

© ВИННИК Ю.С., АКСЮТЕНКО А.Н., ТЯПКИН С.И., ТЕПЛЯКОВА О.В.

УДК 616.381-002-085:612.223.12

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИК ЛОКАЛЬНОЙ И СИСТЕМНОЙ ОЗОНОТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ РАСПРОСТРАНЕННОГО ПЕРИТОНИТА

Ю.С.Винник, А.Н. Аксютенко, С.И. Тяпкин, О.В.Теплякова

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.

Войно-Ясенецкого, ректор – д.м.н., проф. И.П. Артюхов;

кафедра общей хирургии, зав. – д.м.н., проф. Ю.С. Винник.

Резюме. В работе представлены современные сведения, касающиеся основных механизмов действия и биологических эффектов медицинского озона, локального и системного применения методов озонотерапии в комплексном лечении больных с распространенным перитонитом. Описаны конкретные методики озонотерапии, их эффективность, подтвержденная как на экспериментальных животных, так и результатами внедрения в клиническую практику.

Ключевые слова: озон, перитонит, озонированный физиологический раствор, локальная озонотерапия, системная озонотерапия.

Винник Юрий Семенович – акад. РАЕН, д.м.н., проф., зав. каф. общей хирургии КрасГМУ; тел. 8 (391) 2623039.

Аксютенко Анна Николаевна – клинический ординатор каф. общей хирургии КрасГМУ; e-mail: aksjutenko@rambler.ru.

Тяпкин Сергей Игнатьевич – зав. отделением гнойной хирургии МУЗ Городская клиническая больница №6 им. Н.С. Карповича, Красноярск; тел. 8(391)2469407.

Несмотря на постоянное совершенствование методов хирургического лечения и интенсивной терапии, внедрение в клиническую практику новейших технологий и современных лекарственных препаратов, распространенный перитонит до настоящего времени остается одним из самых частых и грозных осложнений в абдоминальной хирургии [1, 4, 5, 8, 13, 16, 19]. Средние показатели летальности при распространенном перитоните удерживаются на уровне 20-30%, достигая при наиболее тяжелых его формах 50-70%, и не имеют существенной тенденции к снижению на протяжении последних десятилетий [10, 13, 14, 17, 22]. В связи с этим, проблема разработки и внедрения в клиническую практику новых подходов к решению вопросов по улучшению результатов лечения перитонита сохраняет свою актуальность.

Перспективным в этом направлении является применение методик локального и системного использования озонотерапии. Благодаря широкому диапазону лечебных свойств озона, проявляющихся в антиоксидантном, антигипоксантажном, бактерицидном, противовоспалительном, иммуномодулирующем и анальгезирующем воздействии, озонотерапия заслуженно получает все большее распространение в лечении острой хирургической патологии, в частности, больных с перитонитом [10, 20, 27, 30, 36].

Известно, что ключевая роль в метаболической перестройке организма при распространенном гнойном перитоните принадлежит системной клеточной гипоксии, приводящей к развитию выраженного энергодефицита и генерации свободнорадикальных процессов в тканях различных органов и систем. Свободные радикалы обладают ярко выраженным свойством клеточной альтерации и, распространяясь через систему кровообращения далеко за пределы первичного очага деструкции, приводят к повреждению клеточных мембран с последующим цитолизом в жизненно важных органах и системах и развитием их функциональной недостаточности [17, 20].

Вступая в реакции с многочисленными липидными компонентами цельной крови и плазматических мембран клеток, озон способствует увеличению активности клеточных ферментов, заинтересованных в метаболизме кислорода и ослабляющих перекисное окисление липидов: глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, супероксиддисмутазы, каталазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [6, 7, 8]. При этом снижается кислородное голодание тканей, повышается метаболическая активность форменных элементов крови и тканевых клеток, что сопровождается возрастанием активности ферментов дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования, приводя к восстановлению энергообразования [17, 19, 30, 37].

Антигипоксический эффект озона сопровождается улучшением кислородотранспортной функции крови, ее реологических свойств и активацией биоэнергетических процессов за счет увеличения концентрации кислорода в плазме [6, 10, 12, 17]. В результате озонлиза фосфолипидов мембран эритроцитов повышается их резистентность и деформабельность, что способствует увеличению парциального давления кислорода крови и восстановлению микроциркуляции. Уменьшается количество деструктивно измененных форменных элементов. Важным является усиление процессов утилизации глюкозы эритроцитами [7, 10, 19, 28, 32].

В процессе взаимодействия озона с клетками крови отмечено смещение рН среды в щелочную сторону. Это происходит за счет взаимодействия озона с карбонатным буфером, изменения ионного состава форменных элементов крови, а также реакции озона с белковым буфером. При этом отмечается снижение скорости оседания эритроцитов, уменьшение лейкоцитоза и лейкоцитарного индекса интоксикации [6, 16, 17].

Благодаря оптимизации периферического кровообращения, озонкислородная смесь способствует снижению тонуса артериол, раскрытию нефункционирующих капилляров и улучшению работы компенсаторных коллатеральных анастомозов с пролонгированным

эффектом. В результате налаживается полноценное кислородное обеспечение ишемизированных тканей, улучшается энергетический обмен, и, в конечном итоге, в очаге воспаления усиливаются процессы синтеза [8, 11, 29, 30].

Повышение окислительного потенциала крови индуцирует метаболические процессы в печени, что проявляется улучшением её детоксикационной функции, катаболизма стероидных гормонов, изменением чувствительности к инсулину [3, 7, 17]. При различных гипоксических состояниях защитное действие озона характеризуется уменьшением степени выраженности дистрофических изменений в гепатоцитах и сохранением в печени нормальных уровней глюкозы, глюкозы-6-фосфата, пирувата, а также гликогена, обладающего антиоксидантными свойствами посредством образующейся из него глюкуроновой кислоты [12]. Кроме того, озон способствует увеличению количества неизмененных митохондрий, сохранению обычного строения эндоплазматического ретикулума, росту численности лизосом и гранул гликогена. Благодаря стимуляции механизмов преобразования жировых энергетических субстратов в легко утилизируемые углеводные, применение озона существенно снижает вероятность развития жировой дистрофии и преобразования жирных кислот в токсические кетоновые продукты [20, 28, 29, 33].

Основной реакцией детоксикации в печени является реакция окисления токсинов на цитохроме P-450, действующем в составе окислительно-восстановительной ферментной цепи. Биохимические исследования показали, что в результате системного применения медицинского озона содержание цитохрома P-450 в печени возрастает [3, 7, 37].

Таким образом, под влиянием озонотерапии происходит активация внутриклеточных механизмов пластической, гликолитической и антиоксидантной функции гепатоцитов. Взаимосвязанное функционирование этих механизмов лежит в основе улучшения многих сторон деятельности печени, в том числе и антитоксической [31].

В литературе имеются сведения, подтверждающие иммуномодулирующее действие медицинского озона [6, 7, 12, 22, 25, 28]. В частности, под влиянием методик озонотерапии активизируется процесс фагоцитоза, который в значительной степени зависит от концентрации кислорода в периферической крови, а также от его доступа в ране. При длительно незаживающих ранах морфологически отмечается изменение клеточного состава воспалительного инфильтрата с преобладанием процессов регенерации над процессами распада [1, 8, 38].

Антибактериальное действие озона может быть реализовано и путем прямого окислительного эффекта [9]. Локальная активность в отношении микроорганизмов связана с нарушением их оболочки вследствие окисления фосфолипидов и липопротеинов, повреждения полипептидных цепей. Минимальные дозы озона вызывают местные повреждения мембран, прекращая процесс деления бактериальных клеток. Более высокие дозы вызывают повреждения ряда ферментативных, транспортных и рецепторных систем, обеспечивающих жизнедеятельность бактериальной клетки, приводя к ее гибели в результате поражения дыхания и возрастания проницаемости цитоплазматической мембраны [2, 39].

Согласно литературным сведениям, медицинский озон способен инактивировать микроорганизмы, обладающие факторами лекарственной устойчивости. Отмечено, что концентрация озона, равная 4 мг/л, полностью подавляет рост стафилококка, кишечной палочки, протей и клебсиеллы в количестве до 10^4 КОЕ/г ткани. При более высокой степени обсемененности ткани происходит неполная инактивация микроорганизмов с одновременным повышением их чувствительности к антибактериальным препаратам [6, 21].

Важно иметь в виду, что для медицинского озона присущи и анальгезирующие свойства. Местный обезболивающий эффект (к примеру, при озонировании брюшной полости) принято связывать как с уменьшением воздействия бактерий и их токсинов на нервные окончания париетальной и висцеральной брюшины, так и с блокирующим влиянием озона на

периферические нервные окончания [24, 25]. Обезболивающий эффект системной озонотерапии связан с непосредственным окислением белково-алгопептидов, которые образуются в месте повреждения тканей и принимают участие в передаче болевых импульсов в головной мозг [12]. Клинически анальгезирующее действие озона выражается в уменьшении потребности в наркотических препаратах и наиболее выражено при реинфузии озонированной аутокрови [10].

При экспериментальном перитоните местное применение озона уменьшает интенсивность процесса спайкообразования [27]. Таким образом, озонотерапия оказывает положительное воздействие на основные этиологические и патогенетические звенья распространенного перитонита.

Распространенными в клинической практике методиками локальной озонотерапии при перитоните являются интраоперационная санация брюшной полости и послеоперационный перитонеальный лаваж, метод пристеночно-полостной санации кишечника, а также введение внутрь озонированной дистиллированной воды [4, 18, 23, 26, 34, 35].

Интраоперационная перитонеальная санация включает тщательное промывание брюшной полости озонированным физиологическим раствором в объеме четырех-пяти литров с концентрацией 4-5 мг/л после устранения источника перитонита. Послеоперационный перитонеальный лаваж осуществляется путем введения в брюшную полость через дренажные трубки озонированного хлорида натрия с концентрацией озона 4 мг/л [15].

Эффективным энтеральным методом озонотерапии в комплексном лечении острого распространенного перитонита является метод пристеночно-полостной санации кишечника [4, 7, 14, 18, 21]. Для его проведения разработан специальный зонд со спирально закрепленными на нем полыми трубками, имеющими щелевидные клапаны для подачи лекарственных растворов. Результаты эксперимента и клинической апробации метода свидетельствовали о его наибольшей эффективности в сочетании с санацией брюшной полости. Так, у больных распространенным перитонитом в ранние

сроки происходило купирование синдрома эндогенной интоксикации и ликвидация пареза кишечника, отмечалась более низкая частота инфекционных осложнений, что способствовало снижению летальности на 9,5% [4].

В местной озонотерапии распространенного перитонита, наряду с использованием озонированного физиологического раствора и озонкислородной смеси, изучается эффективность экспериментального использования озонированного перфторана [5]. Показано, что озонированный перфторан оказывает более выраженное протекторное влияние на факторы неспецифического иммунитета по сравнению с другими растворами.

