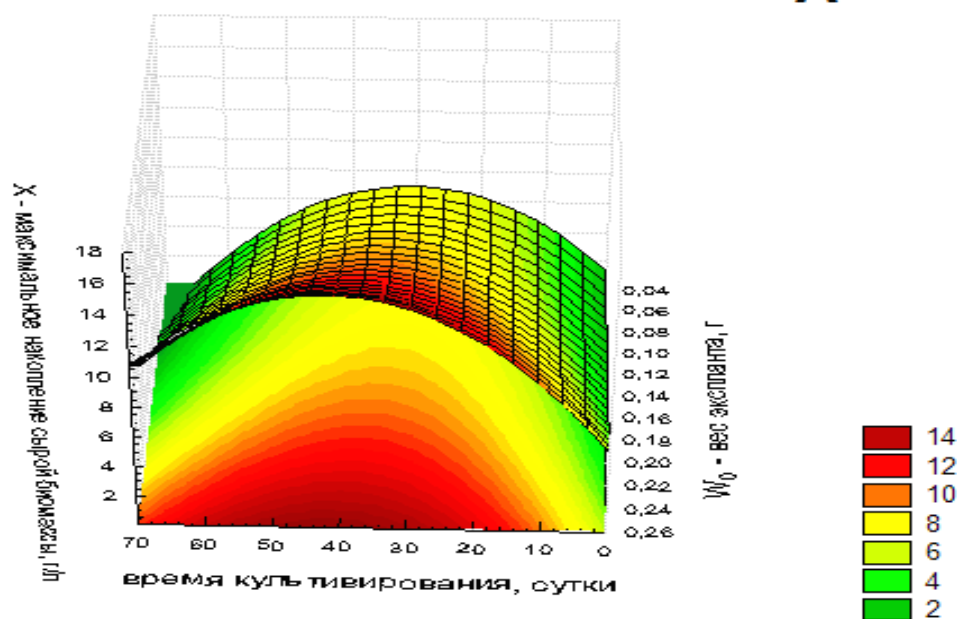


Рис. 2А. Трехмерное моделирование зависимости максимального накопления сырой биомассы (X) каллуса от веса исходного экспланта и времени культивирования (среда 1).

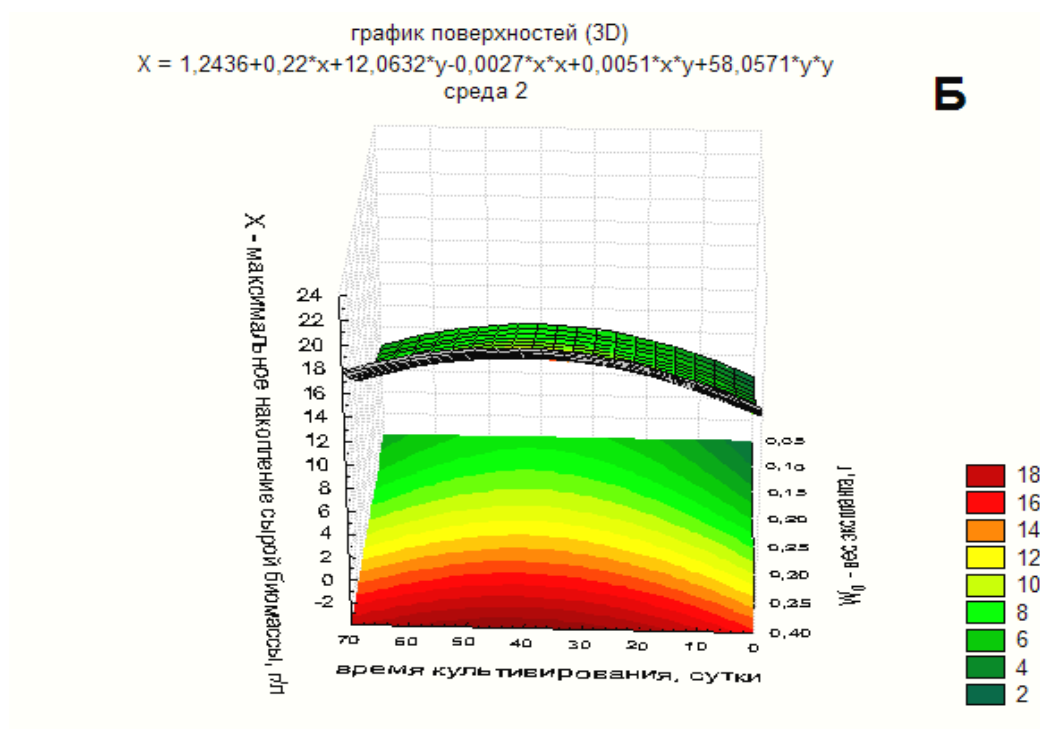


Рис. 2Б. Трехмерное моделирование зависимости максимального накопления сырой биомассы (X) каллуса от веса исходного экспланта и времени культивирования (среда 2).

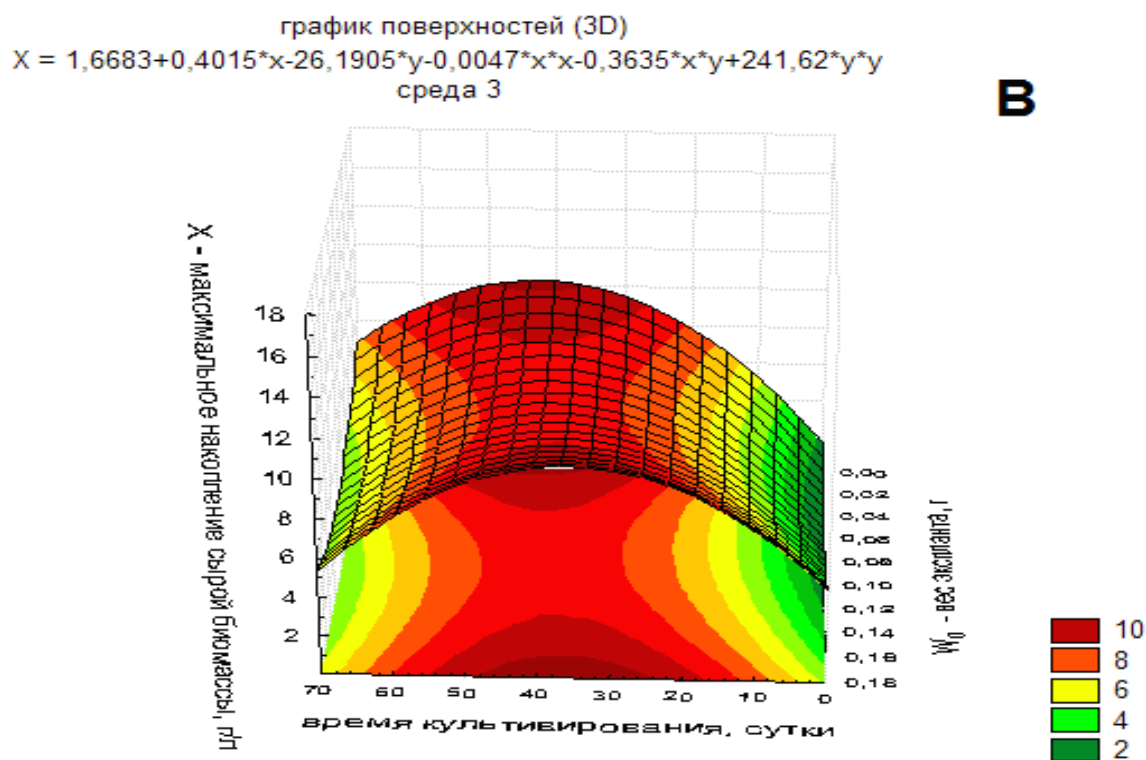


Рис. 2В. Трехмерное моделирование зависимости максимального накопления сырой биомассы (X) каллуса от веса исходного экспланта и времени культивирования (среда 3).

