

ПОЛОЖИТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА НА ПОКАЗАТЕЛИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ ПРИ СЕПТИЧЕСКОМ ШОКЕ У КРЫС

© Д. В. Струков, А. Г. Васильев, Ю. С. Александрович

ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России

Резюме. Целью данного исследования было оценить эффективность применения ингибиторов индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) при моделировании септического шока у грызунов. Модель септического шока воспроизводилась путем внутривенного введения крысам живой культуры бифидобактерий. Аминогуанидин использовался как селективный ингибитор iNOS. Проанализированы показатели центральной гемодинамики, измеренные прямым методом. Оценено состояние эндотелия кровеносных сосудов путем определения содержания оксида азота (II) (NO), эндотелиального фактора роста сосудов – А (VEGF-A) и тканевого активатора плазминогена (tPA) плазмы. Параметры гемостаза оценивали по уровню растворимых комплексов мономерного фибрина (РКМФ). Как оказалось, внутривенное введение крысам живой культуры бифидобактерий – адекватная и эффективная модель септического шока с характерными изменениями системной гемодинамики подопытных животных, развитием эндотелиальной дисфункции и активацией системы гемостаза в ответ на бактериемию. Показано, что ингибиторы индуцибельной синтазы оксида азота оказывают положительное влияние на гемодинамику при септическом шоке. Оксид азота не является единственным фактором в развитии гипотонии при септическом шоке. Ингибиторы iNOS, вероятно, могут влиять на дозы вазопрессоров, используемых в терапии септического шока, способствуя улучшению микроциркуляции и лучшей оксигенации тканей.

Ключевые слова: септический шок; дисфункция эндотелия; гипотензия; центральная гемодинамика; гемостаз.

NO INDUCIBLE SYNTHASE INHIBITORS PRODUCE A POSITIVE EFFECT ON INDEXES OF CENTRAL HEMODYNAMICS IN RATS WITH SEPTIC SHOCK

© D. V. Strukov, A. G. Vasil'yev, Yu. S. Aleksandrovich

Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Russia

Abstract. The purpose of the study was to evaluate the efficacy of NO inducible synthase (iNOS) inhibitors involved in simulation of septic shock in rats. Model of septic shock (SS) was obtained in rats by intravenous administration of live Bifidobacteria culture. Aminoguanidine was used as a selective inhibitor of iNOS. Indexes of central hemodynamics measured by direct method where analyzed. Vascular endothelial function was rated by determination of nitric oxide (II) (NO), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and tissue plasminogen activator (tPA) in plasma. Hemostatic parameters were evaluated by the level of soluble fibrin monomer complexes (RKMФ). Intravenous administration of live Bifidobacteria culture in rats proved to cause an adequate and effective septic shock model with characteristic changes of hemodynamics in laboratory animals, development of endothelial dysfunction and hemostasis system activation in response to bacteremia. iNOS inhibitors have a positive impact on hemodynamics in septic shock. NO is not the only factor in the development of hypotension in septic shock. iNOS inhibitors appear to affect the extent of vasopressor dose utilized in the therapy of septic shock contributing to improvement of microcirculation and tissue oxygenation.

Key words: septic shock; endothelial dysfunction; hypotension; central haemodynamics; haemostasis.

Септический шок представляет собой жизнеугрожающее состояние, характеризующееся нарушением реакционной способности эндотелия сосудов как на внутренние, так и внешние стимулы, а также депрессией миокарда, приводящей к несоответствию насосной функции сердца, объема циркулирующей крови и сосудистого русла, в результате чего быстро развивается синдром полиорганной недостаточности, являющейся причиной гибели [1, 4, 9]. Данная проблема может возникнуть у пациентов любой

возрастной категории [17]. Как правило, септический шок развивается у пациентов, получивших тяжелые сочетанные или комбинированные повреждения с последующей длительной искусственной вентиляцией легких, у больных с тяжелыми перитонитами и панкреатитами, обычно также требующих продленной искусственной вентиляции легких, и у пациентов, страдающих хронической патологией, депрессирующей иммунную систему. При развитии воспаления всегда взаимодействуют эндотелий,

тромбоциты, лейкоциты, коагуляционная система плазмы крови и система комплемента [7, 8, 18]. Эффективная работа иммунитета возможна только при их адекватной мобилизации в процессе ответа острой фазы.