Немаловажное значение среди методик местного применения озонотерапии в комплексном лечении перитонита играют программированные видеолaparоскопические озоновые санации брюшной полости. По данным А.С. Снигоренко и А.К. Мартынова [26], эта методика применялась у 116 больных с распространенным перитонитом. Всем пациентам после устранения источника перитонита проводились санация и дренирование брюшной полости, интубация кишечника. Больным основной группы на передней брюшной стенке в мезогастрии оставляли два лапаропорта, через которые проводились сеансы программированных видеолaparоскопических озоновых санаций спустя 12-24 часа после операции и далее ежедневно по показаниям. Санации брюшной полости с удалением токсического выпота сочетали с дезинтеграцией рыхлых спаек под визуальным контролем. По результатам наблюдений в основной группе отмечено достоверное, по сравнению с контрольной, снижение маркеров эндогенной интоксикации: лейкоцитоза, лейкоцитарного индекса интоксикации, концентрации молекул средней массы уже к третьим суткам от начала лечения. К пятым суткам отмечалось разрешение пареза кишечника, подтвержденное данными периферической полиэлектрографии и фоноэнтерографии. На третьи сутки у 81,3% больных основной группы

отмечено отсутствие роста микрофлоры в промывной жидкости, на пятые – результаты посевов у всех больных были отрицательными.

Программированные видеолaparоскопические озонотерапевтические санации брюшной полости позволили в 100% случаев добиться хорошего функционирования дренажей, в то время как несостоятельность дренажей брюшной полости в контрольной группе отмечена в 23,1% [23, 26].

Методика ректальной инсуффляции газообразной озонкислородной смеси сочетает в себе местное противовоспалительное и антибактериальное действие, а также системное воздействие на организм пациента. Ряд авторов рассматривает ректальную инсуффляцию как методику общей озонотерапии, являющейся альтернативой внутривенному введению озонированного физиологического раствора или большой аутогемотерапии [21, 31]. Ректальные инсуффляции с озоном при распространенном перитоните применяют с целью борьбы с токсемией и для стимуляции моторики кишечника. Методика осуществляется при помощи шприца Жане со специальным пластмассовым наконечником со вторых-третьих суток послеоперационного периода через день. Время введения озона составляет от 0,5 до 5-10 минут. Важными критериями эффективности проводимого лечения являются тяжесть эндотоксикоза и состояние микроциркуляции крови в кишечной стенке, данные электро- и фоноэнтерографии [14, 35].

К парентеральному применению медицинского озона относятся такие методики, как внутривенное, в том числе регионарное введение озонированного физиологического раствора и большая аутогемотерапия с озоном [7, 8, 15, 34].

Эффективность использования внутривенного введения озонированного физиологического раствора при распространенном перитоните доказана в работе А.А. Рябова [22]. Больным в основной группе, наряду с санацией брюшной полости, озонированный физиологический раствор вводился внутривенно. Исследование позволило сделать вывод о том, что внутривенная озонотерапия обладает выраженным детоксикационным и

стресс-протекторным воздействием, способствует деблокированию системы микроциркуляции и улучшает перфузию тканей [22].

Одним из парентеральных методов применения медицинского озона в лечении перитонита является большая аутогемоозонотерапия [10]. Методика предусматривает интраоперационную нормоволемическую гемодилюцию с реинфузией озонированной аутокрови. Возврат озонированной аутокрови больному осуществляется во время операции до ушивания передней брюшной стенки. Под воздействием методики у больных распространенным перитонитом уменьшалось количество послеоперационных осложнений на фоне ограничения количества потребляемых антибиотиков и анальгетиков [10].

В.В. Новомлинский [7] в эксперименте разработал способ антигипоксической защиты печени путем внутриворотного введения озонированного физиологического раствора. Автором сделан вывод об отсутствии прооксидантного действия у озонированного физиологического раствора в терапевтическом диапазоне. Отмечено, что применение озонированного физиологического раствора позволяет предотвратить развитие тяжелой печеночной недостаточности и получить высокий процент выживаемости при длительных сроках выключения печени из кровообращения [7].

Таким образом, полинаправленность патогенетических эффектов в сочетании с разнообразием методик системного и локального использования медицинского озона свидетельствуют об эффективности его использования и перспективах дальнейшего совершенствования комплексной интенсивной терапии распространенного перитонита.

METHODS OF LOCAL AND SYSTEM OZONE THERAPY FOR DIFFUSE PERITONITIS TREATMENT

Yu.S.Vinnik, A.N.Aksyutenko, S.I. Tyapkin, O.V. Teplyakova

Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky

Abstract. The paper presents modern data on main mechanisms and biological effects of medical ozone. Local and system applications of ozone in complex treatment of diffuse peritonitis are also discussed. The methods of ozone therapy and their efficiency proved on experimental animals as well as their application in clinical practice are described.

Key words: ozone, peritonitis, ozonized physiological solution, local ozone therapy, system ozone therapy.

Литература

1. Белобородов В.А., Борисов Р.Н. Современные принципы и перспективы хирургии тяжелых форм перитонита // Сиб. мед. обозрение. – 2008. – №3. – С. 3-7.
2. Буянов В.М., Лаберко Л.А., Родоман Г.В. и др. Оптимизация выбора антисептических препаратов для интраоперационной санации брюшной полости при распространенном перитоните // Вестн. РГМУ. – 2000. – № 3. – С. 7-14.
3. Векслер Н.Ю., Частов В.П., Германова Т.А. и др. Озонотерапия в комплексной детоксикации у больных с заболеваниями брюшной полости // Озон и методы эфферентной терапии в медицине. – 2000. – №4. – С. 71-72.
4. Глухов А.А., Жданов А.И., Андреев А.А. Метод пристеночно-полостной санации кишечника в комплексном лечении острого распространенного перитонита // Вестн. хирургии. – 2004. – Т. 163, № 2. – С.41-45.

5. Голубев А. М., Рагимов Р. М., Манасова З. Ш. и др. Острый перитонит и факторы неспецифической резистентности при введении озонированного перфторана (экспериментальное исследование) // Общая реаниматология. – 2007. – № 5-6. – С. 68-70.

6. Гульман М.И., Винник Ю.С., Каспаров Э.В. и др. Озонотерапия. – Красноярск: ГУПП «Сибирь», 2001. – 62 с.

7. Гульман М.И., Винник Ю.С., Миллер С.В. и др. Коррекция гомеостаза при остром панкреатите методом озонотерапии. – Красноярск: Знак, 2003. – 178 с.

8. Гульман М.И., Винник Ю.С., Якимов С.В. и др. Применение озона в хирургической клинике (обзор литературы) // Сиб. мед. обозрение. – 2003. – №4. – С. 84-86.

9. Даулбаева А.А., Байзакова Г.Т. Влияние озона на чувствительность микроорганизмов к антибиотикам // Стоматология. – 2003. – №2. – С. 36-38.

10. Канцалиев Н.Б., Теузов А.А., Базиев А.М. Применение кровесберегающих технологий в абдоминальной хирургии // Хирургия. – 2007. – №2. – С. 38-41.

11. Конторщикова К.Н. Лабораторные алгоритмы для оценки безопасности и эффективности озонотерапии // Клинич. лабораторная диагностика. – 2001. – № 10. – С.42.

12. Конторщикова К.Н., Перетягин С.П. Закономерность формирования адапционно-приспособительных механизмов гомеостаза при системном воздействии низкими дозами озона // Нижегородский мед. журн. (озонотерапия). – 2005. – № 2. – С. 17-18.

13. Лаберко Л.А., Кузнецов Н. А., Родоман Г. В. и др. Индивидуальный прогноз тяжести течения послеоперационного периода и исхода распространенного перитонита // Хирургия. – 2005. – №2. – С. 29-33.

14. Лаберко Л. А., Кузнецов Н. А., Аронов Л.С. Коррекция проявлений синдрома энтеральной недостаточности при распространенном перитоните // Хирургия. – 2004. – №9. – С. 25-28.

15. Макаов А.Х., Теуов А.А., Базиев А.М. Медицинский озон в лечении острого перитонита // Озон в биологии и медицине: матер. первой украинско-русской науч.-практич. конф. – Одесса, 2003. – С. 80-82.

16. Мумладзе Р.Б., Васильев И.Т., Якушин В.И. Актуальные вопросы диагностики и лечения послеоперационного перитонита и их решение в условиях современной клиники // Анналы хирургии. – 2008. – №5. – С. 46-52.

17. Мумладзе Р.Б., Васильев И.Т., Яковлев В.Н. Озонотерапия в коррекции свободнорадикальной и ферментной активности у больных перитонитом // Клиническая анестезиология и реаниматология. – 2009. – Т. 6, №1. – С.12-19.

18. Пархисенко Ю.А., Глухов А.А., Андреев А.А. Применение методов пристеночно-полостной озоновой санации кишечника в комплексном лечении абдоминального сепсиса // Нижегородский мед. журн. (озонотерапия). – 2005. – № 2. – С. 154-155.

19. Пыргарь Б.П., Таку В.И., Басараб Е.С. Применение озонированного физиологического раствора в составе комплексной инфузионной терапии при разлитом перитоните // Озон в биологии и медицине: матер. первой украинско-русской науч.-практич. конф. – Одесса, 2003. – С. 82-83.

20. Родоман Г.В., Лаберко Л.А., Оболенский В.Н., и др. Озонотерапия в лечении больных с хирургической инфекцией // Рос. мед. журн. – 1999. – №4. – С. 32-36.

21. Родоман Г.В., Лаберко Л.А., Оболенский В.Н. и др. Способы повышения эффективности методов озонотерапии в клинике хирургических болезней // Современные проблемы практической хирургии: сб. трудов научно-практич. конф. – М., 2000. – С. 32-38.

22. Рябов А.А. Применение комбинированной озонотерапии в комплексном лечении распространенного гнойного перитонита: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. – Красноярск, 2004. – 25 с.

23. Седов В.М., Избасаров Р.Ж., Стрижелецкий В.В. и др. Программированная санационная лапароскопия в лечении перитонита // Вестн. хирургии им. И.И.Грекова. – 2008. – №1. – С. 88-91.

24. Семенов С.В., Снигоренко А.С., Кудрявцев Б.П. Озонотерапия общего перитонита // Озон и методы эфферентной терапии в медицине. – 2000. – №5. – С. 72-73.

25. Семенов С.В., Казаков Н.Т. Озонотерапия в интенсивной терапии разлитого перитонита // Нижегородский мед. журн. (озонотерапия). – 2003. – № 3. – С. 166-167.

26. Снигоренко А.С., Мартынов А.К. Программные видеолапароскопические озоновые санации брюшной полости в комплексном лечении общего перитонита // Эндоскопическая хирургия. – 2009. – №1. – С.93-94.

27. Шамсиев М.А., Атакулов Д.О., Юсупов Ш.А. и др. Экспериментальное изучение влияния озона на течение перитонита и спайкообразование // Детская хирургия. – 2000. – №6. – С. 22-25.

28. Adrie C., Pinsky M.R. The inflammatory balance in human sepsis // Intensive Care Med. – 2000. – Vol. 26, №4. – P. 364-375.

29. Bocci V., Luzzi E., Corradeschi F. et al. Studies on the biological effects of ozone: evaluation of immunological parameters and tolerability in normal volunteers receiving ambulatory autohaemotherapy // Biotherapy. – 1994. – Vol.7, № 2. – P. 83-90.

