

**Обзоры**

<b>Быков Ю.В., Батурич В.А.</b> Когнитивные нарушения при сахарном диабете 1 типа .....	4
<b>Пахомова Н.Ю., Строкова Е.Л., Корыткин А.А., Кожевников В.В., Гусев А.Ф., Зайдман А.М.</b> История изучения нервного гребня (обзор) .....	13
<b>Шнякин П.Г., Руденко П.Г., Ботов А.В., Казадаева И.А.</b> Эхинококкоз и альвеококкоз головного мозга в практике нейрохирурга (обзор литературы и клинические случаи) .....	30

**Оригинальные исследования****Физиология**

<b>Гапонов А.А., Дмитриева Е.Г., Малов Я.С., Якимов А.А.</b> Зависит ли толщина стенки левого ушка сердца и его перешейка от их макроскопических характеристик? .....	40
--	----

**Медико-биологические науки**

<b>Молодых О.П., Пальчикова Н.А., Селятицкая В.Г., Глушенко А.В., Курская О.Г.</b> Панкреотоксический эффект вируса гриппа А/Н1N1-Калифорния у мышей на фоне гипергликемии, вызванной введением стрептозоцина .....	47
<b>Забанова В.Е., Фурсова А.Ж., Бондаренко Н.А., Бгатова Н.П., Затеев А.В., Мадонов П.Г.</b> Влияние иммобилизованных ферментов гиалуронидазы и субтилизина на ультраструктуру эпителиоцитов конъюнктивы человека .....	59
<b>Петрова Е.С., Жукова Н.А., Евсеенко В.И., Хвостов М.В., Мешкова Ю.В., Толстикова Т.Г., Душкин А.В.</b> Уменьшение гепатотоксичности нимесулида в составе композиции с глицерризинатом натрия, полученной механохимическим способом .....	71
<b>Калинина Е.Н., Кормщикова Е.С., Вильданова Н.С., Шерстнев Ф.С.</b> Унифицированный дизайн валидации методик контроля качества компонентов крови .....	79
<b>Дружинина С.С., Логинова М.А., Смирнова Д.Н., Обухов И.П., Ярошенко К.О., Попонина Е.А., Назарова Е.Л., Исаева Н.В., Парамонов И.В.</b> Алгоритм определения подлинности биомедицинских клеточных препаратов, содержащих мезенхимальные стволовые клетки .....	88

**Клиническая медицина**

<b>Воробьев А.М., Рузов В.И.</b> Диастолический стресс-тест в оценке функционального состояния постинфарктного миокарда .....	96
<b>Лозинский А.С., Чемезов С.В.</b> Топографическая анатомия восходящей и нисходящей ободочных кишок детей и подростков по данным прижизненной визуализации .....	104
<b>Алфёрова В.И., Мустафина С.В., Рымар О.Д., Воевода С.М., Щербакова Л.В., Стахнёва Е.М., Денисова Д.В.</b> Частота метаболически здорового и нездорового фенотипов у женщин 25–44 лет при разных уровнях тиреотропного гормона, пролактина, лептина .....	111

**Клинический случай**

<b>Климентов М.Н., Сысоев С.В., Чупина М.С.</b> Дивертикулярная болезнь сигмовидной кишки, осложненная трубчатым кишечным свищом передней брюшной стенки и рубцовой стриктурой сигмовидной кишки (клиническое наблюдение) .....	124
--	-----

## Reviews

- Bykov Yu.V., Baturin V.A.**  
Cognitive impairments in type 1 diabetes mellitus ..... 4
- Pakhomova N.Yu., Strokova E.L., Korytkin A.A., Kozhevnikov V.V., Gusev A.F., Zaydman A.M.**  
History of the study of the neural crest (review) ..... 13
- Shnyakin P.G., Rudenko P.G., Botov A.V., Kazadaeva I.A.**  
Echinococcosis and alveococcosis of the brain in the practice of a neurosurgeon (a review literature and clinical cases) ..... 30

## Research articles

### Physiology

- Gaponov A.A., Dmitrieva E.G., Malov Ya.S., Iakimov A.A.**  
Does the wall thickness of the left atrial appendage and its isthmus depend on their macroscopic characteristics? ..... 40

### Biomedical sciences

- Molodykh O.P., Palchikova N.A., Selyatitskaya V.G., Glushchenko A.V., Kurskaya O.G.**  
Pancreatic toxicity of influenza A/H1N1-California virus infection in mice at the background of hyperglycemia induced by streptozotocin administration ..... 47
- Zabanova V.E., Fursova A.Zh., Bondarenko N.A., Bgatova N.P., Zateev A.V., Madonov P.G.**  
Effect of immobilized hyaluronidase and subtilisin enzymes on the ultrastructure of human conjunctival epithelial cells ..... 59
- Petrova E.S., Zhukova N.A., Evseenko V.I., Khvostov M.V., Meshkova I.V., Tolstikova T.G., Dushkin A.V.**  
Reduction of hepatotoxicity of nimesulide in mechanochemically obtained composition with disodium salt of glycyrrhizic acid ..... 71
- Kalinina E.N., Kormshchikova E.S., Vildanova N.S., Sherstnev F.S.**  
A unified design for validation of methods for quality control of blood components ..... 79
- Druzhinina S.S., Loginova M.A., Smirnova D.N., Obukhov I.P., Yaroshenko K.O., Poponina E.A., Nazarova E.L., Isaeva N.V., Paramonov I.V.**  
Algorithm for determining the authenticity of biomedical cell preparations containing mesenchymal stem cells ..... 88

### Clinical medicine

- Vorobev A.M., Ruzov V.I.**  
Diastolic stress test in assessing functional state of postinfarction myocardium ..... 96
- Lozinskiy A.S., Chemezov S.V.**  
Topographic anatomy of the ascending and descending colons of children and adolescents according to intravital imaging ..... 104
- Alferova V.I., Mustafina S.V., Rymar O.D., Voevoda S.M., Shcherbakova L.V., Stakhneva E.M., Denisova D.V.**  
The frequency of metabolically healthy and unhealthy phenotypes in women aged 25–44 years with different levels of thyroid-stimulating hormone, prolactin, leptin ..... 111

### Case report

- Klimentov M.N., Sysoev S.V., Chupina M.S.**  
Diverticular disease of the sigmoid colon, complicated by a tubular intestinal fistula of the anterior abdominal wall and cicatricial structure of the sigmoid colon (case report) ..... 124

## Когнитивные нарушения при сахарном диабете 1 типа

Ю.В. Быков<sup>1,2</sup>, В.А. Батурин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Ставропольский государственный медицинский университет Минздрава России  
355017, г. Ставрополь, ул. Мира, 310*