При септическом шоке в условиях нарастающей антигенемии синхронная работа основных систем организма оказывается недостаточной. На фоне гиперцитокинемии в макрофагах, под воздействием TNF, липида А или их комбинации с IL-1, IL-2, INF- γ происходит избыточное образование NO [2, 3, 6, 10, 11, 13]. Для разработки новых схем терапии септического шока во многих странах проводятся исследования по применению ингибиторов индуцибелной синтазы оксида азота (iNOS) [12, 15, 16]. Полученные данные носят противоречивый характер. При моделировании септического шока в лабораторных условиях разные исследователи используют разные методики. Септический шок, развившийся у пациента и, смоделированный у животного, протекает по-разному. С целью ингибирования iNOS используются разные препараты, которые, естественно, имеют различные точки приложения [14, 19]. Вследствие противоречивых результатов концепция терапии септического шока ингибиторами индуцибелной синтазы оксида азота (iNOS) остается достаточно размытой и, естественно, пока весьма сложно сделать выбор в пользу внедрения какого-то одного препарата для работы в отделениях реанимации.

Цель настоящего исследования — определить, оказывают ли ингибиторы iNOS положительное влияние на гемодинамику при септическом шоке у лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 32 самца альбиноса серых крыс массой тела 280–310 г, разведения ГП «Рапполово» РАМН (Ленинградская область). Питание и содержание животных соответствовали нормам биоэтики и правилам надлежащей лабораторной практики. Подопытные крысы были разделены на две группы, «шок» и «шок+АГ» по 16 особей в каждой. В группу «шок» вошли здоровые животные, которым производили моделирование септического шока путем внутривенного введения живой культуры бифидобактерий. Крысам группы «шок+АГ» на десятой минуте вводили аминогуанидин.

Всем крысам под наркозом (внутримышечное введение смеси — кетамин (50 мг/кг)+реланиум (5 мг/кг)) производили катетеризацию бедренной вены и общей сонной артерии. К артериальному катетеру присоединяли принимающую

линию программно-аппаратного комплекса PhysExp (ООО «Cardioprotect», Россия), предназначенного для инвазивного определения показателей гемодинамики у лабораторных животных.

Крысам группы «шок» и «шок+АГ» с 5-й по 10-ю минуты медленно в три приема внутривенно вводили 1,0 мл взвеси живой культуры бифидобактерий (Бифидумбактерин, Микроген НПО ФГУП (НПО «Вирион»), Россия) в дозе (370 мг/кг) в стерильном физиологическом растворе. Крысам группы «шок+АГ» дополнительно вводили аминогуанидин в средней дозировке 150 мг/кг при средней массе тела животного 300 г.

На протяжении всего эксперимента у каждого животного производили непрерывный мониторинг параметров гемодинамики (истолическое, диастолическое, среднее артериальное давление, частота сердечных сокращений). Для оценки состояния эндотелия кровеносных сосудов в плазме крови подопытных крыс определяли содержание оксида азота (II) (NO), эндотелиального фактора роста сосудов А (VEGF-A) и тканевого активатора плазминогена (tPA) иммуноферментным методом. Оценку параметров гемостаза производили в плазме крови крыс гемостазиологическим методом; определяли концентрацию и частоту обнаружения растворимых комплексов мономерного фибринова (РКМФ) [5].

Взятие крови для лабораторных исследований производили на 60-й минуте от начала эксперимента путем транскутанной пункции сердца крысы в вакуумные системы с антикоагулянтом К3-EDTA. Обработку крови производили сразу после взятия. Получали обедненную тромбоцитами плазму путем однократного центрифугирования крови с ускорением 1200 g в течение 20 минут.