30. Bocci V. Ozonotherapy today // Ozone in Medicine: Proceedings of the 12th World Congress of international Ozone Association. – 1995. – Vol.3. – P.13-27.
31. Calandra T., Cohne J. The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit // Critical Care Medicine. – 2005. – Vol. 33. – P. 1538-1548.
32. Cataldo F., Gentilini L. Chemical kinetics measurements on the reaction between blood and ozone. // Int. J. Biol. Macromol. – 2005. – Vol. 1-2. – P. 62-65.
33. Groeneveld A.B., Tacx A.N., Rossin R. et al. Circulating inflammatory mediators predict shock, and mortality in febrile patients with microbial infection // Clin. Immunol. – 2003. – Vol. 106, №2. – P. 106-112.
34. Koperna T., Schulz F. Relaparotomy in peritonitis: prognosis and treatment of patients // World J. Surg. – 2000. – Vol. 24, №1. – P. 32-37.
35. Koulaouzidis A., Bhat S., Karagiannidis A. et al. Spontaneous bacterial peritonitis // Postgraduate Medical Journal. – 2007. – Vol. 7, №4-6. – P.39-43.
36. Madej P., Antoszewski Z., Madej J.A. Ozonotherapy // Mater. Med. Pol. – 1995. – Vol. 8, №5. – P. 379-383;
37. Marshall J.C., Vincent J.L., Fink M.P. et al. Measures, markers, and mediators: toward a staging for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable // Crit. Care Med. – 2003. – Vol. 31. – P. 1560-1567.
38. Meisel C., Schefold J.C., Pischowski R. et al. Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor to Reverse Sepsis-associated Immunosuppression // Am. J. of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2009. – Vol. 180. – P. 640-648.

39. Wilson S.E. Impact an anatomical site on bacteriological and clinical outcome in the management of intra-abdominal infections // Am. Surg. – 1998. – Vol. 64, №5. – P. 402-407.

© ДРЫГАНОВА М.Б., МАРТЫНОВА Г.П., КУРТАСОВА Л.М.

УДК 616.988.55-02-053.2:578.825.13

ИНФЕКЦИОННЫЙ МОНОНУКЛЕОЗ, ВЫЗВАННЫЙ ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА-БАРР У ДЕТЕЙ: КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАЛЛЕЛИ

М.Б. Дрыганова, Г.П. Мартынова, Л.М. Куртасова

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого, ректор – д.м.н., проф. И. П. Артюхов; кафедра детских инфекционных болезней с курсом ПО, зав. – д.м.н., проф. Г. П. Мартынова, кафедра клинической иммунологии, зав. – д.м.н., проф. Н. И. Камзалакова.

***Резюме.** В обзоре представлены современные сведения об иммунологических особенностях инфекционного мононуклеоза ВЭБ-этиологии у детей. Установлена взаимосвязь клинических проявлений заболевания и иммунологических механизмов реагирования при инфекционном процессе.*

***Ключевые слова:** инфекционный мононуклеоз, иммунитет, вирус Эпштейн-Барр.*

Дрыганова Мария Борисовна – ассистент каф. детских инфекционных болезней с курсом ПО; тел. 8(391)2243295.

Мартынова Галина Павловна – д.м.н., проф. зав. каф. детских инфекционных болезней с курсом ПО; тел. 8(391)2243295.

Куртасова Людмила Михайловна – д.м.н., проф. каф. клинической иммунологии; тел. 8(391) 2201552.

На современном этапе развития медицинской науки инфекционный мононуклеоз (ИМ) продолжает оставаться актуальной проблемой педиатрической практики [1, 2, 4, 6]. Это обусловлено, в первую очередь, влиянием ВЭБ-инфекции на иммунную систему [4, 5, 7, 10]. Установлена способность вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) блокировать и обходить многие уровни иммунной защиты и успешно модифицировать иммунный ответ

человека [8, 10, 13]. Учитывая эволюционно сложившийся тропизм герпесвирусов, в том числе ВЭБ, к иммунокомпетентным клеткам и эпителию слизистой оболочки респираторного тракта, можно полагать, что инфицирование ими может снижать активность иммунокомпетентных клеток, факторов местной иммунной защиты дыхательных путей, а это способствовать развитию рецидивов и неблагоприятных исходов заболевания [1, 7, 13, 17, 19, 25].

Данные многих исследований свидетельствуют, что перенесенная ВЭБ-инфекция является одним из факторов риска нарушения иммунологической реактивности [4, 5, 7, 13, 15, 16, 18, 20, 21, 23].

До недавнего времени ИМ, вызванный ВЭБ, считался самоограничивающимся заболеванием, так как основным клинико-патогенетическим проявлением этой инфекции является доброкачественный лимфопролиферативный процесс [2, 3, 6, 9, 14, 18, 24]

Однако на современном этапе иммунологами накоплен достаточный материал, освещающий вопросы иммунопатологии и иммунорегуляции при ВЭБ-инфекции, что заставило пересмотреть отношение к этому заболеванию, как к абсолютно доброкачественному и доказать возможность его затяжного и хронического течения [4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 18, 25].

Предположение о доброкачественности ИМ, обусловленного ВЭБ, которая признается преобладающим большинством исследователей, основано на том, что острый период заболевания в большинстве случаев заканчивается клинически благополучно [1, 2, 6, 14, 16, 18]. Как правило, регистрируется обратное развитие основных клинических симптомов: завершение ангинозного периода, купирование признаков инфекционного токсикоза, таких как бледность кожных покровов, вялость, рвота, снижение аппетита, нормализуется температурная реакция. По завершении стационарного лечения у большинства детей значительно уменьшаются проявления поражения лимфоидного аппарата – шейный лимфаденит, полиадения, изменения со стороны носоглотки, гепатолиенальный синдром, отмечается

относительная нормализация гематологических изменений. И, тем не менее, по данным Л. А. Гульман с соавт. [6], около двух третей больных на момент выписки из стационара имеют остаточные проявления заболевания, которые касаются чаще всего изменений со стороны лимфатической системы и печени. Умеренное увеличение лимфоузлов шейной группы отмечается практически у всех реконвалесцентов ИМ, а около 20 % больных, по данным В.В. Фомина с соавт. [24], к концу года имеют объективное увеличение печени, не связанное с какой-либо иной гастроэнтерологической патологией. Ряд авторов определяют поражение печени при ИМ как специфический вирусный гепатит, выдвигая необходимость длительной диспансеризации для определения значения этого заболевания в формировании хронического гепатита [22, 26, 28, 29, 31, 34, 38, 42, 45]. Сведения об остаточных явлениях в виде астенического синдрома, учащения острых респираторных вирусных инфекций, переход детей после перенесенного ИМ в группу часто болеющих встречаются еще в литературе 80-х годов XX века [24], однако объяснить, какие механизмы способствуют самоограничению болезни, как осуществляется иммунологический контроль над заболеванием, стало возможным только с введением в клиническую практику современных методов иммунологического обследования [4, 8, 12, 15, 16, 17, 20].

На современном этапе схему иммунопатогенеза ИМ, вызванного ВЭБ, можно представить следующим образом. Вирус Эпштейна-Барр, обработанный фагоцитарными клетками, адсорбируется на В-лимфоцитах, не разрушая инфицированные клетки, а вызывая их размножение. Основной механизм уничтожения инфицированных В-лимфоцитов – это образование специфических цитотоксических клеток, способных распознавать инфицированные лимфоциты. Однако этот механизм отнюдь не совершенен; он, со своей стороны, вызывает значительные иммунопатологические изменения. Во-первых, при интенсивном распаде В-лимфоцитов выделяются липопротеиды, обладающие выраженными пирогенными свойствами и оказывающие токсическое действие на печень, во-вторых, из разрушенных

клеток выделяется в кровотоки значительное количество антигена вируса, и происходит новое заражение незадействованных в патологическом процессе В-лимфоцитов [24, 27, 30, 35, 39, 40, 41, 44]. В остром периоде ИМ в крови больных значительно возрастает количество Т-лимфоцитов, обладающих супрессорными свойствами, по сравнению с Т-хелперами [4, 12, 15, 16, 17]. Супрессорное воздействие Т-лимфоцитов распространяется на В-лимфоциты: таким образом, происходит торможение индуцированной ВЭБ пролиферации лимфоцитов. Возможно их подавляющее воздействие и на Т-хелперное звено иммунитета, что объясняет снижение количества последних в остром периоде болезни. Результатом процентного снижения Т-хелперов, является значительное снижение индекса дифференцировки T_H/T_C [4, 12, 17]. Особенностью иммунологических реакций при ИМ является склонность их к системному поражению, нарушение процессов дифференцировки, дисрегуляция, что определяет иммунорегуляторный дисбаланс острого периода болезни [9]. $CD8^+$ – лимфоциты распознают и разрушают инфицированные вирусом клетки, что способствует ограничению заболевания и в конечном итоге клиническому выздоровлению. Низкие количества $CD8^+$ – лимфоцитов при ИМ косвенно свидетельствуют об изменении характера реагирования иммунной системы, а у больных регистрируется вялое, затяжное течение болезни с длительным периодом реконвалесценции и осложнениями [12, 15, 17]. Зачастую в субпопуляциях Т-лимфоцитов происходит нарастание абсолютного количества цитотоксических клеток, однако при увеличении супрессорной активности не происходило снижения уровня Т-лимфоцитов с хелперной активностью. Подобная разбалансированность в регуляции иммунного ответа приводит к длительным иммунологическим нарушениям и способствует затяжному, негладкому течению заболевания [9, 12, 15].

В остром периоде ИМ в результате антигенного раздражения развивается лимфопролиферативный процесс, отражением которого является увеличение размеров иммунокомпетентных органов и числа Т-лимфоцитов [32, 33].

Таким образом, отмечается параллелизм между формой тяжести заболевания и гематологической картиной, представленной в основном воспалительными изменениями с наличием атипичных мононуклеаров, которые и представляют собой В-лимфоциты, иммортилизованные ВЭБ. Чем тяжелее форма болезни, тем значительнее выражены изменения крови [24]. Принято считать гематологическим признаком заболевания увеличение числа атипичных мононуклеаров в лейкограмме свыше 10 %. По современным представлениям, особенностью ИМ у детей дошкольного возраста в последние годы является умеренная выраженность общей мононуклеарной реакции по анализам периферической крови, при этом количество атипичных мононуклеаров может составлять менее 10 %. [2]. Однако в данном случае может иметь значение позднее поступление больного в стационар, а также частота и кратность взятия анализов крови на исследование [24].

Симптоматика ИМ по сути, представляет собой неспецифическую клинически манифестную реакцию ретикулоэндотелиальной системы на инфекционный процесс, развивающуюся при взаимодействии макроорганизма с различными патогенами [9]. В. Ф. Фомин с соавт. отмечают прямо пропорциональную зависимость между числом Т-лимфоцитов и степенью увеличения лимфатических узлов и паренхиматозных органов. Этот факт убедительно свидетельствует о единстве механизмов поражения лимфоидно-ретикулоэндотелиальной системы при ИМ, в том числе, и лимфоидно-ретикулярной системы печени. Гепатомегалия является одним из характерных симптомов ИМ, однако единого мнения о характере поражения печени и длительности этих изменений нет. По данным Л. А. Гульман с соавт. [6], у преобладающего большинства больных ИМ наблюдается гепатолиенальный синдром с преимущественным увеличением печени, нежели селезенки.