<sup>2</sup> *Детская городская клиническая больница им. Г.К. Филиппского  
355002, г. Ставрополь, ул. Пономарева, 5*

### Резюме

Сахарный диабет (СД) 1 типа, одно из распространенных эндокринологических заболеваний детского возраста, имеет большое количество хронических микро- и макрососудистых осложнений, которые снижают продолжительность жизни детей и увеличивают затраты здравоохранения. Поражение ЦНС на фоне СД 1 типа у детей и подростков является достаточно распространенным, но плохо изученным осложнением. Ведущую роль в нарушении ЦНС занимает когнитивная дисфункция (КД). Патофизиологические аспекты КД при СД 1 типа остаются до конца не выясненными. В качестве трех основных триггеров выделяют гипогликемию, хроническую умеренную гипергликемию и острую гипергликемию (диабетический кетоацидоз). Приводятся доказательства нарушения в морфологии головного мозга у детей с СД 1 типа по ходу развития заболевания. Отмечены повреждения при формировании белого и серого вещества, гиппокампа, миндалина, описаны процессы нарушения миелинизации, что также может служить причиной развития КД у данного контингента больных. Описаны особенности клинических проявлений КД у детей и подростков с СД 1 типа в зависимости от локализации поражения головного мозга. При дебюте СД в период младшего детства (до 5 лет) отмечается более выраженная КД. Своевременная диагностика и коррекция КД на фоне СД 1 типа у детей и подростков может улучшить терапевтические и профилактические прогнозы при данном заболевании.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 1 типа, когнитивная дисфункция, дети и подростки, головной мозг.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Быков Ю.В., e-mail: yubikov@gmail.com

**Для цитирования:** Быков Ю.В., Батурин В.А. Когнитивные нарушения при сахарном диабете 1 типа. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(1):4–12. doi: 10.18699/SSMJ20230101

## Cognitive impairments in type 1 diabetes mellitus

Yu.V. Bykov<sup>1,2</sup>, V.A. Baturin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Stavropol State Medical University of Minzdrav of Russia  
355017, Stavropol, Mira str., 310*

<sup>2</sup> *Children's City Clinical Hospital named G.K. Filippsky  
355002, Stavropol, Ponomareva str., 5*

### Abstract

Type 1 diabetes mellitus (DM) is one of the most prevalent endocrinological disorders of childhood. This disorder is accompanied by numerous micro- and macrovascular complications that reduce children's life expectancy and increase healthcare costs. Central nervous system (CNS) damage in children and adolescents with type 1 DM is a fairly common but poorly studied complication. The leading role among CNS changes is played by cognitive dysfunction (CD). The pathophysiological aspects of CD in type 1 DM haven't yet been understood completely. The three main triggers are hypoglycemia, chronic moderate hyperglycemia, and acute hyperglycemia (diabetic ketoacidosis). Evidence is presented to show the development of morphological abnormalities of the brain with progression of type 1 DM in children. Damage in the formation of white and gray matter, hippocampus, amygdala, the processes of myelination disorders have been described, which can also be the cause of CD development in this contingent of patients. Peculiarities of

clinical manifestations of CD in children and adolescents with type 1 DM depending on the localization of the brain lesion are described. A more pronounced CD was found in cases when DM debuts in early childhood (up to 5 years). Timely diagnosis and correction of CD in children and adolescents with type 1 DM can improve the therapeutic and prophylactic prognosis in this disease.

**Key words:** type 1 diabetes mellitus, cognitive dysfunction, children and adolescents, brain.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Corresponding author:** Bykov Yu.V., e-mail: yubykov@gmail.com

**Citation:** Bykov Yu.V., Baturin V.A. Cognitive impairments in type 1 diabetes mellitus. *Sibirskij nauchnyj medicinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(1):4–12. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230101

## Введение

Сахарный диабет (СД) 1 типа является наиболее распространенным хроническим и метаболическим заболеванием в детском возрасте [1–5]. По мировым данным на 2021 г. этот вид эндокринопатии составляет примерно 5–10 % от общей распространенности всех форм СД, что по статистике соответствует 1,1 млн детей и подростков в возрасте до 18 лет [6, 7]. Заболеваемость СД 1 типа в педиатрической практике варьирует в зависимости от географии, возраста, пола, этнической принадлежности и продолжает увеличиваться во всем мире со скоростью около 1–3 % в год [8, 9]. СД 1 типа – это хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся иммуноопосредованным разрушением  $\beta$ -клеток поджелудочной железы с последующей гипергликемией и пожизненной зависимостью от экзогенной терапии инсулином [2, 3, 5, 6, 10, 11].

Растущая распространенность СД 1 типа во всем мире является серьезной проблемой здравоохранения в основном из-за связанных с данным заболеванием осложнений со стороны поражаемых органов-мишеней [12], выявление и профилактика которых так же важны, как диагностика и лечение данной эндокринопатии [13]. Осложнения СД 1 типа в детском возрасте делятся на краткосрочные (острые) и долгосрочные (хронические) [9, 14, 15], среди хронических, в свою очередь, выделяют микро- и макрососудистые [2, 15, 16]. Макрососудистые осложнения включают диабетическую ретинопатию, нефропатию, невропатию, энцефалопатию и др. [14, 15, 17, 18], к макрососудистым в первую очередь относят атеросклеротические изменения в сосудах сердца и головного мозга (ГМ) [9, 14, 15].

Центральная нервная система (ЦНС) является одной из главных мишеней развития осложнений при СД 1 типа [19]. В последние годы произошел резкий рост числа исследований влияния СД на ЦНС и нейрокогнитивные функции [20–22]. Отчасти это отражает новые возможности, открывшиеся благодаря достижениям в области нейро-

визуализации, помимо этого растет признание важности когнитивных нарушений, связанных с СД [20]. Когнитивная дисфункция (КД) у взрослых с СД 2 типа считается важной проблемой здравоохранения и достаточно хорошо изучена [20]. Напротив, научное сообщество только начинает понимать последствия влияния когнитивных осложнений, связанных с СД 1 типа, у детей и подростков в связи с тем, что нейрокогнитивные расстройства у этого контингента больных являются еще мало изученными осложнениями [13, 19, 20, 23, 24]. Появляется все больше доказательств того, что гипогликемические эпизоды, хроническое воздействие гипергликемии и аутоиммунные механизмы могут иметь долгосрочное и негативное влияние на церебральную функцию у детей и подростков с СД 1 типа [3, 14]. Показано, что даже незначительные изменения когнитивной функции влияют на способность ребенка достичь наилучшего функционального состояния при данной эндокринопатии, в то время как тяжелая КД может серьезно снизить качество жизни пациентов [25].