Статистическую обработку результатов производили при помощи пакета программ SPSS 13.0. Данные представлены в виде $M \pm SD$ (средняя арифметическая \pm среднее квадратическое отклонение). Для проверки характера распределения применяли тест Колмогорова–Смирнова. Результаты оценивали, применяя t-критерий Стьюдента (при нормальном характере распределения) и критерий Вилкоксона (при распределении, отличном от нормального). Статистически значимым уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Внутривенное введение крысам живой культуры бифидобактерий вызывает тяжелый септический шок, проявляющийся снижением артериального давления и уменьшением частоты сердечных сокращений (рис. 1).

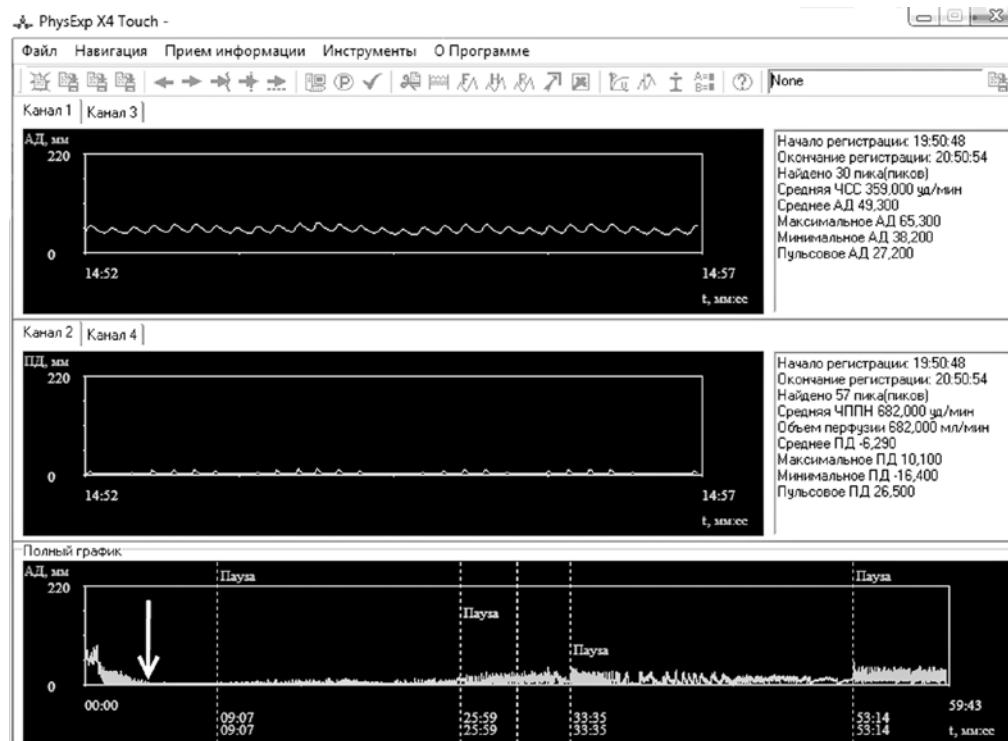


Рис. 1. Графическое представление тяжелого септического шока у крысы через 15 минут после внутривенного введения культуры бифидобактерий