Поражение печени, вызванное ВЭБ, представлено широким спектром гистологических и клинических проявлений от гепатита до лимфопролиферативных поражений и даже лимфомы [38]. С помощью

гибридизации «in situ», иммуноблотинга и ПЦР в гепатоцитах доказана роль ВЭБ в формировании ВЭБ-ассоциированных заболеваний печени [36, 37, 42, 43]. Есть мнение, что ВЭБ не обладает прямым цитопатическим действием на печень, однако разрушение гепатоцитов вызывается токсическим действием свободных радикалов, участвующих в перекисном окислении липидов. У пациентов с ИМ обнаруживаются аутоантитела к ферменту супероксид-дисмутазе, нейтрализующее их антиоксидантное действие. В результате свободные радикалы аккумулируются в гепатоцитах, вызывая деструкцию клеток и развитие холестаза [22]. Не менее значимы иммунологические механизмы в формировании реактивных гепатитов при ИМ. Существенное значение имеет нарушение количества иммунокомпетентных клеток, а именно, Т-хелперов, при этом аутоиммунный механизм поражения печени не является ведущим, что подтверждается высоким уровнем Т-супрессорной популяции лимфоцитов [24]. Установлено, что при желтушных формах ВЭБ-гепатита ДНК возбудителя выявляется преимущественно в CD3+, CD4+ и CD8+ - лимфоцитах, тогда как при инфекционном мононуклеозе у пациентов без желтухи в основном инфицированы В-лимфоциты периферической крови, что указывает на возможное участие Т-лимфоцитов в развитии тяжелых форм острого ВЭБ-гепатита [29, 31].

Таким образом, несмотря на то, что желтушные формы ВЭБ-инфекции встречаются редко, а лабораторные изменения при среднетяжелой форме ИМ характеризуются, как правило, повышением аминотрансфераз при нормальном содержании фракций билирубина, морфологические изменения в ткани печени характеризуются изменениями, типичными для острого гепатита и могут сопровождаться холангитом и эндотелиитом [22, 38]. Можно сказать, что регистрируемые в клинической практике объективные изменения печени при ИМ представляют собой лишь вершину айсберга, а воздействие ВЭБ на печень не ограничивается самолимитирующимся процессом [22].

Итак, инфицирование В-клеток в остром периоде ИМ влечет за собой нарушение баланса клеточной популяции лимфоцитов. Однако иммунные нарушения при ИМ носят комплексный характер, они касаются как клеточного, так и гуморального звеньев иммунитета [9, 12, 13, 15]. Поражение В-клеток приводит и нарушению формирования гуморального иммунитета. При этом антитела являются преимущественно лишь свидетелями иммунного ответа на вирус, а как вируснейтрализующие работают только в случае, когда вирус в результате литического варианта его репродукции (при гибели инфицированной клетки) распространяется от одной клетки к другой. В большинстве же случаев герпесвирусам удается распространяться из клетки в клетку по цитоплазматическим мостикам и избегать действия нейтрализующих антител [13]. Нам встретились сведения о незначительности изменений показателей гуморального иммунитета у больных ИМ, в связи с тем, что именно состояние клеточного иммунитета определяет как исход первичного инфицирования, так и частоту и направленность рецидивов заболевания [15]. Однако по другим данным, при ИМ повышается уровень иммуноглобулинов всех пяти классов, причем отмечается поликлональная природа активации их синтеза в остром периоде болезни [24]. Выявлено, что пик повышения антител регистрируется после пика гематологических и клинических признаков инфекционного мононуклеоза. В состав иммунных комплексов, образовавшихся в результате взаимодействия антиген-антитело входит IgM, что затрудняет их фагоцитоз; этому способствует наличие крупномолекулярных белков в их составе и низкий уровень гранулоцитов в периферической крови. Следствием этого является нарушение элиминации их из кровяного русла, а дальнейшая их циркуляция влечет за собой выделение антигена и компенсаторное увеличение лимфоцитов, что поддерживает персистенцию инфекции и предполагает возможность хронического течения заболевания [24, 43]. Особенность течения ИМ заключается не только в длительности периода реконвалесценции и наличии остаточных явлений, но и возможность

затяжных, рецидивирующих и хронических форм болезни. Клиническое выздоровление детей в периоде реконвалесценции не сопровождается восстановлением иммунного баланса в течение длительного времени, отмечено, что у детей, перенесших ИМ, не отмечается полного восстановления соотношения гранулоцитарных и мононуклеарных клеток и основных субпопуляций лимфоцитов. У пациентов, с вышеописанными изменениями в иммунном статусе, в клинической картине отмечаются умеренные симптомы интоксикации, лимфаденопатия шейных лимфоузлов, генерализованный лимфаденит, гипертрофия небных миндалин, повышается частота острых респираторных вирусных заболеваний [24].

Таким образом, изменение показателей гуморального и клеточного звеньев иммунитета в остром периоде ИМ, пожизненная персистенция ВЭБ в организме человека, приводит в катамнезе к значительному снижению уровня Т-лимфоцитов за счет их хелперной популяции, вторичному нарушению гуморального иммунитета, что наряду с нейтропенией влечет за собой учащение бактериальных и вирусных инфекций и отражает суть заболевания как болезни иммунной системы [24, 36].

На современном этапе новые терапевтические подходы к лечению ИМ обусловлены иммунологическими нарушениями, характерными для данного заболевания. Наличие нарушений со стороны иммунной системы требует назначения дифференцированной иммунокоррекции в зависимости от ведущих механизмов их формирования [3, 4, 5].

INFECTIOUS MONONUCLEOSIS CAUSED BY THE EPSTEIN-BARR VIRUS IN CHILDREN: CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL PARALLELS

M.B. Dryganova, G.P. Martynova, L.M. Kurtasova

Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky

Abstract. The review presents the data about immunological peculiarities of EBV mononucleosis in children. The relationship between clinical symptoms and immunological mechanism of reaction during infectious processes is revealed.

Key words: infectious mononucleosis, immunity, Epstein-Barr virus.

Литература

1. Авдеева М.Г., Намитокон Х. А., Полянский А. В. и др. Особенности современного течения инфекционного мононуклеоза у взрослых // Инфекционные болезни. – 2009. – Т. 7, № 2. – С. 22-25.
2. Белан Ю.Б., Михайлова Т. А. Значение клинических и лабораторных данных в дифференциальной диагностике инфекционного мононуклеоза // Детские инфекции. – 2008. – №1. – С. 32-35.
3. Боковой А.Г. Инфекционный мононуклеоз – болезнь или синдром? // Детские инфекции. – 2003. – №1. – С. 66-68.
4. Боковой А.Г., Домрачева М.Е. Клиническое значение иммунологических показателей при инфекционном мононуклеозе у детей // Детские инфекции. – 2006. – №3. – С. 18-22.
5. Боковой, А.Г. Роль герпесвирусных инфекций в формировании контингента часто болеющих детей // Детские инфекции. – 2007. – №3. – С. 3-7.
6. Гульман Л.А., Куртасова Л.М., Андреева А.А. Клинико-серологические критерии инфекционного мононуклеоза у детей // Детские инфекции. – 2004. – №3. – С.27-30.
7. Егорова Н.Ю., Гусева Л.Н., Гусева Н.А. и др. Значение маркеров герпетических вирусов для оценки состояния здоровья детей // Детские инфекции. – 2008. – №2. – С. 16-21.
8. Железникова Г.Ф. Иммунологический прогноз течения ВЭБ-инфекции у детей // Rus. J. Immunol. – 2004. – Vol. 9, № 1. – P. 188.

9. Зайцева И.А., Хмилевская С.А., Бережнова И.А. Инфекционный мононуклеоз у детей // Детские инфекции. – 2004. – №3. – С. 65 – 68.
10. Иванова В.В., Родионова О.В., Аксенов О.А. и др. Инфекционный мононуклеоз: клиника, патогенез, новое в диагностике и терапии // Инфекционные болезни. – 2004. – Т.2, №4. – С.5-12.
11. Иванова В.В., Шилова И.В., Симованьян Э.Н. Новые данные об инфекционном мононуклеозе. // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. – 2006. – № 6. – С. 44-51.
12. Иванова В.В., Железникова Г.Ф., Шилова И.В. Состояние клеточного и гуморального иммунитета при инфекциях у детей и его регуляция с помощью иммуномодуляторов // Противовирусная терапия инфекционных болезней детского возраста / под редакцией М.Г. Романцова, Т.В. Сологуб. – М., 2006. – С. 4-18.
13. Канн Н.Ю. Значение персистирующей герпесвирусной инфекции в формировании вторичного иммунодефицита у часто болеющих детей/ Детские инфекции. – 2008. – №2. – С. 64-66.
14. Кашуба Э.А. Дифференциальная диагностика мононуклеозоподобного синдрома при инфекционных заболеваниях у детей // Детские инфекции. – 2006.- №4. – С. 70-73.
15. Кельцев В.А., Петрова Е.В., Санталова Г.В. Состояние иммунной системы у детей с инфекционным мононуклеозом и обоснование иммунокорректирующей терапии // Детские инфекции. – 2004. – №3. – С.15-20.
16. Кельцев В.А., Гребенкина Л.И., Петрова Е.В. Функциональное состояние и взаимосвязь иммунной и эндокринной систем у больных Эпштейн-Барр вирусным мононуклеозом // Детские инфекции. – 2005. – №1 – С.29-32.
17. Корсакова И. И. Основные параметры иммунного статуса у лиц с герпетической и цитомегаловирусной инфекциями // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2004. – № 3. – С. 32-34.

18. Краснов В.В., Шиленок А.И., Кузенкова Л.А. Инфекционный мононуклеоз. Клиника, диагностика, современные принципы лечения / пособие для врачей. – СПб., Нижний Новгород, 2003. – 44 с.
19. Кудряшова И.А., Галимзянов Х.М., Полунина О.С. Клинико-иммунологические особенности течения внебольничной пневмонии на фоне скрытых герпес-вирусных инфекций // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2008. – № 5. – С. 54-58.
20. Левина А.С., Железникова Г.В., Иванова В.В. и др. Эффективность иммунокорректирующей терапии при инфекционном мононуклеозе у детей // Детские инфекции. – 2009. – № 1. – С. 60-63.
21. Симованьян Э.Н., Денисенко В.Б., Григорян А.В. Часто болеющие дети: оптимизация программы лечения // Педиатрия. – 2007. – Т. 86. – № 4. – С. 79-85.
22. Смирнов А.В., Чуелов С.Б., Россина А.Л. Современное представление о гепатитах, вызванных вирусами семейства герпеса // Детские инфекции. – 2008. – №3. – С. 3-13.
23. Феклисова Л.В., Савицкая Н.А., Каражас Н.В. Клинико-лабораторная оценка обнаружения маркеров оппортунистических инфекций у детей, больных ОРЗ с обструкцией дыхательных путей // Детские инфекции. – 2008. – №4. – С. 13-17.
24. Фомин В.В. Клиническая иммунология детских инфекций / Свердловск: Изд-во Урал. ун-та, 1988. – 336 с.
25. Харламова Ф.С., Егорова Н.Ю., Гусева Л.Н. и др. Вирусы семейства герпеса и иммунитет // Детские инфекции. – 2006. – Т. 5, №3. – С. 3-10
26. Ader F. Fulminant Epstein-Barr virus (EBV) hepatitis in a young immunocompetent subject // Med. Mal. Infect. – 2006. – Vol. 36, №7. – P. 396-398.
27. Amoli M. EBV Immortalization of human B lymphocytes separated from small volumes of cryo-preserved whole blood // International Journal of Epidemiology. – 2008. – Vol. 37, № 1. – P. 141.