Целью данного обзора является описание КД как патологического состояния, при котором имеются статистически значимые различия когнитивной функции между пациентами с СД 1 типа и «условно» здоровыми детьми и подростками. В данном случае мы не рассматриваем КД как классический синдром клинических нарушений, например, как снижение когнитивных функций по сравнению с исходным уровнем (деменция) или как недоразвитие когнитивных функций (олигофрения).

## Патофизиология когнитивной дисфункции на фоне СД 1 типа в детском возрасте

ГМ является одним из наиболее метаболически активных органов в организме, поэтому нарушение регуляции метаболизма глюкозы, характерное для СД, вызывает различные неблагоприятные последствия для функционирования ЦНС и когнитивной функции [26]. На сегодняш-

ний день патофизиология КД у детей и подростков на фоне СД 1 типа изучена недостаточно [13, 14, 27, 28]. Несмотря на то что доказательства негативного влияния СД 1 типа на развитие ГМ детей и подростков хорошо установлены, патофизиологические аспекты формирования церебральной недостаточности при данной патологии вызывают много вопросов [29]. В силу различий патофизиологических механизмов СД 1 и 2 типа различия и природа КД у таких пациентов [30]. Так, при СД 1 типа именно недостаточность инсулина с выраженными проявлениями дисгликемии является основным триггером КД [30]. Механизмы, лежащие в основе КД у детей, на фоне СД 1 типа очень сложны и включают факторы, связанные непосредственно с СД (прямое воздействие измененного метаболизма глюкозы на ГМ), а также с развитием хронической микрососудистой дисфункции на фоне осложнений СД [30].

ГМ ребенка нуждается в постоянном поступлении глюкозы для нормального метаболизма, функционирования нейронов и выработки нейротрансмиттеров [27, 28, 31]. Глюкоза играет ключевую роль в регуляции окислительного стресса, проявления которого нарастают при дисгликемии на фоне СД 1 типа [27, 31, 32]. Не исключено, что именно снижение или увеличение ее поступления в ГМ вызывает нарушения когнитивных функций [28]. В связи с этим в литературе описаны три основные и возможные причины КД при СД 1 типа: эпизоды гипогликемии, хроническая умеренная гипергликемия и острая гипергликемия (диабетический кетоацидоз – ДКА) [28, 33]. Рассмотрим данные триггеры более подробно.

### Гипогликемия

Эпизоды гипогликемии – достаточно частое острое осложнение при СД 1 типа на фоне постоянной экзогенной инсулинотерапии, которая и является основным провоцирующим фактором [34]. Некоторые клиницисты и исследователи связывают развитие КД у детей на фоне СД 1 типа с возникновением одного или нескольких эпизодов острой гипогликемии [35]. Показано, что кратковременная легкая гипогликемия может вызвать обратимое нарушение когнитивной функции, в то время как устойчивая или тяжелая гипогликемия – привести к необратимому повреждению нейронов, а следовательно – структуры ГМ, что сопровождается выраженными изменениями когнитивной функции [36]. Отмечена связь между тяжелой гипогликемией у детей в возрасте до 5 или 6 лет с данной эндокринопатией и ухудшением когнитивных функций, с прицельным нарушением интеллекта, внимания и памяти [3, 20, 29]. Именно тяжелая гипогликемия рассматри-

вается в качестве основной причины КД при СД 1 типа в педиатрической популяции [27]. Показано, что если в раннем детстве в контексте СД 1 типа возникали острые гипогликемические состояния, КД может быть особенно выраженной в более старшем (подростковом) возрасте [37]. В метаанализе 12 исследований, проведенных в период с 1997 по 2008 г. у детей и подростков с СД 1 типа, обнаружены умеренные, но статистически значимые эффекты влияния гипогликемии на нейрокогнитивную функцию [38]. Хотя в некоторых сообщениях отмечено, что умеренная гипогликемия идентифицируется как фактор риска КД в детском возрасте с формированием структурных аномалий в определенных областях ГМ, другие исследователи не обнаружили статистически значимых результатов связи между эпизодами гипогликемии и формированием КД в детском возрасте [27].

Патогенез КД, вызванной тяжелой гипогликемией на фоне СД 1 типа в детском возрасте, остается малоизученным [25]. Приводятся данные, что при возникновении этого осложнения обнаруживаются аномальные изменения транспортеров глюкозы (GLUT 1, 3 и 4) в ГМ, которые могут играть важную роль в формировании нейрокогнитивного дефицита [39]. Также известно, что острая гипогликемия приводит к нарушению энергопродукции клеток ГМ и к необратимым функциональным изменениям, что вызывает гибель нейронов [40]. Таким образом, гипогликемия представляет собой достаточно важный триггер при формировании КД в детском возрасте при СД 1 типа, независимо от того, является ли она острой или хронической [17].

### Хроническая умеренная гипергликемия

Хроническая умеренная гипергликемия в настоящее время также рассматривается как потенциальный фактор КД на фоне СД 1 типа, поскольку имеются доказательства корреляционной связи между повышением уровня гликированного гемоглобина (HbA1c) и нарушением когнитивной функции в детском и подростковом возрасте [29]. Некоторые авторы показали, что именно хроническая умеренная гипергликемия связана со структурными изменениями нейронов и ухудшением долговременной пространственной памяти на фоне СД в педиатрической популяции [3, 27]. Другие исследования у детей младшего возраста обнаружили тесную взаимосвязь между хронически повышенным содержанием глюкозы в крови, КД и нарушениями структуры ГМ [41]. Хроническая гипергликемия способствует проникновению глюкозы в ГМ, внутри- и внеклеточную концентрацию глюкозы в среднем мозге и полосатом

теле, что приводит к нейрональной глюкозотоксичности через различные механизмы, такие как митохондриальная дисфункция и окислительный стресс [17, 42, 43]. Существуют и другие токсические эффекты гипергликемии, которые включают неферментативное гликозилирование белков и нарушение гомеостаза  $Ca^{2+}$ , что сопровождается нарушением кровоснабжения ГМ [44].

Согласно другой точке зрения, начало СД и значительное повышение уровня глюкозы в крови вызывают ряд структурных и функциональных изменений в ГМ за счет изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера [41], в том числе для потенциальных нейротоксинов, что, в свою очередь, изменяет внутреннюю среду ГМ, замедляя процесс его нормального формирования, особенно в критические периоды развития ребенка (первые 4–5 лет жизни) [41]. Эта гипотеза объясняет большую вероятность появления КД у детей, у которых СД возник в более раннем возрасте [41]. Также показано, что хроническая гипергликемия может запускать механизмы, способствующие повреждению нейронов и эндотелиальной дисфункции, и впоследствии – развитию КД [30]. Другими авторами высказано предположение, что последствия хронической умеренной гипергликемии в основном ограничиваются подростковым возрастом и нарушениями в лобных отделах ГМ, которые быстро формируются после полового созревания, оказывая специфическое влияние на развитие когнитивных функций [20]. Хроническое воздействие гипергликемии также может оказывать негативное влияние на ГМ, влияя как на серое, так и на белое вещество [45].