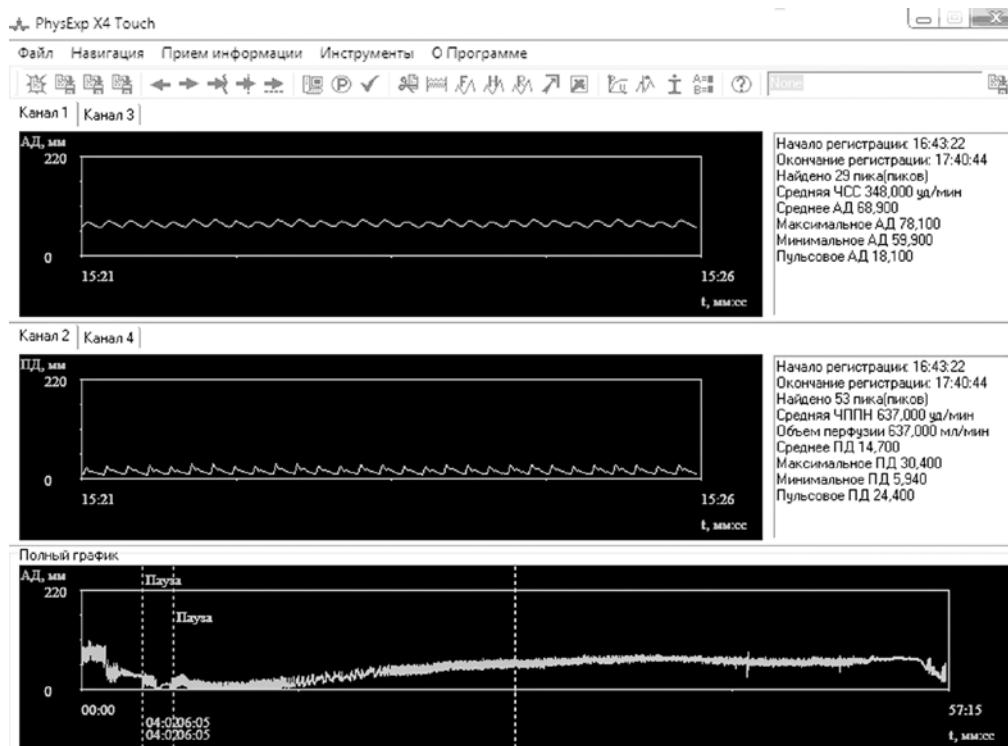


Рис. 2. Графическое представление тяжелого септического шока у крысы с положительной динамикой после введения аминогуанидина на 15-й минуте эксперимента

Внутривенное введение подопытным животным аминогуанидина на фоне развития характерной картины тяжелого септического шока к 15-й минуте

от начала введения препарата (рис. 2) проявлялось статистически значимым повышением всех исследуемых показателей системной гемодинамики у крыс

группы «шок+АГ», по сравнению с аналогичными показателями у крыс группы «шок» (табл. 1). Выраженные нарушения активности гемостатических механизмов оставались одинаковыми в обеих группах (табл. 2). Показатели артериального давления (sistолического — АДсист, диастолического — АДдиаст и среднего — АДср) в группе «шок+АГ» были в среднем на 23 мм рт. ст. больше, чем у крыс группы «шок» ($p<0,05$): АДсист в группе «шок+АГ» было $66,54\pm 11,40$ против $41\pm 20,3$ в группе «шок», АДдиаст в группе «шок+АГ» было $47,49\pm 10,35$ против $25\pm 14,2$ в группе «шок», АДср в группе «шок+АГ» было $55,86\pm 10,91$ против $32\pm 16,9$ в группе «шок». Показатели ЧСС группы «шок+АГ» достигали нормальных значений ($335,4\pm 15,30$ уд/мин) и были в среднем на $66,4$ уд/мин выше, чем у крыс группы «шок» ($269\pm 63,8$), ($p<0,05$).

Содержание NO у крыс группы «шок» было в среднем на $84,7$ мкмоль/л выше, чем у крыс группы «шок+АГ» ($p<0,05$) ($220,4\pm 15,16$ мкмоль/л и $135,7\pm 15,37$ мкмоль/л, соответственно). Физиологическая гемостатическая активность эндотелия у животных группы «шок» и «шок+АГ», оказалась неизменной. Это проявлялось незначительным колебанием концентрации в крови крыс VEGF-A, содержания tPA — важного эффектора фибринолитической системы организма и РКМФ (табл. 2).