28. Chiba T. Fatal chronic active Epstein-Barr virus infection mimicking autoimmune hepatitis // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2004. – Vol. 16, № 2. – P. 225-228.
29. Crum N. F. Epstein-Barr virus hepatitis: case series and review // *South. Med. J.* – 2006. – Vol.5. – P.74-76.
30. Dong N. Cloning and expression of two human recombinant monoclonal Fab fragments specific for EBV viral capsid antigen // *International Immunology.* – 2007. – Vol. 19, № 3. – P. 331.
31. Dumortier J. EBV-induced fulminant hepatic failure: favorable outcome after liver transplantation // *Gastroenterol. Clin. Biol.* – 2007. – Vol. 31. – P. 725-728.
32. Glenna B. W. Mononucleosis and Epstein-Barr Virus Infection // Last Updated. – 2003. – Vol. 8. – P. 489-497.
33. Grotto I. Clinical and laboratory presentation of EBV positive infectious mononucleosis in young adults // *Epidemiology and Infection.* – 2003. – Vol. 131, № 1. – P. 683-689.
34. Hinedi T.B., Koff R.S. Cholestatic hepatitis induced by Epstein-Barr virus infection in an adult // *Dig. Dis. Sci.* – 2003. – Vol. 48. – P. 539-541.
35. Huang J. Regulation of EBV lytic replication in epithelial cells. // *Dissertation Abstracts International.* – 2004. – Vol. 66, № 4. – P. 1896.
36. Kawa K. EBV associated diseases in humans // *Int. J. Hematol.* – 2000. – Vol. 71. – P. 108-117.
37. Li W. Epstein-Barr virus in hepatocellular carcinogenesis // *World J. Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 10, №23. – P. 3409-3413.
38. Mendez-Sanchez N., Aguilar-Dominguez C., Chavez-Tapia N.C. Hepatic manifestations of Epstein-Barr viral infection // *Ann. Hepatol.* – 2005. – Vol. 4, №3. – P. 205-209.
39. Molesworth S.J. EBV gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells // *J. Virology.* – 2000. – Vol. 74. – P. 6324-6332.

40. Mrazek H. Subtractive hybridization identifies novel differentially expressed ncRNA species in EBV-infected human B cells // *Nucleic Acids Research*. – 2007. – Vol. 35, № 10. – P. 73.
41. Prota A.E. The crystal structure of human CD21: implications for EBV and C3d binding // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – Vol. 99. – P. 10641-10646.
42. Si M.W. Hepatocellular lymphogepithelioma-like carcinoma associated with Epstein-barr virus: a hitherto unrecognized entity // *Diagn. Mol. Pathol*. – 2004. – Vol. 13, №3. – P. 183-189.
43. Wakiguchi L. Overview of Epstein-Barr virus-associated diseases in Japan // *H. Crit Rev Oncol Hematol*. – 2002. Dec. – Vol. 44, №3. – P. 193-202.
44. Xue A. Complexities associated with expression of Epstein-Barr virus (EBV) lytic origins of DNA replication // *Nucleic Acids Research*. – 2007. – Vol. 35, № 10. – P. 3391.
45. Yuge A. Persistent hepatitis associated with chronic active Epstein-Barr virus infection // *Pediatr. Infect. Dis. J*. – 2004. – Vol. 23. – P. 74-76.

© ЧЕРНОВ В. Н., ШАРАЙКИНА Е. П., МАНАШЕВ Г. Г.

УДК 616.314.17..612.181

МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОЕ РУСЛО ПАРОДОНТА

В. Н. Чернов, Е. П. Шарайкина, Г. Г. Манашев

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф.

Войно-Ясенецкого, ректор – д.м.н., проф. И.П. Артюхов;

кафедра анатомии человека, зав. – д.м.н., проф. В. Г. Николаев, кафедра

ортопедической стоматологии, зав. – д.м.н., проф. Г. Г. Манашев.

***Резюме.** В обзоре представлены современные исследования по использованию лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), ее роль в оценке витальности пульпы при травме зубов, реваскуляризации при реплантации зубов, для оценки воздействия на кровообращение в пульпе ортодонтических сил и некоторых материалов, используемых в клинике для покрытия пульпы. Однако, несмотря на многочисленные литературные данные, практически отсутствует информация о различиях микроциркуляторного русла у мужчин и у женщин и при зубочелюстных аномалиях.*

***Ключевые слова:** лазерная доплеровская флоуметрия, пародонт, микроциркуляторное русло.*

Чернов Владимир Николаевич – ассистент каф. ортопедической стоматологии КрасГМУ; e-mail: chernovorstom@mail.ru.

Шарайкина Евгения Павловна – д.м.н., проф. кафедры анатомии человека КрасГМУ; тел. 8(391) 2201409.

Манашев Георгий Геннадьевич – д.м.н., проф., зав. каф. ортопедической стоматологии КрасГМУ; e-mail: manashev1@ya.ru.

Заболевания пародонта являются одной из наиболее важных проблем современной стоматологии [1]. Ведущими пусковыми механизмами

заболеваний пародонта являются сосудистые сдвиги в виде нарушений микроциркулярного русла пародонта и развитие иммунопатологических реакций в его тканях [5]. По данным экспертов ВОЗ (1990) - у лиц в возрасте от 35 до 44 лет уровень заболеваний пародонта составляет от 65 до 98%, а в возрасте 13 – 19 лет - от 55 до 95%.

Впервые в 1940 году обосновал сосудистую концепцию патогенеза пародонтоза А. И. Евдокимов [2]. На современном этапе данная концепция обогатилась обширным фактическим материалом, полученным с помощью таких методов исследования сосудистого русла, как реография, фотоплетизмография, полярография, радиоизотопные методы. В последние десятилетия микроциркуляцию сосудов пародонта изучают методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) [3, 6, 9, 37, 54].

ЛДФ, основанная на измерении доплеровской компоненты в спектре отраженного лазерного сигнала, рассеянного на движущихся эритроцитах, позволяет неинвазивно измерять величину перфузии ткани кровью, то есть определять величину потока эритроцитов в зондируемом лазерным излучением объеме ткани [1, 2, 38].

В дополнение к амплитудно-частотному анализу ритмов кровотока проведение различных функциональных тестов позволяет более точно выявить нарушение микроциркуляции [53, 46, 47].

Результаты ЛДФ основаны на измерении скорости потока жидкости с помощью гелий-неонового лазерного спектрометра, анализ которых провели Yeh и Cummins в 1964 г., но научное обоснование частотной составляющей сигнала дали F. Durst и J. H. Whitelaw в 1971 году [28]. Основной целью применения ЛДФ стала оценка возможности проведения неинвазивной диагностики витальности пульпы при травме зубов, состояния их кровоснабжения после остеотомии верхней челюсти по *Le Fort I* и изучение механизмов регуляции кровотока в пульпе. В своих исследованиях в 2004 году по оценке витальности пульпы при травме постоянных верхних резцов у 52 детей R. Emshoff с соавт. пришли к выводу, что диагностика достоверна, если

различие в результатах ЛДФ травмированного зуба и интактного у того же пациента будет не менее 3 перфузионных единиц [17].

Отечественные ученые использовали метод ЛДФ в оценке микроциркуляторных изменений в пульпе зуба при жевательных нагрузках [7, 8]. В 2002 году В. В. Белокопытова разработала критерии оценки степени микроциркуляторных нарушений при заболеваниях пародонта [4].

Использование ЛДФ в эксперименте на собаках при реплантации зубов [52] и в клинике [29] при травме позволило наблюдать реваскуляризацию пульпы, что дало основание говорить о возможности диагностики гибели пульпы в 95% случаев. С помощью ЛДФ А. L. Ritter с соавт. [39] в 2004 году в эксперименте оценивали эффективность антибиотикотерапии на реваскуляризацию пульпы после реплантации зубов, а в 2003 году Н. Strobl с соавт. [45] в клинике убедились в том, что потеря чувствительности реплантационных зубов делает ЛДФ важным клиническим диагностическим методом.

Ряд авторов использовали ЛДФ при остеотомии верхней челюсти, чтобы оценить ее влияние на кровообращение в пульпе верхних резцов и их витальность. D. S. Ramsay с соавт. [34] сравнивали результаты, связанные с состоянием кровоснабжения пульпы в нижнем клыке, и нашли существенные различия. Подобные изменения наблюдали и другие авторы [15, 21, 32]. При этом изменения в кровоснабжении пульпы сопровождались позитивными сдвигами в данных электроодонтодиагностики [42]. При аналогичных условиях J. G. Buckley с соавт. [13] оценивали методические ошибки при проведении ЛДФ с помощью ручного держателя датчика и с помощью шины.

В Китае о первых опытах по использованию ЛДФ было сообщено в 2000 году Х. Ху и Y. Li. Авторы заключили, что ЛДФ обладает большими потенциальными возможностями в изучении кровотока в пульпе зуба [50].

Большое количество работ было посвящено изучению достоверности результатов ЛДФ. R. D. Fratkin с соавт. [19] проводили ЛДФ первого резца у детей до и после пульпэктомии и нашли существенные отличия, которые позволили заключить, что с помощью ЛДФ можно определять наличие или

отсутствие кровотока в пульпе. А. Е. Ingolfsson с соавт. [25] применяли ЛДФ на интактных передних зубах и с некрозом пульпы и пришли к выводу, что чем меньше диаметр стекловолокна, тем метод более чувствителен к наличию некротизированной пульпы. Наряду с испытанием различного по диаметру стекловолокна, Е. М. Roebuck с соавторами [35] оценивали информативность метода ЛДФ при диагностике витальности пульпы передних зубов при различной длине волны (633 и 780 нм), а также при различных частотах фильтра (3, 15 и 22 кГц). На добровольцах 23-28 лет также испытывались различные положения ЛДФ-датчика на зубе: в верхней трети, в центре и в пришеечной области [41].

S. Mesaros с соавт. [30] оценивали возможности в диагностике витальности зуба двух лазерных доплеровских флоуметров — DRT4 (Moore

Instruments Ltd) и Laserflo BPM2 (Vasamedics). Оба прибора показали, что существуют значительные различия в величине ЛДФ-сигнала между живыми и неживыми зубами, а также до и после проведения местной анестезии. Чувствительность метода к изменениям кровоснабжения пульпы изучалась с помощью температурных проб у добровольцев. Было отмечено слабое уменьшение кровотока в пульпе при снижении прикладываемой к зубу температуры — от 33 до 5 градусов С [11]. Yamaguchi с соавт. [51] повышали температуру в зубе с помощью их облучения неодим-иттербий-алюминий-гранатовым лазером (Nd:YAG) и одновременно наблюдали усиление кровотока в пульпе на ЛДФ-граммах, получаемых с помощью низкоинтенсивного лазера. В другом исследовании было установлено, что охлаждение зуба уменьшает кровообращение в пульпе, но не останавливает его [20]. Подтверждением тому явились результаты измерения температуры на поверхности и внутри зуба, проведенные в 2004 году Е. Smith с соавт. [43] в условиях эксперимента.