### Острая гипергликемия (ДКА)

Проявления острой гипергликемии на фоне ДКА только недавно стали рассматриваться в качестве возможного триггера КД при СД 1 типа в детском возрасте [29, 46, 47]. Эффекты ДКА, который достаточно часто встречается у детей и подростков с данной эндокринопатией, на нейрокогнитивные способности до сих пор не убедительны, а патофизиологические механизмы снижения когнитивных функций на фоне острой гипергликемии еще полностью не выяснены [3]. Известно, что кетоновые тела могут оказывать прямое неблагоприятное влияние на активность ГМ, вызывая повышение уровня фактора проницаемости сосудов [29]. Исследования на животных выявили повреждение ГМ вследствие чрезмерного кетоза на фоне ДКА [29]. Экзогенно вводимые кетоны при моделировании ДКА приводили к снижению мозгового кровотока и уменьшению выработки высокоэнергетических фосфатных метаболитов [29]. A.V. Jessup et al. со-

общили, что у детей с СД 1 типа с ДКА наблюдалась тенденция к более низкой когнитивной функции по сравнению с пациентами с СД того же возраста, но без ДКА [48]. Другими исследователями показано, что даже однократный эпизод ДКА в детском и подростковом возрасте на фоне острой гипергликемии может приводить к КД, что проявлялось в снижении памяти и IQ [49].

### Морфологические изменения головного мозга на фоне СД 1 типа

Связь между СД 1 типа и изменением развития ГМ в детском возрасте хорошо описана и изучена [27, 28, 41, 50–52]. Известно, что в детстве ГМ претерпевает значительные структурные и функциональные изменения, включая высокую и быстро меняющуюся метаболическую потребность, что может сделать развивающийся ГМ ребенка особенно уязвимым к перепадам уровня глюкозы в крови [21, 27, 45, 53–55]. Показано, что филогенетически более «старые» мозговые структуры, участвующие в сенсомоторной функции (затылочная доля, теменная доля), созревают первыми, затем – кора ГМ, в последнюю очередь – лобные доли [20]. Рост нейронов и формирование нейронных сетей активно происходят именно в детском возрасте [27, 45]. Объем серого вещества увеличивается в детстве, а затем начинает уменьшаться в подростковом возрасте из-за усиления процессов миелинизации [20]. Напротив, объем белого вещества увеличивается именно в подростковом возрасте [20]. Области, которые проходят длительные периоды развития, такие как гиппокамп, лобные доли и белое вещество, наиболее уязвимы для метаболических нарушений на фоне СД 1 типа [20]. Гиппокамп может быть особенно чувствителен к повреждениям при гипогликемии, обеспечивая потенциальный механизм нарушения обучения и памяти, наблюдаемый в некоторых исследованиях у детей с СД 1 типа [54]. Дисгликемия в раннем возрасте и даже внутриутробно может приводить к нарушениям процессов развития ЦНС, таких как формирование синапсов и образование миелина, которые происходят в детском возрасте [27].

Данные о негативном влиянии СД на развивающийся мозг подтверждаются исследованием, показывающим, что у детей с СД 1 типа в возрасте 3–10 лет значительно нарушено нормативное увеличение объемов белого вещества ГМ [56]. Аналогичные свидетельства изменения траекторий роста ГМ у детей с СД 1 типа получены и в других работах [54]. В целом области, находящиеся в стадии развития в момент влияния дисгликемии, более уязвимы, чем уже созревшие или созревающие позже [20]. Некоторые исследова-

тели обнаружили выраженные поражения ГМ у детей с СД 1 типа по данным магнитно-резонансной томографии, включая снижение плотности белого и серого вещества, а также уменьшение объема гиппокампа и миндалины [13]. Часто сообщаемый механизм, лежащий в основе КД, – это повреждение белого вещества ГМ, которое связано с более низкой скоростью обработки информации, что приводит к ухудшению обучения у детей и в конечном итоге к снижению IQ [20]. Дисгликемия, связанная с СД, также влияет на миелинизацию ГМ, поэтому наиболее частым когнитивным нарушением при СД 1 типа является снижение скорости психомоторных реакций, внимания и управляющих функций с более поздним уменьшением IQ [20]. Приводятся данные, согласно которым для развития аномалий ГМ на фоне СД 1 типа не требуется большого временного промежутка, они появляются у детей и подростков в течение 12–24 месяцев после постановки диагноза. Это позволяет предположить, что их возникновение не зависит от длительного воздействия повышенного уровня глюкозы в крови или от развития микрососудистых осложнений [41].

### Клинические проявления КД при СД 1 типа в детском возрасте

СД 1 типа с его микрососудистыми осложнениями, лечением инсулином и другими лекарственными препаратами клинически может вызывать нейрокогнитивную дисфункцию от легкой до тяжелой степени, которая в первую очередь является следствием структурных и функциональных изменений в ЦНС [41]. Оптимальных нейропсихологических тестов для оценки нарушений когнитивных функций при СД в педиатрической практике не существует [12]. «Краткая шкала оценки психического статуса» (или тест Фолштейна) и «Монреальская когнитивная шкала» – два наиболее популярных скрининговых теста для диагностики КД у подростков, применение же оценочных когнитивных шкал у детей младшего возраста имеет большие ограничения [12]. В связи с этим существование специфического когнитивного паттерна у пациентов с СД 1 типа до сих пор остается спорным [30].

Но так или иначе, пациенты с СД 1 типа имеют существенные проявления КД, которую можно диагностировать клинически [57]. Дети с СД 1 типа по сравнению со здоровыми имеют более низкие способности в большинстве когнитивных областей: память, управляющие функции и внимание [30, 45, 58, 59]. Например, в исследовании M.A. Cato et al., куда вошли 144 ребенка с СД 1

типа и 72 ребенка из контрольной группы в возрасте 4–10 лет, продемонстрировано, что выраженность хронической гипергликемии положительно коррелировала с нарушением обучения и памяти, а также управляющих функций [45]. В другой работе 68 детей с СД 1 типа в возрасте 6–17 лет были разделены на три группы в зависимости от уровня HbA1c ( $\leq 6,0$ – $7,5$  %,  $7,6$ – $8,5$  % и более  $8,6$  %); максимальные проявления КД, диагностируемые по «Шкале интеллекта Векслера – Бельвю» и по «Тесту на внимание Бриккенкампа и Зиллмера», были зафиксированы у детей из 3-й группы, с максимальными значениями HbA1c [60]. Китайскими исследователями показано, что подростки с СД 1 типа ( $n = 68$ ) имеют устойчивый дефицит внимания по сравнению со здоровыми подростками из контрольной группы ( $n = 85$ ), и данные нарушения продолжают сохраняться уже во взрослом возрасте [61].