Как и в нашем исследовании, в работе ученых Техасского медицинского университета [10], изучавших особенности гипоксической вазоконстрикции сосудов малого круга кровообращения на моде-

ли септического шока с внутривенным введением *Pseudomonas aeruginosa*, показана ведущая роль оксида азота в нарушениях гемодинамики, а также положительное влияние на нее ингибиторов iNOS. На модели септического шока с внутривенным введением живой культуры бифидобактерий мы тоже получили положительный эффект на гемодинамику селективного ингибитора iNOS. Давно известно, что ингибиторы NO повышают вазоконстрикторную способность сосудов, однако параллельно происходит повышение давления в малом круге кровообращения, т. к. при использовании неселективных ингибиторов синтазы NO развивается гипертензия в малом круге кровообращения [13]. При использовании селективного ингибитора синтазы оксида азота нам удалось доказать, что применение препаратов, снижающих концентрацию NO в кровотоке, предотвращает гипотензию во время септического шока. Другими авторами в исследовании барьерной функции эндотелия в ответ на грамм-положительную стимуляцию продемонстрирована способность селективных ингибиторов оксида азота на начальном этапе вызывать у крыс дозозависимое снижение легочного и системного артериального давления, но затем повышать сосудистый тонус и сердечный выброс [8]. Нам в своей работе не удалось обнаружить уменьшения легочного и системного артериального давления, а только положительное влияние на гемодинамику в виде плавного восстановления общего периферического сосудистого сопротивления.

Таблица 1

Показатели системной гемодинамики у крыс при внутривенном введении живой культуры бифидобактерий и аминогуанидина ($M\pm SD$)

Исследуемый показатель	Исследуемые группы крыс	
	шок	шок + АГ
АД sistолическое, мм рт. ст.	$41\pm 20,3$	$66,54\pm 11,40^*$
АД диастолическое, мм рт. ст.	$25\pm 14,2$	$47,49\pm 10,35^*$
АД среднее, мм рт. ст.	$32\pm 16,9$	$55,86\pm 10,91^*$
ЧСС, уд/мин	$269\pm 63,8$	$335,4\pm 15,30^*$

* — отличия от группы «шок» достоверны на принятом уровне значимости

Таблица 2

Состояние эндотелия и системы гемостаза у крыс при внутривенном введении живой культуры бифидобактерий и аминогуанидина ($M\pm SD$)

Исследуемый показатель	Группа крыс	
	шок	шок + АГ
NO, мкмоль/л	$220,4\pm 15,16$	$135,7\pm 15,37^*$
VEGF-A, пг/мл	$7,9\pm 1,13$	$11,2\pm 1,69^*$
tPA, нг/мл	$9,9\pm 1,03$	$8,9\pm 0,5^*$
РКМФ, %	100*	100*