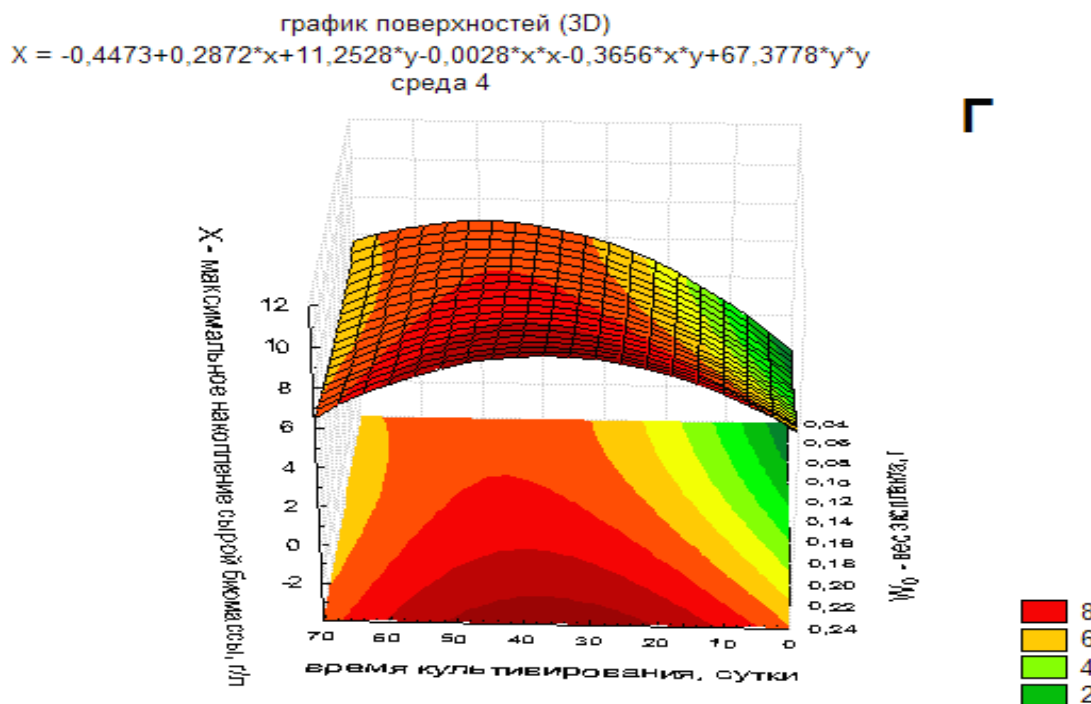


Рис. 2Г. Трехмерное моделирование зависимости максимального накопления сырой биомассы (X) каллуса от веса исходного экспланта и времени культивирования (среда 4).

На клеточном уровне процессы пролиферации и морфогенеза, являясь выражением общебиологической закономерности высших растений, могут быть описаны различными параметрами, характеризующими рост *in vitro*. Поэтому нами был предложен метод многомерного моделирования с помощью подбора дискриминантных функций. Чтобы уменьшить размерность комплекса признаков и таким образом значительно упростить модель, на первом этапе был проведен матричный корреляционный анализ. Этот анализ позволил вы-

делить мультиколлениарные признаки (между которыми имеется сильная прямая или обратная корреляционная связь). Снижение размерности комплекса показателей позволило отобрать для последующего анализа только те параметры, которые корреляционно не были связаны между собой.

После пошагового регрессионного анализа путем постепенного насыщения модели в качестве наиболее и достаточно информативных были оставлены только показатели с наиболее значимой лямбдой Уилкса (таблица 1).

Таблица 1

Информационная значимость показателей роста, включенных в модель

показатели	лямбда Уилкса	частная лямбда Уилкса	F-критерий включения в модель	p - уровень значимости	толерантность	Информационная насыщенность модели
W^t	0,056679	0,123710	75,55619	0,000000	0,049434	0,950566
M	0,027307	0,256770	30,87506	0,000000	0,026055	0,973945
Π_t	0,017883	0,392098	16,53741	0,000001	0,050776	0,949224
G	0,009843	0,712358	4,30707	0,011639	0,144009	0,855991
μ	0,009570	0,732700	3,89137	0,017718	0,078830	0,921170

Таблица 2

Классификационная матрица объектов наблюдения с оценкой корректных группировок

Среды культивирования	процент корректных группировок	апостериорное распределение объектов наблюдения по средам культивирования			
		среда 1	среда 2	среда 3	среда 4
1	100,0000	10	0	0	0
2	100,0000	0	10	0	0
3	90,0000	0	0	9	1
4	80,0000	0	0	2	8
Всего	92,5000	10	10	11	9

Надежность полученной модели иллюстрируют таблица 2 и рисунок 3.

Как представлено в таблице 2 и на рисунке 3, модель в 100% случаев группирует объекты, выращенные на средах 1 и 2. На средах 3 и 4 доля правильности дифференцированных случаев наблюдения составила соответственно 90% и 80%. Следует обратить внимание на то, что из последних двух сред ни один из объектов наблюдения не был отнесен

к группам 1 и 2. Таким образом, среды 3 и 4 можно считать идентичными, которые могут быть описаны одним уравнением модели. В целом же математическое описание модели представлено в таблице 3.

Поскольку в нашем случае мы имеем дело, по своей сути, с относительно замкнутой системой, которую с позиций аутоэкологии можно отнести к категории микрокосма с не пополняемыми и не регенерируемыми ре-

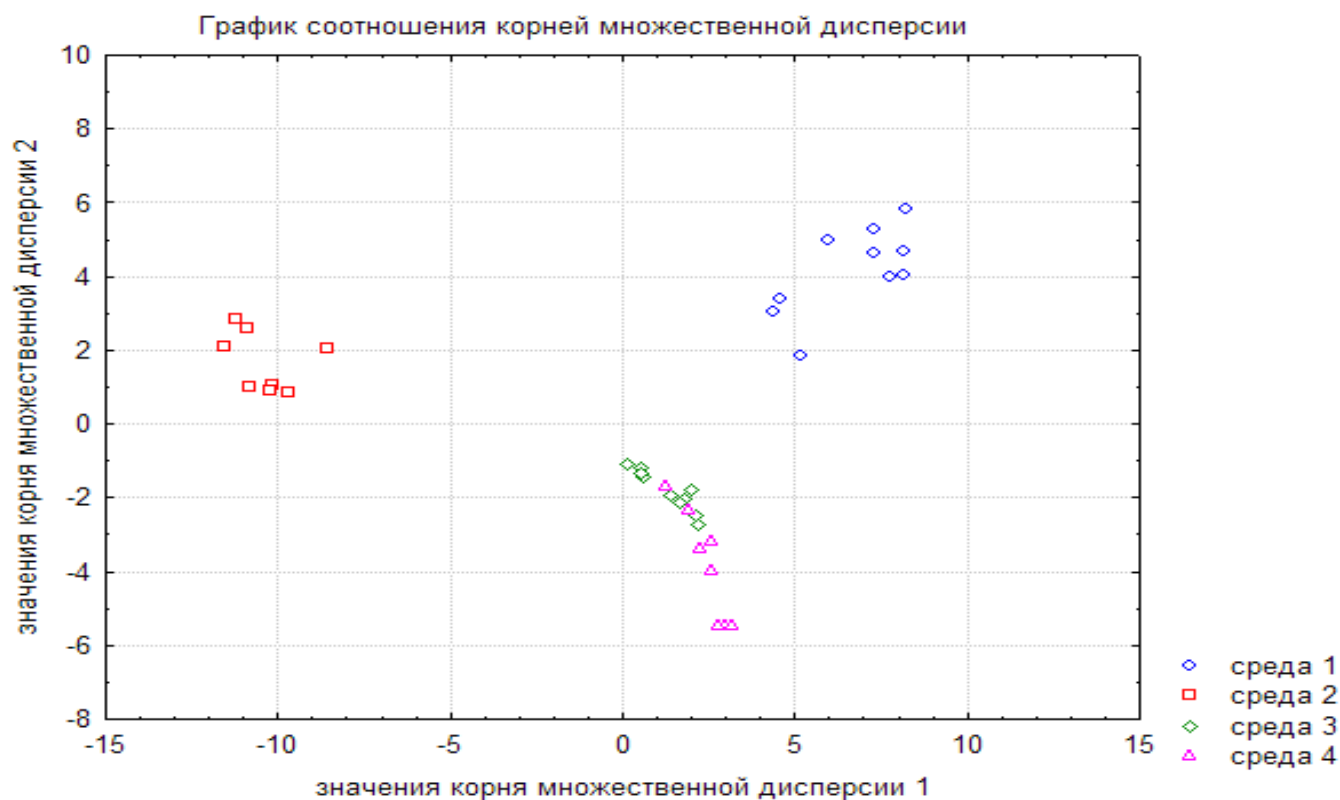


Рис. 3. График апостериорного распределения объектов наблюдения по группам.