Известно, что выраженность КД у пациентов с СД 1 типа зависит от возраста начала заболевания и его продолжительности [30]. Возраст дебюта СД 1 типа, по-видимому, является наиболее важным критерием, от которого зависит клиническая выраженность КД: чем раньше диагностирован СД у ребенка, тем сильнее будут проявления КД [29]. На функциональном уровне у пациентов наблюдается ухудшение памяти, уменьшение скорости обработки информации, а также снижение психомоторных и зрительно-пространственных функций [2, 30].

Два отличительных нейрокогнитивных фенотипа характеризуют детей и подростков с СД 1 типа [2, 41]. У детей с СД, развившимся в более раннем возрасте (в течение первых 5–7 лет жизни), существует тенденция к снижению результатов во всех когнитивных областях (включая обучение и память), они с большей вероятностью соответствуют критериям клинически значимых церебральных нарушений, имеют меньший объем серого и белого вещества ГМ, а также большее количество микроструктурных аномалий [2, 41]. Практически все исследования показали, что диагноз СД в возрасте до 7 лет является самым сильным фактором риска нейрокогнитивной дисфункции [2, 41]. С другой стороны, у детей, начало заболевания которых пришлось на возраст старше 7 лет, наблюдаются умеренные, относительно ограниченные когнитивные нарушения, которые чаще всего характеризуются снижением психомоторной скорости, а также умеренное снижение показателей по тестам академической успеваемости, с нормальными навыками обучения и запоминания [41].

## Заключение

Патогенез КД у детей и подростков на фоне СД 1 типа на данный момент до конца не ясен. У определенного количества детей с СД 1 типа может возникать повреждение ГМ, вызывающее нейрокогнитивный дефицит в детском возрасте [51]. Риск повреждения ГМ может быть больше у детей младшего возраста, так как именно период младшего детства является важным временным отрезком значительного развития ГМ и его миелинизации. В детском и подростковом возрасте СД 1 типа ассоциируется с высоким уровнем КД, которая негативно влияет на контроль за заболеванием и способствует снижению качества жизни пациентов [2, 29, 62]. Понимание процессов КД может улучшить как терапевтические, так и профилактические мероприятия при СД в педиатрической популяции [27, 62]. Такие меры могут включать стратегии для предотвращения ДКА, минимизации неблагоприятных проявлений дисгликемии, метаболические и эндокринные стратегии для защиты ГМ от гибели нейронов или церебральной дисфункции [27]. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы полностью выяснить связь между диабетической дисгликемией и КД [27]. Учитывая все вышеперечисленные проявления, важно вовремя выполнять скрининг у больных СД 1 типа на наличие КД, проводить ее профилактику и лечение [31]. Лучшее понимание патофизиологии КД у данного контингента больных имеет решающее значение для лечения СД 1 типа и предотвращения осложнений со стороны ЦНС.

## Список литературы / References

- Liu J., Fan W., Jia Y., Su X., Wu W., Long X., Sun X., Liu J., Sun W., Zhang T., ... Wang J. Altered gray matter volume in patients with type 1 diabetes mellitus. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2020;11:45. doi: 10.3389/fendo.2020.00045
- Pignalosa F.C., Desiderio A., Mirra P., Nigro C., Perruolo G., Ulianich L., Formisano P., Beguinot F., Miele C., Napoli R., Fiory F. Diabetes and cognitive impairment: a role for glucotoxicity and dopaminergic dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(22):12366. doi: 10.3390/ijms222212366
- Chen H.J., Lee Y.J., Huang C.C., Lin Y.F., Li S.T. Serum brain-derived neurotrophic factor and neurocognitive function in children with type 1 diabetes. *J. Formos. Med. Assoc.* 2021;120(1 Pt 1):157–164. doi: 10.1016/j.jfma.2020.04.011
- He J., Li S., Liu F., Zheng H., Yan X., Xie Y., Li X., Zhou Z., Zhu X. Glycemic control is related to cognitive dysfunction in Chinese children with type 1 diabetes mellitus. *J. Diabetes*. 2018;10(12):948–957. doi: 10.1111/1753-0407.12775
- Kanikarla-Marie P., Jain S.K. Hyperketonemia and ketosis increase the risk of complications in type 1 diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 2016;95:268–277. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.020
- Green A., Hede S.M., Patterson C.C., Wild S.H., Imperatore G., Roglic G., Beran D. Type 1 diabetes in 2017: global estimates of incident and prevalent cases in children and adults. *Diabetologia*. 2021;64(12):2741–2750. doi: 10.1007/s00125-021-05571-8
- Rasmussen V.F., Jensen T.S., Tankisi H., Karlsson P., Vestergaard E.T., Kristensen K., Nyengaard J.R., Terkelsen A.J. Large fibre, small fibre and autonomic neuropathy in adolescents with type 1 diabetes: A systematic review. *J. Diabetes Complications*. 2021;35(11):108027. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2021.108027
- Stanescu D.E., Lord K., Lipman T.H. The epidemiology of type 1 diabetes in children. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2012;41:679–694. doi: 10.1016/j.ecl.2012.08.001
- Powers A.C. Type 1 diabetes mellitus: much progress, many opportunities. *J. Clin. Invest.* 2021;131(8):e142242. doi: 10.1172/JCI142242
- Seaquist E.R. The impact of diabetes on cerebral structure and function. *Psychosom. Med.* 2015;77(6):616–621. doi: 10.1097/PSY.0000000000000207
- Silva R.A.E., Ganen A.P., Fernandes V.F.T., Evangelista N.M.A., Figueiredo C.C., Pacheco L.A., Colares Neto G.P. Evaluation of sleep characteristics of children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Rev. Paul. Pediatr.* 2021;40:e2020407. doi: 10.1590/1984-0462/2022/40/2020407
- Zilliox L.A., Chadrasekaran K., Kwan J.Y., Russell J.W. Diabetes and cognitive impairment. *Curr. Diab. Rep.* 2016;16(9):87. doi: 10.1007/s11892-016-0775-x
- Toprak H., Yetis H., Alkan A., Filiz M., Kurtcan S., Aralasmak A., Aksu M.Ş., Cesur Y. Relationships of DTI findings with neurocognitive dysfunction in children with type 1 diabetes mellitus. *Br. J. Radiol.* 2016;89(1059):20150680. doi: 10.1259/bjr.20150680
- Dimeglio L.A., Evans-Molina C., Oram R.A. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018;391:2449–2462. doi: 10.1016/s0140-6736(18)31320-5
- White N.H. Long-term outcomes in youths with diabetes mellitus. *Pediatr. Clin. North. Am.* 2015;62(4):889–909. doi: 10.1016/j.pcl.2015.04.004
- Bjornstad P., Donaghue K.C., Maahs D.M. Macrovascular disease and risk factors in youth with type 1 diabetes: time to be more attentive to treatment? *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(10):809–820. doi: 10.1016/S2213-8587(18)30035-4
- Jin C.Y., Yu S.W., Yin J.T., Yuan X.Y., Wang X.G. Corresponding risk factors between cognitive impairment and type 1 diabetes mellitus:

A narrative review. *Heliyon*. 2022; 8(8):e10073. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10073

18. Wolf V., Abdul Y., Ergul A. Novel targets and interventions for cognitive complications of diabetes. *Front. Physiol.* 2022;12:815758. doi: 10.3389/fphys.2021.815758

19. Lyoo I.K., Yoon S., Renshaw P.F., Hwang J., Bae S., Musen G., Kim J.E., Bolo N., Jeong H.S., Simonson D.C., ... Jacobson A.M. Network-level structural abnormalities of cerebral cortex in type 1 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2013;8(8):e71304. doi: 10.1371/journal.pone.0071304

20. Schwartz D.D., Wasserman R., Powell P.W., Axelrad M.E. Neurocognitive outcomes in pediatric diabetes: a developmental perspective. *Curr. Diab. Rep.* 2014;14(10):533. doi: 10.1007/s11892-014-0533-x

21. Siller A.F., Lugar H., Rutlin J., Koller J.M., Semenkovich K., White N.H., Arbelaez A.M., Shimony J., Hershey T. Severity of clinical presentation in youth with type 1 diabetes is associated with differences in brain structure. *Pediatr. Diabetes*. 2017;18(8):686–695. doi: 10.1111/pedi.12420

22. van Sloten T.T., Sedaghat S., Carnethon M.R., Launer L.J., Stehouwer C.D. A. Cerebral microvascular complications of type 2 diabetes: stroke, cognitive dysfunction, and depression. *Lancet Diab. Endocrinol.* 2020; 8: 325–336. doi: 10.1016/S2213-8587(19)30405-X

23. Liu H., Yu S., Xu W., Xu J. Enhancement of 26S proteasome functionality connects oxidative stress and vascular endothelial inflammatory response in diabetes mellitus. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* 2012;32:2131–2140. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.253385

24. Ahmad R., Chowdhury K., Kumar S., Irfan M., Reddy G.S., Akter F., Jahan D., Haque M. Diabetes mellitus: a path to amnesia, personality, and behavior change. *Biology (Basel)*. 2022;11(3):382. doi: 10.3390/biology11030382

25. Lin L., Wu Y., Chen Z., Huang L., Wang L., Liu L. Severe hypoglycemia contributing to cognitive dysfunction in diabetic mice is associated with pericyte and blood-brain barrier dysfunction. *Front. Aging Neurosci.* 2021;13:775244. doi: 10.3389/fnagi.2021.775244

26. Embury C.M., Wiesman A.I., Proskovec A.L., Heinrichs-Graham E., McDermott T.J., Lord G.H., Brau K.L., Drincic A.T., Desouza C.V., Wilson T.W. Altered brain dynamics in patients with type 1 diabetes during working memory processing. *Diabetes*. 2018;67(6):1140–1148. doi: 10.2337/db17-1382

27. Cameron F.J., Northam E.A., Ryan C.M. The effect of type 1 diabetes on the developing brain. *Lancet Child Adolesc. Health*. 2019;3(6):427–436. doi: 10.1016/S2352-4642(19)30055-0

28. Tonoli C., Heyman E., Roelands B., Pattyn N., Buyse L., Piacentini M.F., Berthoin S., Meeusen R. Type 1 diabetes-associated cognitive decline: a meta-analysis and update of the current literature. *J. Diabetes*. 2014;6(6):499–513. doi: 10.1111/1753-0407.12193

29. Cameron F.J. The impact of diabetes on brain function in childhood and adolescence. *Pediatr. Clin. North. Am.* 2015;62(4):911–927. doi: 10.1016/j.pcl.2015.04.003

30. Shalimova A., Graff B., Gąsecki D., Wolf J., Sabisz A., Szurowska E., Jodzio K., Narkiewicz K. Cognitive dysfunction in type 1 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019;104:2239–2249. doi: 10.1210/je.2018-01315

31. Luna R., Manjunatha T.R., Bollu B., Jhaveri S., Avanthika C., Reddy N., Saha T., Gandhi F. A comprehensive review of neuronal changes in diabetics. *Cureus*. 2021;13(10):e19142. doi: 10.7759/cureus.19142

32. Roh E., Song D.K., Kim M.S. Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Exp. Mol. Med.* 2016;48(3):e216. doi: 10.1038/emm.2016.4

33. Jaser S.S., Jordan L.C. Brain health in children with type 1 diabetes: risk and protective factors. *Curr. Diab. Rep.* 2021;21(4):12. doi: 10.1007/s11892-021-01380-w

34. Janez A., Guja C., Mitrakou A., Lalic N., Tankova T., Czupryniak L., Tabák A.G., Prazny M., Martinka E., Smircic-Duvnjak L. Insulin therapy in adults with type 1 diabetes mellitus: a narrative review. *Diabetes Ther.* 2020;11:387–409. doi: 10.1007/s13300-019-00743-7

35. Ryan C.M. Long-term effects of hypoglycaemia on cognitive function in diabetes. In: *Hypoglycaemia in Clinical Diabetes*. Eds. B.M. Frier, S.R. Heller, R.J. McCrimmon. Chichester: Wiley-Blackwell, 2014. P. 285–304.