* — отличия от группы «шок» достоверны на принятом уровне значимости

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внутривенное введение крысам живой культуры бифидобактерий — адекватная и эффективная модель септического шока с характерными изменениями системной гемодинамики подопытных животных, развитием эндотелиальной дисфункции и активацией системы гемостаза в ответ на бактериемию. Ингибиторы iNOS оказывают положительное влияние на гемодинамику при развитии этой модели септического шока. Оксид азота — не единственный фактор в развитии гипотонии при септическом шоке. Ингибиторы iNOS, вероятно, могут влиять на дозы вазопрессоров, используемых в терапии септического шока, способствуя улучшению микроциркуляции, и лучшей оксигенации тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрович Ю.С., Пшенисов К.В. Современные принципы диагностики и интенсивной терапии септического шока у детей. Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. 2011; 3: 31–6.
2. Лысикова М., Вальд М., Масиновски З. Механизмы воспалительной реакции и воздействие на них с помощью протеолитических ферментов. Цитокины и воспаление. 2004; 3: 28–34.
3. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник. Соросовский образовательный журнал. 2000; 6 (12): 12–8.
4. Струков Д.В., Васильев А.Г., Александрович Ю.С. Актуальные проблемы сепсиса и септического шока. Педиатр. 2014; 5 (2): 81–7.
5. Трашков А.П., Васильев А.Г., Дементьева Е.А., Беспалов В.Г., Панченко А.В., Муразов Я.Г. Сравнительная характеристика нарушений работы плазменного компонента системы гемостаза крыс при развитии экспериментальных опухолей различного гистологического типа. Вестник Российской военно-медицинской академии. 2011; 33 (1): 148–53.
6. Avontuur J.A.M., Bruining H.A., Ince C. Inhibition of Nitric Oxide Synthesis Causes Myocardial Ischemia in Endotoxemic Rats. American Heart Association. 1995; 36: 11–28.
7. Broderick K.E., Singh V., Zhuang S. et al. Nitric oxide scavenging by the cobalamin precursor cobinamide. J. Biol. Chem. 2005; 8726 (280): 8678–85.
8. Bruins M.J., Soeters P.B., Lamers Wh. et al. L-arginine supplementation in hyperdynamic endotoxemic pigs: effect on nitric oxide synthesis by the different organs. Crit Care Med. 2002; 30: 508–17.
9. Dellinger P.R., Mitchell M.L., Andrew R. Surviving Sepsis Campaign. International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: Special Article February. 2013; 41 (2): 232–9.
10. Deutz N.E.P., Hallemesch M.M., Lamers W.H. et al. The role of iNOS and ecNOS in the in vivo reduction of gut glutamine consumption after endotoxin treatment in mice. FASEB J 6. 2002; 782: 6–22.
11. Hallemesch M.M., Soeters P.B., Deutz N.E.P. Renal arginine and protein synthesis are increased during early endotoxemia in mice. Am J Physiol Renal Physiol. 2002; 282: 216–23.
12. Kent Doi., Asada L., Peter S.T. Star. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. J Clin Invest. 2009; 119 (10): 2868–2878.
13. Kim H.W., Greenburg A.G. Nitric oxide scavenging, alone or with nitric oxide synthesis inhibition, modulates vascular hyporeactivity in rats with intraperitoneal sepsis. Shock. 2002; 468 (17): 423–6.
14. Korbut R., Tim D.W., Richard J. G., John R.V. The effect of nitric oxide synthase inhibition on the plasma fibrinolytic system in septic shock in rats. Br.J. Pharmacol. 1994; 112: 289–91.
15. Mathiak G., Szewczyk D., Abdullah F. An improved clinically relevant sepsis model in the conscious rat. Crit Care Med. 2000; 28 (6): 1947–52.
16. Price S., Mitchell J.A., Anning P.B. et al. Type II nitric oxide synthase activity is cardio-protective in experimental sepsis. Eur. J. Pharmacol. 2003; 472: 111–8.
17. Scott J.A., McCormack D.G. Selective in vivo inhibition of inducible nitric oxide synthase in a rat model of sepsis. The American Physiological Society. 1999; 42: 24–32.
18. Soeters P.B., Hallemesch M.M., Bruins M.J. Quantitative in vivo assessment of arginine utilization and nitric oxide production in endotoxemia. Am J Surg. 2002; 500 (183): 480–8.
19. Wink D.A., Miranda K.M., Espey M.G. et al. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. Antioxid Redox Signal. 2001; 236 (3): 203–13.

REFERENCES

1. Aleksandrovich Ju.S., Pshenisnov K.V. Sovremennye principy diagnostiki i intensivnoj terapii septicheskogo shoka u detej [Contemporary principles of diagnostics and intensive therapy of septic shock in children]. Rossijskij vestnik detskoj hirurgii, anesteziology i reanimatologii. 2011; 3: 31–6. (in Russian).
2. Lysikova M., Val'd M., Masinovski Z. Mehanizmy vospalitel'noj reakcii i vozdejstvie na nih s pomoshh'ju proteoliticheskikh fermentov [Inflammatory reaction mechanisms and the influence of proteolytic enzymes]. Citokiny i vospalenie. 2004; 3: 28–34. (in Russian).
3. Sosunov A.A. Oksid azota kak mezhkletochnyj posrednik [Nitrogen oxide as intercellular messenger]. Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal. 2000; 6 (12): 12–8. (in Russian).