Исходя из того, что ЛДФ является неинвазивной электрооптической техникой, которая позволяет полуколичественно зарегистрировать кровоток в пульпе. D. Evans с соавт. [18] использовали ЛДФ в диагностике витальности пульпы В. Norer и соавторы [31] задались целью выявить индивидуальные и

межиндивидуальные различия кровотока в пульпе, определяемые с помощью ЛДФ. Достоверное уменьшение величины ЛДФ-сигнала, которое происходит с возрастом, нашли М. Икава с соавторами [24] при исследовании центральных интактных резцов у лиц в возрасте от 8 до 75 лет.

Для изучения рассеивания света, проходящего через зуб при ЛДФ, М. Икава с соавт. [22] на удаленных первых верхних резцах размещали 2 световода. Измерения показали, что рассеивание света происходит довольно широко на обратной стороне зуба, при этом прошедший через зуб световой сигнал несет информацию о кровотоке в окружающих тканях. Исследования S. Soomro с соавт. [44] и S. Polat с соавт. [33] проводились на пациентах. Было установлено, что наложение коффердама достоверно и существенно уменьшает (на 73%) регистрируемый сигнал в интактном зубе.

В 2002 году изоляцию десны с помощью коффердама проводили Y. Sano и соавторы [40] для оценки воздействия на кровообращение в пульпе ортодонтических сил. Было установлено, что длительное воздействие ортодонтических сил значительно уменьшает кровоток в пульпе. К такому же выводу пришли М. Икава с соавт. [23].

Большой интерес представляют исследования, специально посвященные оценке влияния десны на результаты ЛДФ пульпы. При фиксации датчика в акриловой шине, его располагали на зубе в пришеечной области. При этом было соблюдено 3 условия: десна ничем не покрывалась, на нее накладывали светонепроницаемую пасту с вестибулярной поверхности, с небной и с двух сторон одновременно. Было установлено, что, когда паста находится на вестибулярной поверхности десны, уровень ЛДФ-сигнала с зуба уменьшается на 46%, когда на небной поверхности — на 10%, когда на обеих сторонах — на 63% [10]. По данным F. Csempesz и соавторов [14], кровоток в десне влияет на сигнал с пульпы зуба значительно меньше при ручной фиксации ЛДФ-датчика, чем при фиксировании его в специальном манипуляторе.

Интересные результаты были получены Т. Justus с соавт. [27] при регистрации ЛДФ-граммы с десны и пульпы верхних фронтальных зубов

между 1-й и 3-й неделями после остеотомии верхней челюсти. Оказалось, что значительное увеличение кровотока в пульпе не было связано с кровотоком в десне. К такому же выводу пришли S. Vandenwijngaert и K. Vanlerberghe, оценивая влияние заболеваний пародонта и их лечения на витальность пульпы [48]. Взаимосвязь кровотока в мягких тканях десны с кровотоком в пульпе изучали G. M. Verdickt и P. V. Abbott [49] при проводниковой и местной анестезии.

Другая группа авторов под руководством S. Polat [23] проводила ЛДФ 36 зубов у 12 пациентов, которым после местной анестезии интактные зубы депульпировали, пломбировали канал и восстанавливали зуб пломбой. Было установлено, что через 10 минут после местной анестезии уровень кровотока в пульпе снижается на 30%.

Так же с помощью ЛДФ изучались нервные механизмы регуляции кровотока. По увеличению уровня ЛДФ-сигнала при тепловом раздражении пульпы и полученной вазодилатации была подтверждена вероятность передачи раздражения с чувствительных волокон на вазомоторные по аксон-рефлексу [12].

При введении вазоактивных медиаторов была зарегистрирована с помощью ЛДФ в пульпе вазоконстрикция, степень которой зависела от дозы медиатора и вводимых затем блокаторов [45].

При использовании чувствительной и симпатической денервации было доказано, что в пульпе зуба существует вазодилатация сенсорного происхождения [16]. Введение антагонистов сенсорных нейропептидов вызывает вазодилатацию при раздражении пульпы [26]. H. Roeykens оценил с помощью ЛДФ микроциркуляцию пульпы зуба [36]. Доказано, что основными потребителями кислорода в пульпе являются одонтобласты [55, 56].

Микроциркуляторное русло в области пародонта у юношей было изучено С. Л. Бакшеевой, которая установила особенности микроциркуляции в области прикрепленной и маргинальной десны в зависимости от конституции индивида

[2]. Достоинства применения ЛДФ в стоматологической практике были оценены В. В. Алямовским и С. А. Нарыковой [1].

Таким образом, к настоящему времени ЛДФ широко используется в стоматологической практике для исследования сосудистых реакций на различные воздействия в области пародонта. Однако, несмотря на многочисленные литературные данные, практически отсутствует информация о различиях микроциркуляторного русла при аномалиях зубочелюстной системы в зависимости от пола.

BLOOD MICROCIRCULATION IN PARADENTIUM

V.N. Chernov, E.P. Sharaikina, G.G. Manashev

Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voyno-Yasenetsky

Abstract. The review presents the modern studies on application of laser Doppler fluorimetry (LDF). The paper discusses the role of LDF in: estimation of pulp vitality after teeth trauma, revascularization after teeth reimplantation, the influence of orthodontic forces and some materials used for covering of pulp on blood circulation in pulp. Despite a large amount of literature data there is practically no information about the differences of blood microcirculation in men and women with tooth and jaw abnormalities.

Key words: laser Doppler fluorimetry, paradentium, blood microcirculation.

Литература:

1. Алямовский В. В., Нарыкова С. А. Опыт применения лазерной доплеровской флоуметрии в стоматологической практике // Актуальные вопросы стоматологии. – Красноярск, 2001. – С. 75-77.
2. Бакшеева С. Л., Алямовский В. В., Нарыкова С. А. Состояние микроциркуляции в десне у юношей в зависимости от особенностей

конституции // Матер. науч.-практ. конф. российских ученых «Актуальные вопросы лазерной медицины». – Москва-Калуга, 2002. – С. 196-197.

3. Барковский В. С. Биомикроскопический метод оценки морфофункционального состояния микроциркуляторного русла пародонта // Функциональная диагностика в стоматологии: Тр. ЦНИИС. – М., 1984. – Т. 14. – С. 30-32.

4. Белокопытова В. В. Критерии оценки степени микроциркуляторных нарушений при заболеваниях пародонта: дис. ... канд. мед. наук. – М., 2002. – 126 с.

5. Киричук В. Ф., Широков В. Ю. Тромборезистентность эндотелия сосудистой стенки у больных хроническим генерализованным пародонтитом и ее динамика при комбинированной КВЧ-терапии // Стоматология. – 2004. – №4. – С. 26-29.

6. Козлов В. А. Ультразвуковая доплерография сосудов макро- и микроциркуляторного русла тканей полости рта, лица и шеи. – СПб.: Минимакс, 1999. – 22 с.

7. Колесова Н. А., Политун А. М. Значение изменения отдельных звеньев микроциркуляторного русла околозубных тканей в патогенезе пародонтоза // Терапевт. стом. – 1981. – Вып. 16. – С. 28-32.

8. Логинова Н. К., Ермольев С. Н., Троицкая Т. В. Лазерная доплерография в оценке микроциркуляторных изменений в пульпе зуба при жевательных нагрузках // Стоматология. – №1 (21). – 2007. – С. 100-101.

9. Логинова Н. К., Воложин А. И. Патофизиология пародонта (теория и практика) / Уч. - метод. пособие. – 2 -е изд. – М., 1994. – 108 с.

10. Akpinar K. E., Er K., Polat S. et al. Effect of gingiva on laserdoppler pulpal blood flow measurements // J. Endod. – 2004. – Vol. 30, № 3. – P. 138-178.

11. Andersen E., Aars H., Brodin P. Effects of cooling and heating of the tooth on pulpal blood flow // Endod-Dent-Traumatol. – 1994. – Vol. 10, №6. – P. 256-265.

12. Andrew D., Matthews B. Properties of single nerve fibres that evoke blood flow changes in cat dental pulp // *J. Physiol.* – 2002. – Vol. 542 (Pt 3). – P. 921-929.
13. Buckley J. G., Jones M. L., Hill M. et al. An evaluation of the changes in maxillary pulpal blood flow associated with orthognathic surgery // *Br. J. Orthod.* 1999. – Vol. 26. – № 1. – P. 39-84.
14. Csempesz F., Vag J., Keremi B. et al. A szajuregi kepletek keringesenek vizsgalata lezer Doppler-aramlasmerovel human egyedekben [Blood flow measurements in human oral tissues with laser Doppler flowmetry] // *Fogorv-Sz.* – 2000. – Vol. 93, № 4. – P. 115-135.
15. Emshoff R., Kranewitter R., Norer B. Effect of Le Fort I osteotomy on maxillary tooth-type-related pulpal blood-flow characteristics // *Oral Surg.* – 2000. – Vol. 89, № 1. – P. 88-178.
16. Emshoff R., Kranewitter R., Gerhard S. et al. Effect of segmental Le Fort I osteotomy on maxillary tooth type-related pulpal blood-flow characteristics // *Oral Surg.* 2000. – Vol. 89, № 6. – P. 749-801.
17. Emshoff R., Emshoff I., Moschen I. et al. Laser Doppler flow measurements of pulpal blood flow and severity of dental injury // *Int. Endod. J.* – 2004. – Vol. 37, № 7. – P. 463-470.
18. Evans D., Reid J., Strang R. et al. A comparison of laser Doppler flowmetry with other methods of assessing the vitality of traumatized anterior teeth // *Endod. Dent Traumatol.* – 1999. – Vol. 15, № 6. – P. 284-374.
19. Fratkin R. D., Kenny D. J., Johnston D. H. Evaluation of a laser Doppler flowmeter to assess blood flow in human primary incisor teeth // *Pediatr. Dent.* – 1999. – Vol. 21, № 1. – P. 53-59.
20. Goodis H. E., Winthrop V., White J. M. Pulpal responses to cooling tooth temperatures // *J. Endod.* – 2000. – Vol. 26, № 5. – P. 263-270.
21. Harada K., Sato M., Omura K. Blood-flow and neurosensory changes in the maxillary dental pulp after differing Le Fort I osteotomies // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* – 2004. – Vol. 97. – № 1. – P. 12-19.