Таблица 3

Дискриминантная функция модели роста на различных средах

показатели роста	коэффициенты регрессии при переменных (показателя роста)			
	1 среда	2 среда	3 среда	4 среда
P	133,6	1055,4	517,1	496,2
Π^1	-433,4	-274588,8	-127828,4	-127237,9
I	28,4	308,94	151,20	148,42
G	1,7	-1,36	-0,06	-0,14
μ	2020,3	-10764,4	-2969,2	-2424,6
Constant	-154,9	-661,4	-225,6	-212,0

сурсами, мы представили два типа модели. Первый тип – регрессионные модели (двух- и трехмерные), которые характеризуют динамику роста культуры на различных средах в зависимости от фактора времени, а также от веса исходного экспланта. Биологическая суть моделей отражает потенциал роста каллусной культуры и сроки его реализации в условиях, когда клетки испытывают воздействие фактора сопротивления среды за счет снижения ее ресурсов и накопления продуктов метаболизма. Общность модели в нашем исследовании подтверждается единым временем реализации репродуктивного потенциала каллуса для всех изученных сред, который приходится на 35-45 сутки культивирования, а также однотипностью моделей, т.к. во всех случаях имели место полиномы высоких степеней. Точность моделей можно оценить по малой вариативности параметров на каждом поперечном срезе динамики роста и отсутствием «выскакивающих» величин.

Второй тип модели в наших исследованиях (дискриминантные функции) позволяет совершенно четко дифференцировать культуры, выращенные на разных средах. При этом следует особо подчеркнуть, что модель, как наиболее информативная, составила две группы показателей. Одна группа представлена показателями, которые характеризуют реализованный в условиях конкретной среды потенциал роста культуры каллуса. Сюда вошли показатели конечного веса (W_f), увеличение сырого веса (M) и прирост сырой массы (Π_f). Другая группа показателей описывает динамические свойства каллуса – это удельная ско-

рость роста (μ) и время удвоения биомассы (G). Таким образом, благодаря методу дискриминантных функций можно считать доказанным наличие специфических особенностей в динамике роста каллуса на средах, содержащих экзогенные фенольные соединения. Этот же метод позволяет считать среды 3 и 4 во многом идентичными по своим культуральным свойствам. Следует отметить, что такие показатели, как максимальное накопление сырой биомассы, экономический коэффициент, продуктивность по биомассе и индекс скорости роста по сырой биомассе оказались для модели излишне информативными.

Высокая статистическая достоверность и информативная значимость модели позволяют считать ее надежным инструментом для апостериорных и априорных оценок динамики роста каллуса на разных морфогенных средах.

Заключение

С помощью математических моделей установлено, что при культивировании каллуса сирени листового происхождения сорта «М.Шолохов» на морфогенных средах, содержащих экзогенные фенольные соединения или их предшественники, наиболее продуктивной является среда, содержащая рутин (среда 2).

Нами предложен эффективный метод определения ростовых параметров каллуса при культивировании на разных морфогенных средах, который основан на современных принципах математического моделирования. При использовании предложенного метода отпадает необходимость в анализе всех рос-

товых параметров при изучении процессов морфогенеза.

Литература

1. Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Тюкавкина, Н. А. Биофлавоноиды (Актовая речь) / Н. А. Тюкавкина. – М.: изд. дом «Русский врач». – 2002. – 56 с.
3. Носов, А. М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений / А. М. Носов // Биология и биотехнология культивируемых растений / под. ред. Р. Г. Бутенко. – М.: Наука, 1991. – С. 5-20.
4. Plant Tissue Culture – A Potential Source of Medicinal Compounds / S. R. Bhalsing [et al.] // J. Sci. Indust. Res. – 1998. – Vol. 57. – P. 703-708.
5. Кунах, В. А. Изменчивость растительного генома в процессе дифференцировки и каллусообразования *in vitro* / В. А. Кунах // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – С. 919-929.
6. Запрометов, М. Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения / М. Н. Запрометов // 56 Тимирязевские чтения. – М.: Наука, 1996. – 45 с.
7. Ranen, P. H. Biology of plants / P. H. Ranen, R. F. Evert, S. E. Eichhorn. – 4-th ed. – Washington: Worth Publ., 1986. – P. 351.
8. Role of cytoskeleton in cell shaping of developing mesophyll of wheat / G. Jung [et al.] // Eur. J. Cell Biol. – 1992. – Vol. 57. – P. 88-94.
9. Васильев, А.Б. Сравнительная структурно-функциональная характеристика цитоскелета животных и растений / А.Б. Васильев // Журн. общ. биологии. – 1996. – Т. 57. – С. 293-325.
10. Ranen, P.H. Biology of plants / P.H. Ranen, R.F. Evert, S.E. Eichhorn. – 4-th ed. – Washington: Worth Publ., 1986. – P. 383.
11. Adventitious root growth and cell cycle induction in deepwater rice / R. Lorbiecke [et al.] // Plant Physiol. – 1999. – Vol. 119. – P. 21-29.
12. Ростовые и биосинтетические характеристики *Syringa vulgaris* L. сорта «М.Шолохов» стеблевого происхождения в культуре *in vitro* / Л. А. Любаковская [и др.] // Вестник ВГМУ. – 2007. – Т. 6, № 1. – С. 105-113.
13. Боровиков, В. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов / В. Боровиков. – СПб.: Питер, 2001. – 656 с.
14. Бендат, Дж. Прикладной анализ случайных данных: пер. с англ. / Дж. Бендат, А. Пирсол. – М.: Мир, 1989. – 540 с.

Поступила 17.08.2008 г.

Принята в печать 02.03.2009 г.

ПРОБЛЕМЫ БИОЭТИКИ В СИСТЕМЕ МЕДИЦИНСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ

СОЛОДКОВ А.П., ЛАЗУКО С.С., КУЛИК С.П., КОНЕВАЛОВА Н.Ю.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Резюме. Целью данной статьи является рассмотрение проблем биоэтики в обосновании поиска инновационных технологий медицинского образования. В статье анализируется опыт использования лабораторных животных и альтернативных методов обучения (фильмы, симуляторы, экспериментирование студентов на самих себе и т. д.). Показаны преимущества альтернативных методов в физиологическом практикуме. Описывается опыт использования на кафедре нормальной физиологии ВГМУ полиграфа с целью преподавания основ общей физиологии.

В заключении статьи делается вывод о необходимости включения биоэтических принципов в типовые программы, по которым ведется преподавание общебиологических дисциплин в медицинском вузе.

Ключевые слова: медицинское образование, биоэтика.

Abstract. This article is aimed at the analysis of the bioethics problems in the substantiation of the searching for innovation technologies of medical education. In this article the experience of using the laboratory animals and alternative methods of teaching (films, simulators, students' conducting experiments on themselves, etc.) has been analyzed. The advantages of alternative methods at practical classes on physiology have been shown. The experience of polygraph using at the chair of normal physiology of VSMU with the aim of general physiology foundations teaching has been described.

The authors made a conclusion about the necessity to include bioethical principles in the standard programs on the basis of which general biological disciplines are taught at higher medical schools.

Неизбежность биоэтической составляющей в системе медицинского знания и медицинского образования детерминирована своеобразием самой медицины как феномена культуры.

Для медицинского познания и практики всегда одинаково значимы как сами профессиональные знания, умения и навыки, так и система ценностей, которая лежит в их основании. Именно поэтому медицина стала единственной сферой человеческой деятельности, изначально подчиненной нравствен-

ным регулятивам профессиональной этики, а *деонтология* (от греч. *deontos* – нужное, должное и *logos* – слово, понятие, учение) как учение об этических основаниях врачебной деятельности стала неотъемлемой частью всего комплекса клинических и медико-биологических дисциплин.