4. Strukov D.V., Vasiliev A.G., Aleksandrovich Yu.S. Aktual'nye problemy sepsisa i septicheskogo shoka [Actual problems of sepsis and septic shock]. Pediatr. 2014; 5 (2): 81–87. (in Russian).
5. Trashkov A.P., Vasiliev A.G., Dement'eva E.A., Bespalov V.G., Panchenko A.V., Murazov Ja.G. Sravnitel'naja harakteristika narushenij raboty plazmennogo komponenta sistemy gemostaza krys pri razvitiu jekperimental'nyh opuholej razlichnogo histologicheskogo tipa [Comparative characteristics of impaired plasma component of hemostasis system in rats with development of experimental tumors of various histologic type]. Vestnik Rossijskoj voenno-meditskoy akademii. 2011; 33 (1): 148–53. (in Russian).
6. Avontuur J.A.M., Bruining H.A., Ince C. Inhibition of Nitric Oxide Synthesis Causes Myocardial Ischemia in Endotoxemic Rats. American Heart Association. 1995; 36: 11–28.
7. Broderick K.E., Singh V., Zhuang S. et al. Nitric oxide scavenging by the cobalamin precursor cobinamide. J. Biol. Chem. 2005; 280 (280): 8678–85.
8. Bruins M.J., Soeters P.B., Lamers W.H. et al. L-arginine supplementation in hyperdynamic endotoxemic pigs: effect on nitric oxide synthesis by the different organs. Crit Care Med. 2002; 30: 508–17.
9. Dellinger P.R., Mitchell M.L., Andrew R. Surviving Sepsis Campaign. International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: Special Article February. 2013; 41 (2): 232–9.
10. Deutz N.E.P., Hallemeesch M.M., Lamers W.H. et al. The role of iNOS and eNOS in the in vivo reduction of gut glutamine consumption after endotoxin treatment in mice. FASEB J. 2002; 16: 6–22.
11. Hallemeesch M.M., Soeters P.B., Deutz N.E.P. Renal arginine and protein synthesis are increased during early endotoxemia in mice. Am J Physiol Renal Physiol. 2002; 282: 216–23.
12. Kent Doi., Asada L., Peter S.T. Star. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. J Clin Invest. 2009; 119 (10): 2868–2878.
13. Kim H.W., and Greenburg A.G. Nitric oxide scavenging, alone or with nitric oxide synthesis inhibition, modulates vascular hyporeactivity in rats with intraperitoneal sepsis. Shock. 2002; 18 (17): 423–6.
14. Korbut R., Tim D.W., Richard J. G., John R.V. The effect of nitric oxide synthase inhibition on the plasma fibrinolytic system in septic shock in rats. Br. J. Pharmacol. 1994; 112: 289–91.
15. Mathiak G., Szewczyk D., Abdullah F. An improved clinically relevant sepsis model in the conscious rat. Crit Care Med. 2000; 28 (6): 1947–52.
16. Price S., Mitchell J.A., Anning P.B. et al. Type II nitric oxide synthase activity is cardio-protective in experimental sepsis. Eur. J. Pharmacol. 2003; 472: 111–8.
17. Scott J.A., McCormack D.G. Selective in vivo inhibition of inducible nitric oxide synthase in a rat model of sepsis. The American Physiological Society. 1999; 42: 24–32.
18. Soeters P.B., Hallemeesch M.M., Bruins M.J. Quantitative in vivo assessment of arginine utilization and nitric oxide production in endotoxemia. Am J Surg. 2002; 183 (500): 480–8.
19. Wink D.A., Miranda K.M., Espey M.G. et al. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. Antioxid Redox Signal. 2001; 236 (3): 203–13.

◆ Информация об авторах

Струков Данила Викторович – аспирант кафедры патологической физиологии с курсом иммунопатологии и медицинской информатики. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. Е-mail: dstrukov@yandex.ru.

Васильев Андрей Глебович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой патологической физиологии с курсом иммунопатологии. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. Е-mail: avas7@mail.ru.

Александрович Юрий Станиславович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой анестезиологии и реаниматологии ФПК и ПП. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2. Е-mail: jalex1963@mail.ru.

Strukov Danila Viktorovich – Postgraduate Student. St. Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: dstrukov@yandex.ru.

Vasiliev Andrey Glebovich – MD, PhD, Dr Med Sci, Head, Dept. of Pathophysiology. St. Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: avas7@mail.ru.

Alexandrovich Yuriy Stanislavovich – MD, PhD, Dr Med Sci, Head, Dept. of Anesthesiology and Reanumatology. St. Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia. E-mail: jalex1963@mail.ru.