22. Ikawa M., Vongsavan N., Horiuchi H. Scattering of laser light directed onto the labial surface of extracted human upper central incisors // J. Endod. – 1999. – Vol. 25. – № 7. – P. 483-490.
23. Ikawa M., Fujiwara M., Horiuchi H. et al. The effect of shortterm tooth intrusion on human pulpal blood flow measured by laser Doppler flowmetry // Arch. Oral Biol. – 2001. – Vol. 46, № 9. – P. 781-788.
24. Ikawa M., Komatsu H., Ikawa K. et al. Age-related changes in the pulpal blood flow measured by laser Doppler flowmetry // Dent. Traumatol. – 2003. – Vol. 19, № 1. – P. 36-40.
25. Ingolfsson A. R., Tronstad L., Hersh E. V. et al. Efficacy of laser Doppler flowmetry in determining pulp vitality of human teeth // Endod. Dent. Traumatol. – 1994. – Vol. 10, № 2. – P. 83-90.
26. Ingolfsson A. R., Tronstad L., Riva C. E. Reliability of laser Doppler flowmetry in testing vitality of human teeth // Endod. Dent. Traumatol. – 1994. – Vol. 10, № 4. – P. 185-192.
27. Justus T., Chang B. L., Bloomquist D. et al. Human gingival and pulpal blood flow during healing after Le Fort I osteotomy // J. Oral Maxillofac. Surg. – 2001. – Vol. 59, № 1. – P. 2-9.
28. Kimura Y., Wilder-Smith P., Matsumoto K. Lasers in endodontics: a review // Int. Endod. J. – 2000. – Vol. 33, № 3. – P. 173-258.
29. Lee J. Y., Yanpiset K., Sigurdsson A. et al. Laser Doppler flowmetry for monitoring traumatized teeth // Dent. Traumatol. – 2001. – Vol. 17, № 5. – P. 231-236.
30. Mesaros S., Trope M., Maixner W. Comparison of two laser Doppler system on the measurement of blood flow of premolar teeth under different pulpal conditions // Int. Endod. J. – 1997. – Vol. 30, № 3. – P. 167-241.
31. Norer B., Kranewitter R., Emshoff R. Pulpal blood-flow characteristics of maxillary tooth morphotypes as assessed with laser Doppler flowmetry // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. – 1999. – Vol. 87, № 1. – P. 88-180.

32. Ozturk M., Doruk C., Ozec I. et al. Pulpal blood flow: effects of corticotomy and midline osteotomy in surgically assisted rapid palatal expansion // J. Craniomaxillofac. Surg. – 2003. – Vol. 31, № 2. – P. 97-197.
33. Polat S., Er K., Akpınar K.E. et al. The sources of laser Doppler blood-flow signals recorded from vital and root canal treated teeth // Arch. Oral Biol. – 2004. – Vol. 49 – P. 53-60.
34. Ramsay D.S., Artun J., Bloomquist D. Orthognathic surgery and pulpal blood flow a pilot study using laser Doppler flowmetry // J. Oral Maxillofac. Surg. – 1991. – Vol. 49, № 6. – P. 564-634.
35. Roebuck E.M., Evans D.J., Stirrups D. et al. The effect of wavelength, bandwidth, and probe design and assessing the vitality of anterior teeth with laser Doppler flowmetry // Int. J. Paediatr. Dent. – 2000. – Vol. 10, № 3. – P. 213-223.
36. Roeykens H., Van-Maele G., De Moor R. et al. Reliability of laser Doppler flowmetry in a 2-probe assessment of pulpal blood flow // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. – 1999. – Vol. 87, № 6. – P. 742-750.
37. Roeykens H., Van-Maele G., Martens L. et al. A two-probe laser Doppler flowmetry assessment as an exclusive diagnostic device in a long-term follow-up of traumatized teeth: a case report // Dent. Traumatol. – 2002. – Vol. 18, № 2. – P. 86-177.
38. Riethmuller M.L., Boutier A. Laser Doppler velocimetry 40 years of history // Oral Surg. 2000. – Vol. 89, № 6. P. 367-371.
39. Ritter A.L., Ritter A.V., Murrah V. et al. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after treatment with minocycline and doxycycline assessed by laser Doppler flowmetry, radiography, and histology // Dent. Traumatol. – 2004. – Vol. 20, № 2. – P. 75-159.
40. Sano Y., Ikawa M., Sugawara J. et al. The effect of continuous intrusive force on human pulpal blood flow // Eur. J. Orthod. – 2002. – Vol. 24, № 2. – P. 159-225.

41. Sasano T., Nakajima I., Shoji S. et al. Possible application of transmitted laser light for the assessment of human pulpal vitality // *Endod. Dent. Traumatol.* – 1997. – Vol. 13, № 2. – P. 88-179.
42. Sato M., Harada K., Okada Y. et al. Blood-flow change and recovery of sensibility in the maxillary dental pulp after a single segment Le Fort I osteotomy // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* – 2003. – Vol. 95, № 6. – P. 660-664.
43. Smith E., Dickson M., Evans A.L. et al. An evaluation of the use of tooth temperature to assess human pulp vitality // *Int. Endod. J.* – 2004. – Vol. 37, № 6. – P. 374-454.
44. Soo-ampon S., Vongsavan N., Soo-ampon M. et al. The sources of laser Doppler blood-flow signals recorded from human teeth // *Arch. Oral Biol.* – 2003. – Vol. 48, № 5. – P. 353-413.
45. Strobl H., Gojer G., Norer B. et al. Assessing revascularization of avulsed permanent maxillary incisors by laser Doppler // *J. Am. Dent. Assoc.* – 2003. – Vol. 134, № 12. – P. 1597-2200.
46. Strobl H., Haas M., Norer B. et al. Evaluation of pulpal blood flow after tooth splinting of luxated permanent maxillary incisors // *Dent. Traumatol.* – 2004. – Vol. 20, № 1. – P. 36-77.
47. Strobl H., Emshoff I., Bertram S. et al. Laser Doppler flow investigation of fractured permanent maxillary incisors // *J. Oral. Rehabil.* – 2004. – Vol. 31, № 1. – P. 23-31.
48. Vandenwijngaert S., Vanlerberghe K. Influence de la maladie parodontale et de son traitement sur l'état de la pulpe // *Rev. Belge Med. Dent.* – 2000. – Vol. 55, № 4. – P. 313-320.
49. Verdickt G.M., Abbott P.V. Blood flow changes in human dental pulps when capsaicin is applied to the adjacent gingival mucosa // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* – 2001. – Vol. 92, № 5. – P. 561-566.

50. Xu X., Li Y. A preliminary study of laser Doppler technique in determining dental pulpal blood flow // *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, China.* – 2000. – Vol. 35, № 2. – P. 129-131.
51. Yamaguchi H., Kobayashi K., Sato Y. Nd:YAG laser irradiation of human dental pulp: implications as a predictor of pulp hemodynamics // *Lasers Surg. Med.* – 2000. – Vol. 26, № 3. – P. 270-276.
52. Yanpiset K., Vongsavan N., Sigurdsson A. et al. Efficacy of laser Doppler flowmetry for the diagnosis of revascularization of reimplanted immature dog teeth // *Dent. Traumatol.* – 2001. – Vol. 17, № 2. – P. 63-133.
53. Yu C.Y., Boyd N.M., Cringle S.J. et al. Agonist-induced vasoactive responses in isolated perfused porcine dental pulpal arterioles // *Arch. Oral Biol.* – 2002. – Vol. 47, № 2. – P. 99-107.
54. Yu C.Y., Boyd N.M., Cringle S.J. et al. Tissue oxygen tension and blood-flow changes in rat incisor pulp with graded systemic hyperoxia // *Arch. Oral Biol.* – 2002. – Vol. 47, № 3. – P. 239-285.
55. Yu C.Y., Boyd N.M., Cringle S.J. et al. Oxygen distribution and consumption in rat lower incisor pulp // *Arch. Oral Biol.* – 2002. – Vol. 47, № 7. – P. 529-565.
56. Yu C.Y., Boyd N.M., Cringle S.J. et al. An in vivo and in vitro comparison of the effects of vasoactive mediators on pulpal blood vessels in rat incisors // *Arch. Oral Biol.* – 2002. – Vol. 47, № 10. – P. 723-755.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© ЕРЕМЕЕВ А.В., СВЕТЛАКОВ А.В., БОЛЬШАКОВ И.Н., ШЕЙНА Ю.И.,
НЕКЛЮДОВА О.Д.

УДК 616.12:616-018:547.995.12

ВОЗМОЖНОСТЬ КАРДИОМИОЦИТАРНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В СРЕДЕ mTeSR

А.В. Еремеев, А.В. Светлаков, И.Н. Большаков, Ю.И. Шеина, О.Д.
Неклюдова

Центр репродуктивной медицины, Красноярск, рук. – к.м.н. А.В. Светлаков;
Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.
Войно-Ясенецкого, ректор – д.м.н., проф. И.П.Артюхов; кафедра оперативной
хирургии с топографической анатомией, зав. – д.м.н., проф. П.А.Самотесов;
лаборатория клеточных технологий КрасГМУ, руководитель – к.б.н. А.В.
Еремеев; Институт общей генетики им. Вавилова РАН, Москва; директор –
член-корр. РАН Н.К. Янковский; лаборатория генетических основ клеточных
технологий, руководитель – С.Л. Киселев.

***Резюме.** В представленной работе рассматривается возможность дифференцировки культивируемых на среде mTeSR стволовых эмбриональных клеток человека, пассируемых в кондиционированной среде в кардиомиоцитарном направлении.*

***Ключевые слова:** плюрипотентные клетки, маркеры плюрипотентности, кардиомиоцитарная дифференцировка, кондиционированная среда.*

Еремеев Артем Валерьевич – к.б.н., руководитель лаборатории клеточных технологий КрасГМУ; e-mail: art-eremeev@yandex.ru, тел. 8 (391)2640892.

Светлаков Анатолий Владимирович – к.м.н., руководитель Центра репродуктивной медицины, Красноярск; e-mail: krasivf@kcrm.ru.

Большаков Игорь Николаевич – д.м.н., проф. каф. оперативной хирургии с топографической анатомии КрасГМУ; тел. 8(391)2200412.

Растущие потребности в клеточных технологиях диктуются возрастающим уровнем патологий сердечно-сосудистой системы и недостатком материала для трансплантации. Идеальной моделью для трансплантации являются кардиомиоциты благодаря их физиологическим и электрохимическим свойствам. Однако получение взрослых кардиомиоцитов в достаточном количестве для эффективной трансплантации невозможно в силу ограниченных количеств этих клеток, а также их возможности к пролиферации на терминальной стадии дифференцировки. Решением этой проблемы может стать трансплантация эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), которые способны замещать нефункциональные, склерозированные клетки сердечной ткани. Трансплантация недифференцированных ЭСК может приводить к образованию тератом, в этой связи целесообразно использование коммитированных в кардиомиоциты дериватов ЭСК. Хотя, эмбриональные клетки способны к спонтанной дифференцировке в кардиомиоциты при переводе их в суспензию и росте в виде эмбриональных телец [3, 4, 5], условия культивирования, а, возможно, и индивидуальные особенности линий ЭСК существенно влияют на их способность к дифференцировке в конкретный клеточный тип. В настоящее время существуют различные способы коммитирования эмбриональных стволовых клеток к образованию кардиомиоцитов. Общей чертой всех этих методов является стадия формирования эмбриональных телец. Некоторые исследователи [4, 7, 8, 9] предлагают способ сокультивирования

эмбриональных клеток с клетками мыши. Как правило, в качестве сокультуры используют висцерально-энтодермально подобные клетки мыши (END-2), получаемые из P19 клеток эмбриональной карциномы мышей. Метод сокультивирования даёт возможность получать кардиомиоциты с высоким выходом. При выращивании эмбриональных стволовых клеток на монослое клеток END-2 С. Mummery et al. [4] наблюдали появление спонтанно пульсирующих клеток. Однако Ch. Xu et al [7] высказывает опасения, что результатом сокультивирования эмбриональных клеток с клетками животных, в том числе с клетками линии END-2, а также культивирование клеток в среде, содержащей сыворотку, может быть повышение иммуногенности клеток и заражение зоонозными агентами, что, несомненно, ограничивает возможность использования стволовых клеток в клинике. Ch.Xu et al. [7] предложил способ культивирования стволовых клеток в среде свободной от сыворотки, и включающей в себя следующие компоненты: креатин, карнитин, таурин и инсулин (CSTI-среда) [1].