36. Jackson D. A., Michael T., Vieira de Abreu A., Agrawal R., Bortolato M., Fisher S.J. Prevention of severe hypoglycemia-induced brain damage and cognitive impairment with verapamil. *Diabetes*. 2018;67:2107–2112. doi: 10.2337/db18-0008

37. Aberdeen H., Battles K., Taylor A., Garner-Donald J., Davis-Wilson A., Rogers B.T., Cavalier C., Williams E.D. The aging vasculature: glucose tolerance, hypoglycemia and the role of the serum response factor. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2021;8:58. doi: 10.3390/jcdd8050058

38. Blasetti A., Chiuri R.M., Tocco A.M., Giulio C.D., Mattei P.A., Ballone E., Chiarelli F., Verrotti A. The effect of recurrent severe hypoglycemia on cognitive performance in children with type 1 diabetes: a meta-analysis. *J. Child. Neurol.* 2011;26(11):1383–1391. doi: 10.1177/0883073811406730

39. Koepsell H. Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflugers Arch.* 2020;472:1299–1343. doi: 10.1007/s00424-020-02441-x 64

40. Rehni A.K., Dave K.R. Impact of hypoglycemia on brain metabolism during diabetes. *Mol. Neurobiol.* 2018;55:9075–9088. doi: 10.1007/s12035-018-1044-6

41. Ryan C.M., van Duinkerken E., Rosano C. Neurocognitive consequences of diabetes. *Am. Psychol.* 2016;71(7):563–576. doi: 10.1037/a0040455

42. Luo X., Wu J., Jing S., Yan L.J. Hyperglycemic stress and carbon stress in diabetic glucotoxicity. *Aging Dis.* 2016;7(1):90–110. doi: 10.14336/AD.2015.0702
43. Sergi D., Renaud J., Simola N., Martinoli M.G. Diabetes, a contemporary risk for parkinson’s disease: epidemiological and cellular evidences. *Front. Aging Neurosci.* 2019;11:302. doi: 10.3389/fnagi.2019.00302
44. Filip P., Canna A., Moheet A., Bednarik P., Grohn H., Li X., Kumar A.F., Olawsky E., Eberly L.E., Seaquist E.R., Mangia S. Structural alterations in deep brain structures in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2020;69(11):2458–2466. doi: 10.2337/db19-1100
45. Cato M.A., Mauras N., Ambrosino J., Bondurant A., Conrad A.L., Kollman C., Cheng P., Beck R.W., Ruedy K.J., Aye T., ... Diabetes Research in Children Network (DirecNet). Cognitive functioning in young children with type 1 diabetes. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2014;20(2):238–247. doi: 10.1017/S1355617713001434
46. Li W., Huang E., Gao S.J. Type 1 diabetes mellitus and cognitive impairments: a systematic review. *J. Alzheimers Dis.* 2017;57:29–36. doi: 10.3233/JAD-161250
47. Tomkins M., McCormack R., O’Connell K., Agha A., Merwick A. Metabolic encephalopathy secondary to diabetic ketoacidosis: a case report. *BMC Endocr. Disord.* 2019;19:71. doi: 10.1186/s12902-019-0398-8
48. Jessup A.B., Grimley M.B., Meyer E., Passmore G.P., Belger A., Hoffman W.H., Çalıkoğlu A.S. Effects of diabetic ketoacidosis on visual and verbal neurocognitive function in young patients presenting with new-onset type 1 diabetes. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* 2015;7(3):203–210. doi: 10.4274/jcrpe.2158
49. Ghetti S., Kuppermann N., Rewers A., Myers S.R., Schunk S.E., Stoner M.J., Garro A., Quayle K.S., Brown K.M., Trainor J.L., ... Pediatric Emergency Care Applied Research Network (PECARN) DKA FLUID Study Group. Cognitive function following diabetic ketoacidosis in children with new-onset or previously diagnosed type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2020;43:2768–2775. doi: 10.2337/dc20-0187
50. McCrimmon R.J., Ryan C.M., Frier B.M. Diabetes and cognitive dysfunction. *Lancet.* 2012; 379: 2291–2299. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60360-2
51. Nunley K.A., Rosano C., Ryan C.M., Jennings J.R., Aizenstein H.J., Zgibor J.C., Costacou T., Boudreau R.M., Miller R., Orchard T.J., Saxton J.A. Clinically relevant cognitive impairment in middle-aged adults with childhood-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2015; 38: 1768–1776. doi: 10.2337/dc15-0041
52. Musen G., Tinsley L.J., Marcinkowski K.A., Pober D., Sun J.K., Khatri M., Huynh R., Lu A., King G.L., Keenan H.A. Cognitive function deficits associated with long-duration type 1 diabetes and vascular complications. *Diabetes Care.* 2018; 41: 1749–1756. doi: 10.2337/dc17-1955
53. Barnea-Goraly N., Raman M., Mazaika P., Marzelli M., Hershey T., Weinzimer S.A., Aye T., Buckingham B., Mauras N., White N.H., ... Reiss A.L. Diabetes Research in Children Network (DirecNet). Alterations in white matter structure in young children with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2014;37(2):332–340. doi: 10.2337/dc13-1388
54. Mauras N., Mazaika P., Buckingham B., Weinzimer S., White N.H., Tsalikian E., Hershey T., Cato A., Cheng P., Kollman C., ... Diabetes Research in Children Network (DirecNet). Longitudinal assessment of neuroanatomical and cognitive differences in young children with type 1 diabetes: association with hyperglycemia. *Diabetes.* 2015; 64: 1770–1779. doi: 10.2337/db14-1445
55. Arbelaez A.M., Semenkovich K., Hershey T. Glycemic extremes in youth with T1DM: the structural and functional integrity of the developing brain. *Pediatr. Diabetes.* 2013;14(8):541–553. doi: 10.1111/pedi.12088
56. Aye T., Reiss A.L., Kesler S., Hoang S., Drobny J., Park Y., Schleifer K., Baumgartner H., Wilson D.M., Buckingham B.A. The feasibility of detecting neuropsychologic and neuroanatomic effects of type 1 diabetes in young children. *Diabetes Care.* 2011;34:1458–1462. doi: 10.2337/dc10-2164
57. He J., Ryder A.G., Li S., Liu W., Zhu X. Glycemic extremes are related to cognitive dysfunction in children with type 1 diabetes: A meta-analysis. *J. Diabetes Investig.* 2018(a);9(6):1342–1353. doi: 10.1111/jdi.12840
58. Duke D.C., Harris M.A. Executive function, adherence, and glycemic control in adolescents with type 1 diabetes: a literature review. *Curr. Diab. Rep.* 2014;14(10):532. doi: 10.1007/s11892-014-0532-y
59. Lin A., Northam E.A., Werther G.A., Cameron F.J. Risk factors for decline in IQ in youth with type 1 diabetes over the 12 years from diagnosis/illness onset. *Diabetes Care.* 2015;38(2):236–242. doi: 10.2337/dc14-1385
60. Stanisławska-Kubiak M., Mojs E., Wójciak R.W., Piasecki B., Matecka M., Sokalski J., Kopczyński P., Fichna P. An analysis of cognitive functioning of children and youth with type 1 diabetes (T1DM) in the context of glycemic control. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2018;22(11):3453–3460. doi: 10.26355/eurrev\_201806\_15170
61. Zou W., He J., Liu Y., Zhu J., Liu F., Xie Y., Li C., Du H., Huang F., Zhou Z., Li X., Zhu X. Sustained attention deficits in adults with juvenile-onset type 1 diabetes mellitus. *Psychosom. Med.* 2021;83(8):906–912. doi: 10.1097/PSY.0000000000000992
62. Limbers C.A., Emery K., Young D., Stephen M. Cognitive functioning, metabolic control, and treatment type in youth with type 1 diabetes. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2015;28(3-4):353–355. doi: 10.1515/jpem-2014-0317