Начиная с последней трети XX века, по мере становления и развития постнеоклассического типа научной рациональности, в ткань всей современной науки входят непривычные для классической науки идеалы блага человека и человечества, морали и добра, долга и ответственности за результаты, полученные в процессе научного изучения «человекоразмерных» объектов. Именно в это время, в про-

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, кафедра нормальной физиологии. – Солодков А.П.

цессе взаимодействия биологии, медицины и философии, этики, формируется биоэтика как интегративное междисциплинарное научное направление.

Основное предназначение биоэтики заключается в систематическом анализе действий человека в биологии и медицине в свете нравственных ценностей и принципов, в разработке новых гуманистических и моральных принципов научного исследования в таких «тонких» сферах, как клонирование человека, генная инженерия, защита прав и достоинств человека при проведении биомедицинских исследований с участием человека, экспериментальной деятельности с животными, формировании морально-правовых и социально-этических основ решений в области трансплантации органов, эвтаназии, психиатрии и др. Биоэтика не просто вторгается в область медицинской деонтологии, а включает ее в себя, коренным образом расширяя этическую проблематику медицинского знания и ставя новые задачи для медицинского образования.

Целью данной статьи является рассмотрение проблем биоэтики в обосновании поиска инновационных технологий медицинского образования.

В переводе с греческого биоэтика означает этику жизни, или жизненную этику. Оксфордский словарь дает определение биоэтики как дисциплины, предметом которой являются этические вопросы, возникающие в ходе развития медицины и биологии [5]. В наше время биоэтика – это не просто раздел философии. Она является междисциплинарной областью человеческого знания, в формировании которой участвуют медики, биологи, юристы, социологи, философы, религиоведы и представители других профессий.

Впервые развернутое обсуждение проблем биоэтики состоялось в г. Нюрнберге в 1946 г. [3]. Оно было связано со злодейскими опытами на людях, проводимыми некоторыми немецкими врачами в годы Второй мировой войны, вопреки данной ими клятве Гиппократова. Именно на Нюрнбергском процессе мир впервые подверг сомнению добросовес-

тность врачей и врачебную этику. В ходе этого процесса было предъявлено обвинение 23 немецким ученым-медикам. В их числе – личный врач Гитлера и глава Комиссариата здравоохранения и санитарии К. Брандт, личный врач Гиммлера, президент немецкого Красного Креста К. Гебхард и др. Трибунал приговорил семь немецких подсудимых к высшей мере наказания.

Тогда в Нюрнберге был создан 1 Международным документ по биоэтике, так называемый «Нюрнбергский кодекс», содержащий 10 пунктов и регламентирующий проведение научных исследований и экспериментов на людях.

Принципы, изложенные в Кодексе, являлись не требованиями закона, а нормами морали и не носили обязательного характера [3].

Основателем биоэтики по праву является американский биолог-биохимик и ученый-гуманист Ван Ренсселер Поттер (1911-2001 гг.), который в 1969 году вводит в научный обиход термин «биоэтика» и призывает представителей гуманистических наук и естествоиспытателей объединить усилия для того, чтобы обеспечить людям достойные условия жизни. На 70-е годы XX века выпадает начало интенсивного развития биоэтики в Америке и странах Западной Европы, а ее возникновение связано, прежде всего, с внедрением новых биомедицинских технологий. Среди прочих: развитие трансплантологии и геномной инженерии, прогресс в области медицинской диагностики и методах репродукции человека, массовое использование в клинических исследованиях и научных экспериментах животных и людей и др. Все это приводит к необходимости решать моральные проблемы, ранее не стоявшие перед человечеством.

Биоэтику развивают представители целого ряда дисциплин: врачи, биологи, физиологи, философы, психологи и многие другие. Поэтому биоэтика – это междисциплинарная наука, она должна преподаваться всем, кто обучается медицинским специальностям, а также биологам, философам, юристам и практически на всех кафедрах медицинских вузов.

Роль студента в процессе образования

В медицинском образовании идет постоянный поиск новых форм и методов преподавания. Это связано с международным образованием в области прав человека и трансформации концептуальных основ медицинского образования. Это помогает активизировать роль студента в процессе обучения и актуализирует поиск новых образовательных средств и подходов. Например, мировая практика показывает, что в США по мере возрастания протеста студентов и общественности против анатомирования начали предприниматься попытки поддержать право на выбор. В результате семь штатов – Флорида (1985г.), Калифорния (1998г.), Мэйн (1989г.), Луизиана (1992г.), Пенсильвания (1992г.), Нью-Йорк (1994г.) и Род-Айленд (1997г.) – приняли подобные законы. В ЕС четырнадцать стран запретили инвазивное использование живых животных в начальной и средней школе; подобная ситуация в Голландии. Препарирование животных запрещено, по крайней мере, в трех странах: Аргентине (1987г.), Словацкой Республике (1994г.) и Израиле (1999г.). В 1993г. парламент Италии принял закон, гарантирующий право любого гражданина отказаться принимать участие в экспериментах на животных в любой форме. Акт об экспериментах на животных, принятый в Нидерландах, запрещает животное экспериментирование в случае, когда альтернативы могут давать равноценные результаты.

Фундаментальным принципом, лежащим в основе любой жизни, является принцип развития, согласно которому одна форма жизни заменяется другой, более совершенной. Знание этого принципа должно наполнять нашу практику. В конце 20-го столетия постепенное развитие наук о жизни привело к важному и фундаментальному выводу о необходимости изменения нашего общего мировоззрения на отношения между человеком и всеми другими проявлениями жизни. Принимая во внимание уникальность и в то же самое время неразрывность связи между формами жизни, подчеркивает, что этот вопрос этики является наиважнейшим.

Традиционные методы обучения

Жизнеутверждающее обязательство врача исцелять и императивное требование *Primum non nocere*, или «Прежде всего, не навреди», являются философской основой человеческой медицины. Поэтому использование животных, при котором им причиняется вред, противоречит фундаментальным принципам медицины.

Использование лабораторных животных в процессе обучения имеет давнюю историю. Интерес к изучению анатомии и физиологии простирается далеко в прошлое, к временам Леонардо да Винчи (1452-1519) и далее. То, что животные могут использоваться для понимания необъясненных еще процессов, стало ясно, когда нидерландец Ян Сваммердам (1637-1680) доказал, что объем мышц не увеличивается при сокращении за счет притока флюида (неощутимой тончайшей жидкости), как считали в его времена. Для этого он показал в эксперименте, что объем погруженной в воду изолированной мышцы лягушки остается прежним при сокращении, так как уровень воды не изменялся, когда расслабленная мышца стимулировалась. Публикация труда Дарвина «Происхождение видов» в 1859 году дала начало новым дисциплинам – сравнительной анатомии и сравнительной физиологии. С тех пор животные были не просто объектами исследований, но также и моделями анатомии человека и патофизиологии. Или другими словами: животные стали альтернативами людей как объектов исследования. В науке модели используются в различных целях. «Исследовательские» модели типичны для фундаментальных исследований. В прикладных исследованиях «предсказывающие» модели широко используются с целью экстраполяции результатов от модели к реальной ситуации. Животные очень часто используются для изучения патофизиологических процессов и воздействий новых лекарственных препаратов в рамках биомедицинских исследований.

Альтернативные методы обучения

Альтернативы – образовательные средства или обучающие подходы, которые заме-

няют использование животных и дополняют существующее гуманное образование [6].

Многие ученые связывают термин «альтернативы» только с использованием методов, которые полностью исключают использование животных из эксперимента. Таким образом, они отказываются от идеи, что альтернативы могли бы быть реализованы в их исследовании, поскольку их работа включает использование методик *in vivo*. Однако альтернативы можно рассматривать как включающие не только методы «замены», но также «сокращения» и «усовершенствования» [4].

Таким образом, альтернативы – это гуманные образовательные средства и подходы в обучении, которые могут заменять использование животных там, где им причиняется вред, или дополнять уже существующее гуманное образование. Обычно используемые в комбинации для соответствия существующим целям обучения и для обеспечения таких результатов образования, которые не могут быть достигнуты экспериментированием на животных, альтернативы включают:

- фильмы и видеозаписи;
- мультимедийные компьютерные тренажеры;
- трупы и ткани животных, полученные из этических источников;
- клиническую работу с животными-пациентами и животными-«добровольцами»;
- экспериментирование студентов на самих себе;
- лабораторные работы *in vitro*;
- клиническая практика.