Представляет интерес влияние ретиноевой кислоты на дифференцировку стволовых клеток. Ретиноевая кислота является активной формой витамина А и выполняет важные регуляторные функции во время развития зародыша. Показано, что обработка ретиноевой кислотой эмбриональных теллец, полученных из ЭСК, в концентрациях от 10^{-7} до 10^{-8} М после 5 суток приводит к ингибированию адипогенеза и миогенеза и стимулирует дифференцировку клеток сердца и гладкой мускулатуры [6]. Эффект ретиноевой кислоты в своих работах установили Ch.Xu et al. (2002) [11] и С.Vauwens et al. (2005) [1].

При помощи трансфекции клеток плазмидой, содержащей флуоресцентную метку после промотора α -MHC, было показано, что обработка этих клеток ретиноевой кислотой значительно повышает экспрессию различных сердечных маркеров, включая GATA4, Nkx2.5, α -MHC, β -MHC и ANP, а также повышает количество пульсирующих областей кардиомиоцитов. Одновременно с этим было показано, что аскорбиновая кислота также может усиливать дифференцировку эмбриональных стволовых клеток мыши в нейроны [6].

Становится очевидным, что основной задачей является разработка протокола получения кардиомиоцитарных предшественников в условиях отсутствия в среде животных компонентов (таких как сыворотка, фидер и т.п.). Одним из возможных подходов к решению данного вопроса – это использование синтетических сред как для культивирования ЭСК, так и для их дальнейшей дифференцировки. Одной из таких сред для первоначальной экспансии ЭСК является среда mTeSR компании StemcellTeq. Авторы настоящей публикации предположили, что, используя комбинацию стандартной среды ДМЕМ и mTeSR с добавлением факторов дифференцировки, можно получить кардиомиоцитарные предшественники из ЭСК в условиях, свободных от сыворотки и фидерного слоя клеток.

Материалы и методы

Эмбриональные стволовые клетки. В экспериментах по культивированию плюрипотентных клеток человека линии hESKM-05 (безфидерная animal-free линия, полученная ЦРМ г. Красноярска совместно с Институтом общей генетики РАН г. Москвы) первоначально, для наращивания биомассы, использовали основную среду mTeSR (StemcellTeq, USA) во флаконах, покрытых матригелем (StemcellTeq, USA). Пассирование ЭСК осуществляли с помощью 0,05% раствора деспазы.

Стимуляция дифференцировки ЭСК. Для стимуляции образования эмбрионидных телец ЭСК снимали деспазой, затем переносили в эмбриологическую чашку Петри (low adgesion) со средой коДМЕМ с добавлением 10% SR (Invitogen)(заменитель сыворотки), 100 мкг/мл канамицина сульфата, 1мМ L-глутамин (Hyclone), 1 мМ раствора незаменимых аминокислот (Sigma-Aldrich). В ряде экспериментов эмбриональные тельца культивировали в среде, содержащей 5-аза-2-дезоксцитидин (2мкг/мл) или бутират натрия (2мкМ). Культивирование с этими агентами осуществляли в течение трех суток с последующим переносом эмбриональных телец во флаконы, покрытые 0,1% раствором желатина, в среду коДМЕМ с добавлением незаменимых аминокислот, глутамин, 10% SR,

ретиноевой кислоты ($10^{-7}M$), аскорбиновой кислоты (10нг/мл). Смену среды проводили каждые трое суток.

Иммуноцитохимия. По истечении 14-х суток культивирования проводилась формальдегидная фиксация с последующей иммуноцитохимией клеток с помощью антител (все от Abscam, USA) против альфа-актина, десмина и миозина. Выявление маркеров осуществляли методом согласно инструкции производителя антител. Ядра клеток окрашивали DAPI (0,1 мкг/мл) 10 мин. Для получения изображений и анализа использовали флюоресцентный микроскоп «Olympus BX-51» и программные продукты «Applied Spectral Imaging» (USA). Для анализа каждого маркера эксперимент повторяли трижды, наращивая по три флакона, в каждом из которых случайным образом выделяли 6 зон для проведения анализа иммуноцитохимической реакции. Микроскопирование проводили по каждой зоне в 30 полях зрения.

Результаты и обсуждение

На сегодняшний день существуют различные протоколы получения дифференцированных дериватов кардиомиоцитарных клеток из стволовых. Однако в этих протоколах для культивирования ЭСК применяют культивирование на фидерном слое клеток и используются среды с добавлением сыворотки, что приводит к увеличению вероятности контаминации и повышает иммуногенность. Для избежания этого авторы публикации использовали для экспансии ЭСК среду mTeSR без животных компонентов и с помощью иммуноцитохимических методов оценивали потенциал ЭСК к дифференцировке в кардиомиоцитарном направлении при воздействии агентов дифференцировки (рис. 1).

Рис.1. Иммуноцитохимия ЭСК и дериватов, культивируемых в среде коДМЕМ с добавлением незаменимых аминокислот, глутамина, 10% SR, ретиноевой кислоты $10^{-7}M$, аскорбиновой кислоты (10нг/мл) после обработки в течение 3-х суток 5-аза-2-дезоксцитидином (2мкг/мл) (рис.1 б, д, з) или бутиратом натрия (2мкМ)(рис.1 в, е, и). Клетки фиксированы 1% формальдегидом в фосфатном буфере, обработаны антителами против альфа-актина, миозина и десмина с последующим мечением вторичными антителами и детекцией флюоресценции. Контроль – клетки инкубировались в среде

коДМЕМ с добавлением незаменимых аминокислот, глутамина, 10% SR, ретиноевой кислоты $10^{-7}M$ (рис.1 а, г, ж).

Установлено, что предварительная экспозиция ЭСК с 5-аза-2-дезоксцитидином или бутиратом натрия приводила к появлению экспрессии исследуемых маркеров по сравнению с контролем. Более того, в случае экспозиции с 5-аза-2-дезоксцитидином через 14 дней появлялись сокращающиеся волокна, которые к 20-21 дню культивирования увеличивались в количестве (рис.2).

Рис.2 Фазово-контрастная микроскопия культивируемых дериватов ЭСК человека в кардиомиоцитарном направлении после обработки 5-аза-2-дезоксцитидином, (рис. 2а -14-й день, рис.2б -20-й день).

Исследование морфологии клеток показало, что ЭСК после культивирования в вышеописанных условиях способны приобретать кардиомиоцитарный фенотип. Известно, что регуляция экспрессии генов в ЭСК находится под эпигенетическим контролем. 5-аза-2-дезоксцитидин является ингибитором ДНК-поддерживающей метилазы-2, а бутират натрия – ингибитором гистоновой деацетилазы [10]. Эти два регулятора участвуют в поддержании эпигенетического статуса клетки в зависимости от ее состояния на уровне ДНК или на уровне конденсации хроматина. Это свидетельствует о наличии эпигенетического контроля дифференцировки при стимуляции ЭСК в кардиомиоцитарном направлении.

Таким образом, результаты исследований показали, что предварительная экспозиция эмбриональных стволовых клеток человека в комбинированной питательной среде, состоящей из стандартной среды ДМЕМ и синтетической среды mTeSR, свободных от сыворотки и фидерного слоя клеток, с добавлением факторов дифференцировки с ингибиторами метилаз и гистоновых деацетилаз снимает эпигенетический блок дифференцировки, позволяя ЭСК коммитироваться в предшественники кардиомиоцитов.

POSSIBILITY OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS CULTIVATED ON MTeSR MEDIUM TO DIFFERENTIATE INTO CARDIOMYOCYTE

A.V. Eremeev, A.V. Svetlakov, I.N. Bolshakov, Yu.i. Shaina, O.D. Neklyudova

Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky

Abstract. The presented paper considers the possibility of human embryonic stem cells, which were cultivated on mTeSR medium and passaged in the conditioned medium, to differentiate into cardiomyocyte direction.

Key words: pluripotent cells, marker of pluripotency, cardiomyocytes differentiation, conditioned medium.

Литература

1. Bauwens C., Yin T., Dang S. et al. Development of a perfusion fed bioreactor for embryonic stem cell-derived cardiomyocyte generation: oxygen-mediated enhancement of cardiomyocyte output // *Biotechnol. Bioeng.* – 2005. – Vol. 90, №4. – P.452-461.
2. Bin Z., Sheng L.G., Gang Z.C. et al. Efficient cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2 combined with visceral endoderm-like cells // *Cell Biol. Int.* – 2006. – Vol.30, № 10.-P.769-776.
3. Buggish M. Mechanismen Poliferation von Kardiomyozyten differenziert aus embryonalen stammzellen der Maus: [Электронный ресурс] / M.Buggish – Justus-Liebig-Universitaet Giessen, 2007.–Режим доступа: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2007/4662/index.html>.
4. He J.-Q., Yue M., Youngsook L., Thomson J.A. et al. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes // *Cellular Biology.* – 2003. – Vol. 93. – P.32-39.
5. Kim Y.Y., Seung-Yup K., Jiho J. et al. Use of long-term cultured embryoid bodies may enhance cardiomyocyte differentiation by BMP2 // *Yonsei Med.* –

2008. – Vol.49, № 5. – P.819-827.

6. Lev S., Kehat I., Gepsten L. Differentiation pathways in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes // *Ann N Y Acad Sci.* – 2005. – Vol.1047. – P.50-65.

7. Mummery Ch., van Oostwaard D.W., Doevendans P. et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes role of coculture with visceral endoderm-like cells // *Circ.* – 2009. – Vol.107, №21. – P.2733-2740.

8. Mujoo K., Sharin V.G., Bryan N.S. et al. Role of nitric oxide signaling components in differentiation of embryonic stem cells into myocardial cells // *PNAS.* – 2008. – Vol.105, №48. – P.18924-18929.

9. Passier R., Ward-van Oostwaard D., Snapper J. et al. Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures // *Stem Cells*, 2005.-Vol.23.-P.772–780.

10. Sazhenova E.A., Lebedev I.N., Ereemeev A.V. et al. Differential susceptibility of imprinted genes to epimutations under DNA demethylation influence // *Eur.J.Hum.Genet.* – 2008. – Vol.16, № 2. – P.260.

11. Xu Ch., Police Sh., Rao N. et al. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells // *Cellular Biology Circ. Res.* – 2002. – Vol.91. – P.501-508.

12. Xu Ch., He J.-Q., Kamp T.J. et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes can be maintained in defined medium without serum // *Stem Cells and Development.* – 2006. – Vol.15. – P.931-941.