В настоящее время учёными разработано более 500 альтернатив к экспериментам на животных. Сейчас многие университеты постепенно отходят от экспериментов на животных и внедряют в учебный процесс гуманные альтернативы. Очень часто столь положительные перемены происходят благодаря тому, что студенты активно отстаивают свою позицию непричинения вреда животным. Но не только в этом дело. Многие гуманные альтернативы на самом деле эффективнее вивисекции, в чем преподаватели смогли убедиться во время работы с теми, кто добился права учиться с помощью альтерна-

тивных методов. Кроме того, проводились специальные исследования, целью которых было выяснить, насколько гуманные альтернативы действенны. Оказалось, что большинство современных альтернатив способствуют обучению и получению практического опыта не хуже, а иногда даже лучше, чем вивисекция.

Преимущества альтернатив объясняются следующими причинами:

- Альтернативные методы интересны и легко запоминаются (например, виртуальная реальность, проведение экспериментов на себе).
- Они позволяют подобрать индивидуальный темп обучения.
- Опыты на животных не всегда удаётся воспроизвести, в то время как при использовании, например, компьютерной программы, студент может повторить опыт несколько раз и при самых разных условиях.
- Альтернативные методы экономичны. Многие из них недорого стоят, в то время как ежегодные затраты на покупку и содержание подопытных животных могут быть весьма значительными.

Вот почему в настоящее время в учебных заведениях Нидерландов, Швейцарии, Аргентины, Словакии больше не проводится вивисекция; альтернативные методы обучения используются в большинстве вузов Италии, Швеции, Англии и Германии. При этом не пришлось жертвовать качеством образования. Более того, благодаря альтернативам, качество образования улучшилось. Отрицательное отношение зарубежных коллег к опытам на животных поддерживают студенты и преподаватели из Беларуси, России и стран СНГ [1, 2].

Обучение и подготовка специалистов в области естественных наук требует от студента наряду с изучением основ традиционных знаний, также овладения разнообразными умениями. Выпускники, приступая к профессиональной деятельности, должны быть знакомы с теми технологиями, которые используются в сегодняшних лабораториях и клиниках, с разработкой и выполнением эксперимента.

Студенты медицинского университета выполняют практическую работу, чтобы продемонстрировать знания и приобрести ряд умений.

В настоящее время в Витебском государственном медицинском университете лабораторные работы по общей физиологии предполагают использование животных различных биологических видов (лягушки и крысы). Однако мы значительно уменьшили их число, используя альтернативы в обучении студентов нормальной физиологии. Полиграф – это комбинация измерительного оборудования, которое иллюстрирует фундаментальные физиологические понятия и при помощи которого возможно измерить многие величины, вести анализ полученных результатов, распечатать результаты исследования. Особенностью данного оборудования является и то, что в нем работы, исследования выполняются на человеке. Регистрация показателей, отражающих деятельность различных органов и систем организма, может проводиться в условиях покоя, эмоционального и физического напряжения. В этом случае студенты становятся и исследователями, и испытуемыми.

Программное обеспечение студенческой лаборатории позволяет создавать различные варианты лабораторных работ. Именно это мы и использовали при составлении методических указаний по общей физиологии для студентов второго курса лечебного факультета. В рамках программы по нормальной физиологии многие работы на низших позвоночных были заменены исследованиями с участием самих студентов. Это позволило, используя альтернативу, поддерживать этические нормы будущего врача, расширить понимание физиологических процессов в организме человека. Методические указания к лабораторным работам по общей физиологии состоят из десяти занятий, включая вводное и итоговое. Хотелось бы подчеркнуть, что перед каждой работой в методических указаниях помещен дополнительный материал, позволяющий детально разобраться в проблеме, далее пошагово представлен ход работы, который без труда позволит выполнить ее. В конце работы предложен ряд вопросов,

ответы на которые позволят закрепить пройденный материал.

Традиционно на занятии «Биоэлектрические явления в возбудимых тканях. Электрорегенез возбуждения» при регистрации биотоков мышц применялись низшие позвоночные (рис. 1).



Рис. 1. Приготовленный нервно-мышечный препарат.

Необходимо отметить, что студенты с трудом переносили полученные данные на организм человека. А ведь электромиография (ЭМГ)- метод регистрации электрической активности мышц, который используется в диагностических целях при заболеваниях мышц, а также при функциональных исследованиях двигательного аппарата. Для регистрации суммарной ЭМГ применяют накожные электроды, которые укрепляют непосредственно над исследуемой мышцей. Для анализа ЭМГ применяют ее интегрирование, поскольку величина интегрированной ЭМГ пропорциональна величине развиваемого мышечного усилия. При регистрации электромиографии на самих себе упростило и улучшило понимание происхождения сигналов, обнаруживаемых ЭМГ-электродами (рис. 2).

При изучении темы «Физиология мышц. Физиологические свойства мышц» нами адаптирована работа «Запись и анализ вовлечения двигательных единиц», также с использованием полианализатора. После регистрации и анализа данных студент в состоянии сравнить средние значения электромио-

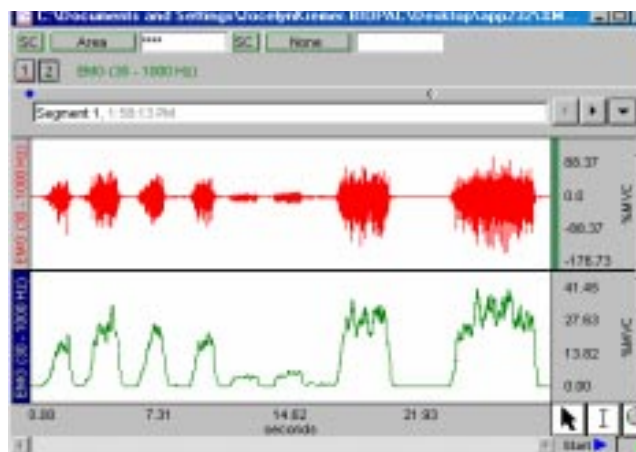


Рис. 2. Электромиография с использованием полианализатора.

ографической активности при максимальном сжатии для правого и левого предплечий, соотнести вовлечение двигательных единиц с увеличением мощности сокращения скелетной мышцы. Совершенно новой работой является «Электромиография (ЭМГ) при утомлении». На этом занятии учащиеся найдут объяснения, почему по мере развития утомления при той же величине мышечного усилия амплитуда ЭМГ нарастает. Разберутся, что это связано со снижением сократительной способности утомленных двигательных единиц, которая компенсируется нервными центрами вовлечением в работу дополнительных двигательных единиц. Кроме того, усиливается синхронизация активности двигательных единиц, что также повышает амплитуду суммарной ЭМГ.

На кафедре нормальной физиологии Витебского государственного университета в курсе общей физиологии для иллюстрации фундаментальных физиологических понятий используются видеофильмы и видеозаписи (изолированное сердце по Лангендорфу, рис. 3).

Для демонстрации движений аортальных и атриовентрикулярных клапанов сердца млекопитающего используется орган умершего животного или электронное средство обучения по подготовке препарата Гадда, выполненное сотрудниками кафедры (рис 4).

Некоторые работы выполняются с использованием программы «Виртуальная физиология». Опыты на животных не всегда удаётся воспроизвести, однако при использовании программы студент может повторить опыт несколько раз и при самых разных усло-



Рис. 3. Перфузия изолированного сердца крысы по Лангендорфу.

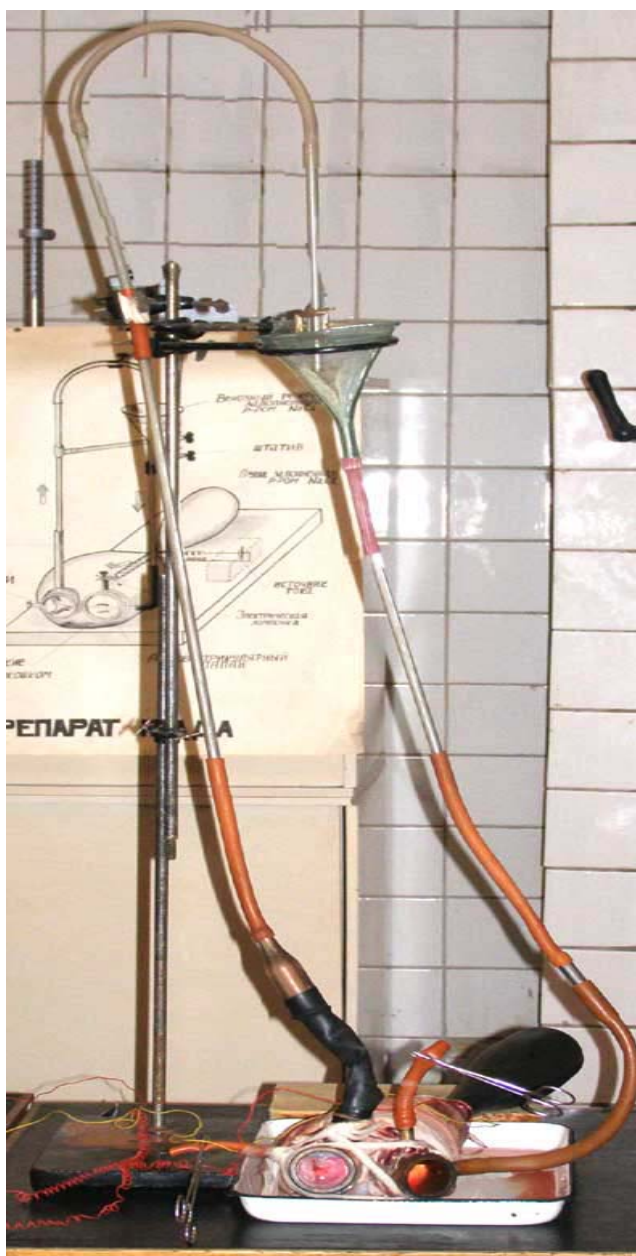


Рис.4. Препарат Гадда.

виях. Кроме того, в курсе нормальной физиологии предусмотрено посещение клинических баз ВГМУ (клиническая практика).

Альтернативные методы интересны и легко запоминаются. Использование альтернатив при проведении лабораторных занятий в курсе общей физиологии существенно расширяет представления о современных методах исследования организма человека, способствует усвоению основного содержания предмета, развивает логическое, творческое мышление учащихся, стимулирует их к более глубокой под-

готовке к каждому занятию, а также лежит в основе развития инновационных форм преподавания.

Заключение

Сегодня следует четко осознать актуальность и безальтернативность гуманизации медицинского познания и практики. Необходимость ценностей (аксиологической) составляющей в системе современного медицинского знания и практической деятельности детерминирована не только своеобразием самой медицины, но и глобализацией проблемы здоровья в развитии культуры и изменением типа научной рациональности. В конце 20 – начале 21 века облик медицины как формы знания и деятельности в корне изменяется. В применении достижений генной инженерии, биотехнологий, трансплантации органов, в определении психосоматического и социокультурного характера болезней и т.п. современная медицина ориентирована на широкий круг новых проблем, имеющих ярко выраженную мировоззренческую, нравственно-философскую, социально-психологическую, экономическую, политическую и правовую составляющие. Понятие здоровья все больше воспринимается в современной медицине как понятие социально-экономическое, политическое и нравственное по своему содержанию. Выявилась тенденция к расширению когнитивного базиса современной медицины через включение в ее теорию социально-гуманитарного знания. Ценностные ориентации ученого приобретают все большее значение в медицинских исследованиях. В этих условиях возрастает необходимость включения биоэтических принципов в систему медицинского образования. Речь идет не только о преподавании биомедицинской этики как учебной дисциплины (что само по себе не вызывает сомнений), но и наполнения всего педагогического процесса в медицинском вузе содержанием биоэтических норм и принципов.

Опыт решения биоэтических вопросов в физиологическом практикуме в нашем вузе свидетельствует о результативности иннова-

ционных форм и методов медицинского образования, опирающихся на решение биоэтических проблем.

Литература

1. Демченко, В.К. Міжнародні юридичні аспекти біоетики / В.К. Демченко; под ред. Ю.И. Кундиева // Антологія біоетики. – Львов: БаК, 2003 – С. 87.
2. Морозкина, Т.С. Студент-медик не должен убивать / Т.С. Морозкина, С.Д. Денисов // «Біоетика на порозі III тисячоліття»: Міжнарод. Симпозіум, Харків, 2000 р: тез. доповідей : / редкол.: А.І. Божков. – Х. : Вид-во ХНУ ім. В.Н. Каразіна, 2000. – 195 с.
3. Nurbergnskiy Kodex – 1947
4. Stephens, M.L. The significance of alternative techniques in biomedical research: An analysis of Nobel Prize awards. In Advances in animal welfare science, edited by M.W. Fox and L.D. Mickley: – Boston: Martinus Nijhoff, 1987 – P. 12-16.
5. The Oxford English dictionary. – // Oxford University press (Great Britain), 1989. – 1234 p.
6. The Three Rs concept and progress with implementing non-animal alternatives in biomedical research and testing. R.D. Combes (FRAME) // «Біоетика на порозі III тисячоліття»: Міжнарод. Симпозіум, Харків, 2000 р: тез. доповідей : / редкол.: А.І. Божков. – Х. : Вид-во ХНУ ім. В.Н. Каразіна, 2000. – 195 с.

Поступила 16.02.2009 г.

Принята в печать 02.03.2009 г.



ЗНАЧЕНИЕ РЕАКЦИЙ АДАПТАЦИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ АЛКОГОЛИЗМА

МАСЛАКОВ Д.А., МАКСИМОВИЧ Н.Е., ЛЕЛЕВИЧ А.В., ТРОЯН Э.И.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»;
кафедра патофизиологии

Резюме. В возникновении алкоголизма имеют значение социальные, психологические и биологические факторы. Из биологических факторов многие авторы основное внимание уделяют дофамину и его производным. Однако значение их несколько преувеличено. Основными являются реакции адаптации организма к токсическому действию алкоголя. Первичные реакции адаптации изучены хорошо, но они не безграничны. При приеме больших доз алкоголя существенно возрастает его концентрация в клетке. В этом случае включается новый вид адаптации, при котором происходит снижение поступления алкоголя в клетку и изменение активности некоторых ферментов. Толерантность организма к алкоголю возрастает, но при этом алкоголя недостаточно для обменных процессов. Повышение содержания алкоголя в организме больного происходит за счет употребления спиртных напитков. При прекращении приема алкоголя развивается абстинентный синдром, основой которого является субстратная (тканевая) гипоксия, возникающая вследствие исключения алкоголя из обмена веществ. Повторения абстинентного синдрома вызывают повреждение центральной нервной системы, а также всех органов и тканей организма.

Ключевые слова: алкоголизм, патогенез, адаптация.

Abstract. Social, psychological and biological factors contribute to the development of alcoholism. Out of biological factors many authors place main emphasis on dopamine and its derivatives. But their significance is somewhat overestimated. Adaptation reactions of the organism to toxic action of alcohol are principal. Initial adaptation reactions have been studied well but they are not unlimited. Consumption of large doses of alcohol results in significant increase of its concentration in a cell. In this case a new type of adaptation is initiated in which alcohol penetration into the cell is decreased and there is an altered activity of some enzymes. Tolerance of the organism to alcohol increases, there being not enough alcohol for metabolic processes. The increase of alcohol concentration in the patient's organism occurs due to the consumption of alcoholic beverages. Discontinuation of alcohol consumption results in the abstinence syndrome the cardinal sign of which is substrate (tissue) hypoxia, the latter develops due to alcohol exclusion from the metabolism. Repeated abstinence syndrome causes disorders of the central nervous system as well as of all organs and tissues of the organism.

Алкоголизм изучается более 150 лет, однако патогенез его полностью не изучен. Алкоголизм обычно рассматривается как заболевание, возникающее под действием социальных, психологических и биологических факторов. Основой патогенеза являются биологические факторы. Последние 50 лет основное внимание уделяется обмену биогенных аминов и, в частности, дофамину и его производным [1]. Известно, что степень рис-

ка заболевания у разных людей различна. Это явление в первую очередь, зависит от активности биогенных аминов. В то же время исследования дофамина и его производных не дают убедительного ответа, почему, например, у больных алкоголизмом во вторую стадию заболевания резко возрастает концентрация алкоголя в крови и держится на этом уровне в течение нескольких лет. Эти и другие факты дают основание считать, что в патогенезе алкоголизма имеют значение, кроме дофамина и его производных, и другие факторы.

Адрес для корреспонденции: 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80. тел. (0152) 74 24 94.- Маслаков Д.А.

В последнее время интенсивно ведутся исследования генов, активность которых изменяется при алкоголизме. Полученные разными авторами результаты в значительной степени противоречивы [2, 8]. Применение разнообразных методик исследования, в том числе и молекулярно-генетического метода, не раскрывает полностью патогенез заболевания [9]. Мы в своих работах придерживаемся адаптационной теории алкоголизма [6]. Ведь известно, что любое длительно протекающее заболевание сопровождается процессами адаптации в организме, которые имеют определенное значение в патогенезе и клинике данного заболевания.

При хроническом приеме алкоголя в организме активируется ряд адаптационных реакций: замедление всасывания алкоголя в желудочно-кишечном тракте, усиление его расщепления, снижение проницаемости клеточных и субклеточных мембран для алкоголя, повышение выделения легкими и почками [7].

Однако реакции адаптации безграничны и не всегда целесообразны. При хроническом приеме больших доз алкоголя они могут оказаться недостаточными для предотвращения поступления в клетку более высоких доз алкоголя. В этом случае организм включает новый вид адаптации, основой которого является замедление поступления алкоголя в клетку, в связи со снижением активности некоторых ферментов и дальнейшего изменения морфологического состава мембран клеток. Многие исследователи недостаточно уделяют внимание второму этапу адаптации организма к токсическому действию алкоголя, в связи с чем и механизм этих реакций во многом остается неясным. Известно, что при алкоголизме снижено содержание магния в организме. Магний является кофактором почти 300 тканевых ферментов, в связи с чем благоприятно влияет на обменные процессы [3]. Можно предположить, что недостаток магния является одним из факторов, способствующих снижению активности некоторых ферментов при алкоголизме. Указанные выше реакции повышают толерантность организма к алкоголю во вторую стадию в 7-8 раз, но одновременно в связи с падением уровня алкоголя

практически прекращается его метаболизм в клетке. Для создания концентрации алкоголя, необходимой для нормального обмена в клетке, больной вынужден систематически принимать 0,5-1,5 л водки. В этих условиях концентрация алкоголя в крови во вторую стадию алкоголизма достигает 0,3-0,4%, что в 10 раз выше содержания его в крови здорового человека. Такая концентрация алкоголя в наших опытах приводила к норме фагоцитарную активность нейтрофильных лейкоцитов больных алкоголизмом [5]. Нейтрофилы крови больных алкоголизмом в период абстинентного синдрома обладают низкой фагоцитарной активностью, которая практически восстанавливается при добавлении в инкубационную среду 0,4% алкоголя. Это позволяет объяснить состояние больных алкоголизмом, которое приводит в монографии И.В. Стрельчук: «...Мы наблюдали отдельных больных алкоголизмом, которые в течение 5-20 лет почти ежедневно выпивали по 2,5-3 литра водки и при этом работали так, что посторонние лица не замечали их опьяненного состояния...». При наличии нормальных процессов обмена некоторые защитные реакции больному алкоголизмом не нужны, и они исчезают. В частности, резко падает после приема алкоголя его концентрация в выдыхаемом воздухе, по сравнению с бытовыми пьяницами. Быстрое снижение содержания алкоголя в крови сопровождается развитием абстинентного синдрома. Основой последнего является субстратная (тканевая) гипоксия, которая обусловлена исключением алкоголя из обменных процессов. При субстратной гипоксии снижается артерио-венозная разница по кислороду и рН крови, нарушается биологическое окисление в органах и тканях организма. Эти нарушения исчезают под действием гипербарической оксигенации [4]. Частые абстинентные синдромы вызывают тяжелые функциональные и морфологические нарушения всех органов и тканей организма. Многие исследователи, описывая указанные нарушения обмена веществ, связывают их с высоким содержанием алкоголя в крови. Даже одна выдержка из монографии И.В. Стрельчука свидетельствует о том, что при систематическом приеме алко-

ля высокие его дозы больной переносит удовлетворительно. Следует учитывать влияние принятого алкоголя на образование энергии, вследствие его окисления. В одном литре водки содержится 315 г алкоголя. При окислении этого количества алкоголя выделяется 2236 ккал, что составляет более половины энергии, необходимой человеку для выполнения физической работы (3800 ккал). Отказ от алкоголя исключает этот источник энергии, отягощает течение абстинентного синдрома.

Однако основным методом лечения алкоголизма остается отказ от приема алкогольных напитков. Следует учитывать, что и после полного отказа заболевание может быстро возобновляться даже при приеме малых доз спиртных напитков или под действием сильных стрессовых реакций. Течение алкоголизма обычно делят на три стадии. Можно предположить, что в первую стадию изменения обмена веществ, характерные для алкоголизма, наблюдаются только в отдельных зонах центральной нервной системы. В связи с тем, что абстинентный синдром в первой стадии обычно отсутствует, отказа от приема алкоголя можно добиться за счет психотерапии. Применение препаратов, снижающих гипоксию, может ускорить этот процесс. Во вторую стадию алкоголизма при отмене алкоголя развивается субстратная гипоксия. Одна психотерапия дает отрицательный результат. Лечебные мероприятия в эту стадию должны проводиться в двух направлениях: применение препаратов, снижающих субстратную гипоксию и восстанавливающих количество энергии, которое больной получал за счет окисления алкоголя. Во время третьей стадии снижаются многие защитные реакции организма, в том числе и реакции, поддерживающие алкоголь на

высоком уровне, толерантность к алкоголю падает, артерио-венозная разница по кислороду снижена, тканевая гипоксия может привести к развитию полиорганной недостаточности. Положительный эффект в этом случае оказывают антигипоксические препараты. Для более глубокого изучения патогенеза алкоголизма мы приглашаем наркологов Беларуси принять активное участие в рассмотрении патогенеза алкоголизма с приведенной точки зрения.

Литература

1. Анохина, И. П. Биологические механизмы зависимости от психоактивных веществ (патогенез) / И. П. Анохина // Лекции по наркологии / под. общ. ред. Н.Н. Иванца. – Москва: Медицина, 2001. – С. 223-232.
2. Современные проблемы генетики зависимости от психоактивных веществ / И. П. Анохина [и др.] // Наркология. – 2004. – № 6. – С. 71-77.
3. Громова, О. А. Физиологическая роль магния в терапии (обзор) / О. А. Громова. – Архив, 2004. – С. 58-62.
4. Кондрашенко, В. Т. Алкоголизм / В. Т. Кондрашенко, А. Ф. Скугаревский; под общ. ред. П. П. Волкова. – Минск: Беларусь, 1983. – 288 с.
5. Лелевич, А. В. Влияние этанола в различных концентрациях *in vitro* на фагоцитарную активность нейтрофилов больных алкоголизмом / А. В. Лелевич, Э. И. Троян // Журнал Гродненского медицинского университета. – 2003. – № 3. – С. 17-19.
6. Маслаков, Д. А. Вопросы патогенеза алкоголизма / Д. А. Маслаков, А. В. Лелевич // Здравоохранение. – 2003. – № 8. – С. 32-33.
7. Стрельчук, И.В. Острая и хроническая интоксикация алкоголем / И. В. Стрельчук. – Москва: Медицина, 1966. – 182 с.
8. Liu, Y. Association of habitual smoking and drinking with single nucleotide polymorphism (SNP) in 40 candidate genes data from random population-based Japanese samples / Y. Liu // Journal of human genetics. – 2005. – Vol. 2. – P. 62-68.
9. Sommer, W. The search for candidate genes of alcoholism: evidence from expression profiling studies / W. Sommer // Biol. – 2005. – № 1. – P. 71-70.

Поступила 14.01.2009 г.
Принята в печать 02.03.2009 г.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Цель журнала «Вестник ВГМУ» состоит в том, чтобы представить аудитории оригинальные работы ученых ВГМУ, Беларуси, СНГ и других стран, имеющие значение для медицины, нормальной жизнедеятельности и совершенствования преподавания в медицинском вузе. В журнале могут печататься статьи иностранных авторов на английском языке.

Журнал включен в Перечень научных изданий Республики Беларусь по медицинской, фармацевтической и биологической отраслям науки. Вне очереди публикуются научные статьи аспирантов последнего года обучения (включая статьи, подготовленные ими в соавторстве), при условии их полного соответствия требованиям, предъявляемым к научным публикациям издания.

Журнал печатает:

- **ПОЛНОРАЗМЕРНЫЕ ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ.** Такие статьи содержат результаты оригинальных исследований.

- **ОБЗОРЫ.** Цель обзоров состоит в изложении существа проблемы и ее важности. Изложение материала должно быть доступно специалистам смежных областей. Основное внимание обзоров следует сконцентрировать на результатах современных исследований.

- **КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ.** Раздел предназначен для публикации результатов наиболее актуальных научных исследований, представляющих особую важность. Желательно, чтобы краткое сообщение не превышало 3-х страниц машинописного текста и содержало не более 2-х иллюстраций. Сообщения должны быть исчерпывающими по своему содержанию и начинаться с небольшого вводного абзаца, убеждающего читателя в необходимости прочтения всего сообщения.

- **ПИСЬМА В РЕДАКЦИЮ.** Этот раздел журнала содержит материалы переписки с редакцией, касающиеся критических замечаний по поводу опубликованных в журнале работ, или информацию, требующую безотлагательного обсуждения.

- **НОВОСТИ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.** В этом разделе освещаются вопросы, связанные с научным прогрессом в Республике Беларусь. Публикуются также материалы по результатам прикладных разработок, рекламируется продукция биотехнологической и фармацевтической промышленности и др.

- **ИНФОРМАЦИЯ О ПРЕДСТОЯЩИХ НАУЧНЫХ ФОРУМАХ.** Этот раздел предназначен для публикации предварительных сообщений о планируемых научных форумах, представляющих интерес для международной научной общественности.

Объем научной статьи должен составлять не менее 0,35 авторского листа (14 000 печатных знаков, включая пробелы между словами, знаки препинания, цифры и другое), что соответствует 8 страницам текста, напечатанного через 2 интервала между строками. Краткие сообщения – 3 страницы, обзор литературы – 15 страниц.

В редакцию направляются два экземпляра рукописи. Размеры полей: сверху – 2,5 см; снизу – 2,5 см; слева – 2 см; справа – 2 см. Текст статьи и графические файлы иллюстраций необходимо представить на дискете 3,5 дюйма стандартного формата. При подготовке текста статьи на компьютере необходимо использовать программы Microsoft Word или Word Perfect. При этом запрещается использование жирного шрифта и курсива.

Рукописи статей представляются на русском языке (для иностранных авторов возможно изложение материала на английском языке).

Каждая полноразмерная статья должна включать следующие элементы:
аннотацию;

фамилию и инициалы автора (авторов) статьи, ее название;

введение;

основную часть, включающую разделы «Методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение»;

заключение, завершаемое четко сформулированными выводами;

список использованной литературы.

Название статьи должно отражать основную идею выполненного исследования, быть по возможности кратким, содержать ключевые слова, позволяющие индексировать данную статью.

Титульная страница должна содержать: полное название статьи; фамилии и инициалы авторов, их место работы, а также почтовый адрес и телефоны того автора, с кем следует вести редакционную переписку и кому следует отсылать корректуру; сокращенный вариант названия статьи (не более 40 знаков); ключевые слова (не более 6) для составления указателя.

Аннотация на русском и английском языках (100-150 слов) должна ясно излагать содержание статьи и быть пригодной для опубликования в аннотациях к журналам отдельно от статьи.

В разделе «Введение» должен быть дан краткий обзор литературы по данной проблеме, указаны не решенные ранее вопросы, сформулирована и обоснована цель работы и, если необходимо, указана ее связь с важными научными и практическими направлениями. Во введении следует избегать специфических понятий и терминов. Анализ источников, использованных при подготовке научной статьи, должен свидетельствовать о знании автором (авторами) статьи научных достижений в соответствующей области. Обязательными являются ссылки на работы других авторов. При этом должны присутствовать ссылки на публикации последних лет, включая зарубежные публикации в данной области.

Основная часть статьи должна содержать описание методики, аппаратуры, объектов исследования и подробно освещать содержание исследований, проведенных автором (авторами). Полученные результаты должны быть обсуждены с точки зрения их научной новизны и сопоставлены с соответствующими известными данными.

Основная часть статьи может делиться на подразделы (с разъяснительными заголовками) и содержать анализ последних публикаций, посвященных решению вопросов, относящихся к данным подразделам.

Иллюстрации, формулы, уравнения и сноски, встречающиеся в статье, должны быть пронумерованы в соответствии с порядком цитирования в тексте. На обороте каждой иллюстрации следует указать «верх», номер рисунка, а также фамилию первого автора. Размер присылаемых рисунков должен быть выбран с учетом их уменьшения в тексте вдвое-втрое. Толщина линий на рисунках должна быть такой, чтобы после уменьшения она составила 0,2 мм. Размеры рисунков не должны превышать 24x40 см, однако полезно помнить, что для простых графиков конечный горизонтальный размер составляет 6-8 см. К каждому экземпляру статьи следует приложить по одному экземпляру иллюстраций. Копии рисунков и фотографий для второго и третьего экземпляров статьи должны содержать все необходимые буквенные и цифровые надписи. Подписи к рисункам печатаются через два интервала на отдельном листе бумаги. Листы с подписями не скрепляются с самими рисунками.

Каждая таблица должна быть отпечатана на отдельном листе бумаги через два интервала, иметь название и подстрочные примечания (если необходимо). Место, где в тексте должна быть помещена таблица, отмечается квадратом на левом поле, в котором ставится номер таблицы. В названиях таблиц и рисунков не должно быть сокращений.

В разделе «Заключение» должны быть в сжатом виде сформулированы основные полученные результаты с указанием их новизны, преимуществ и возможностей применения и четко сформулированы выводы. При необходимости должны быть также указаны границы применимости полученных результатов.

Все страницы, начиная с титульной, должны быть последовательно пронумерованы.

Размерность величин должна быть выражена в единицах Международной Системы (СИ), однако при необходимости в скобках после единиц измерения СИ может быть указана размерность в других системах.

Список использованной литературы оформляется в соответствии с ГОСТом – 7.1-2003. Список располагается в конце текста, ссылки нумеруются согласно порядку цитирования в тексте. Порядковые номера ссылок должны быть написаны внутри квадратных скобок (например: [1], [2]).

Список включает работы отечественных и зарубежных авторов. В оригинальных статьях желательно цитировать не более 15 источников, в обзорах литературы – не более 50. В статье не рекомендуются ссылки на авторефераты диссертационных работ или сами диссертации, т.к. они являются рукописями.

Статья должна быть тщательно отредактирована и выверена автором.

Желательно использовать общепринятые сокращения.

Направление в редакцию ранее опубликованных или принятых к печати в других изданиях работ не допускается. Статьи принимаются только с визой руководителя и обязательно при наличии экспертного заключения о возможности опубликования материалов в печати и других средствах массовой информации.

Редакция оставляет за собой право сокращения публикуемых материалов и адаптации их к рубрикам журнала.

Подписано в печать 02.03.09

Формат 1/8.

Бумага типографская №2. Гарнитура «Таймс». Усл.печ. л. 13,71

Тираж 100 экз. Заказ № 78 .

Издатель и полиграфическое исполнение УО «Витебский государственный медицинский университет».

Лицензия ЛИ № 02330/0133209 от 30.04.04

Отпечатано на ризографе в Витебском государственном медицинском университете.

210023, г. Витебск, пр-кт Фрунзе, 27.

При перепечатке материалов ссылка на «Вестник ВГМУ» обязательна.