**Сведения об авторах:**

**Юрий Витальевич Быков**, к.м.н., ORCID: 0000-0003-4705-3823, e-mail: yubkov@gmail.com

**Владимир Александрович Батурин**, д.м.н., ORCID: 0000-0002-6892-3552, e-mail: prof.baturin@gmail.com

**Information about the authors:**

**Yuri V. Bykov**, candidate of medicine sciences, ORCID: 0000-0003-4705-3823, e-mail: yubkov@gmail.com

**Vladimir A. Baturin**, doctor of medicine sciences, ORCID: 0000-0002-6892-3552, e-mail: prof.baturin@gmail.com

*Поступила в редакцию 11.09.2022*

*После доработки 02.12.2022*

*Принята к публикации 20.12.2022*

*Received 11.09.2022*

*Revision received 02.12.2022*

*Accepted 20.12.2022*

## История изучения нервного гребня (обзор)

Н.Ю. Пахомова, Е.Л. Строкова, А.А. Корыткин, В.В. Кожевников, А.Ф. Гусев,  
А.М. Зайдман

*Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России  
630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17*

### Резюме

Нервный гребень давно привлекает внимание биологов, занимающихся вопросами эволюционного развития, а в последнее время – и клинических специалистов, поскольку исследования последних десятилетий значительно расширили границы познания об участии нервного гребня и его клеток в развитии патологии человека. Нервный гребень и клетки нервного гребня – это уникальная эволюционно-обоснованная эмбриональная структура. Его открытие полностью изменило видение процесса эмбриогенеза. Знания о развитии нервного гребня проливают свет на многие из самых «устоявшихся» вопросов биологии развития и эволюции. В статье отражены исторические этапы открытия и изучения нервного гребня и влияние этого открытия на укоренившиеся представления о специфичности зародышевых листков и теории зародышевых слоев – рассуждения о нервном гребне как четвертом зародышевом листке. **Целью** настоящего обзора является описание истории открытия и изучения нервного гребня и его клеток на основе анализа литературных данных. При написании статьи выполнен анализ научных литературных источников по поисковым словосочетаниям «нервный гребень», «клетки нервного гребня», «морфология клеток нервного гребня», «зародышевые листки», «эмбриональное развитие» в базах данных PubMed, Scopus, Web of Science, eLibrary. Глубина аналитического поиска соответствует периоду открытия нервного гребня и первому упоминанию его как эмбриональной морфологической структуры в научной литературе. Представленная информация подтверждает высокий интерес ученых-исследователей и клинических специалистов в изучении нервного гребня и его клеток. Особое внимание в последние десятилетия уделяется участию клеток нервного гребня в формировании соматических патологий и патологий костно-мышечной системы. Источники литературы представлены 169 полнотекстовыми рукописями и монографиями в основном на английском языке. **Заключение.** Нервный гребень и его клетки являются уникальными эволюционными структурами. Закономерности образования, причины, обуславливающие процесс миграции, дифференцировки, взаимодействия клеток нервного гребня с другими структурами в эмбриогенезе, а также их потенциал, который реализуется в постнатальном периоде, продолжает быть предметом исследования и в настоящее время.

**Ключевые слова:** клетки нервного гребня, нервный гребень, зародышевые листки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Гусев А.Ф., e-mail: agusev@niito.ru

**Для цитирования:** Пахомова Н.Ю., Строкова Е.Л., Корыткин А.А., Кожевников В.В., Гусев А.Ф., Зайдман А.М. История изучения нервного гребня (обзор). *Сибирский научный медицинский журнал.* 2023;43(1):13–29. doi: 10.18699/SSMJ20230102

## History of the study of the neural crest (review)

N.Yu. Pakhomova, E.L. Stroкова, A.A. Korytkin, V.V. Kozhevnikov, A.F. Gusev,  
A.M. Zaydman

*Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsivyan of Minzdrav of Russia  
630091, Novosibirsk, Frunze str., 17*

### Abstract

The neural crest has long attracted the attention of evolutionary biologists and, more recently, clinical specialists, as research in recent decades has significantly expanded the boundaries of knowledge about the involvement of neural crest and neural crest cells in the development of human pathology. The neural crest and neural crest cells are a unique evolutionarily based embryonic structure. Its discovery completely changed the view of the process of embryogenesis.

Knowledge of neural crest development sheds light on many of the most “established” questions of developmental biology and evolution. Our article will reflect on the historical stages of the discovery and study of the neural crest and the impact of this discovery on entrenched ideas about germ layer specificity and the theory of germ layers - the reasoning of the neural crest as the fourth germ layer. **The aim** of this review is to describe the history of the discovery and study of neural crest and neural crest cells based on an analysis of the literature. In writing this article, an analysis of the scientific literature was conducted using the search terms “neural crest,” “neural crest cells,” “neural crest cell morphology,” “germinal layers,” and “embryonic development” in the computer databases PubMed, Scopus, Web of Science, and eLibrary. The depth of the analytical search corresponds to the period of the discovery of the neural crest and the first mention of the neural crest as an embryonic morphological structure in the scientific literature. The information presented confirms the high interest of research scientists and clinical specialists in the study of neural crest and neural crest cells. The involvement of neural crest cells in the formation of somatic and musculoskeletal pathologies has received particular attention in recent decades. The literature sources are represented by 169 full-text manuscripts and monographs mainly in English. **Conclusions.** Neural crest and neural crest cells are unique evolutionary structures. Regularities of formation, reasons which condition migration, differentiation, interaction of neural crest cells with other structures during embryogenesis as well as their potential, which is realized in postnatal period, continue to be the subject of research up to now.

---

**Key words:** neural crest cells, neural crest, germinal layers.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Corresponding author:** Gusev A.F., e-mail: agusev@niito.ru

**Citation:** Pakhomova N.Yu., Strokova E.L., Korytkin A.A., Kozhevnikov V.V., Gusev A.F., Zaydman A.M. History of the study of the neural crest (review). *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(1):13–29. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230102

## Введение

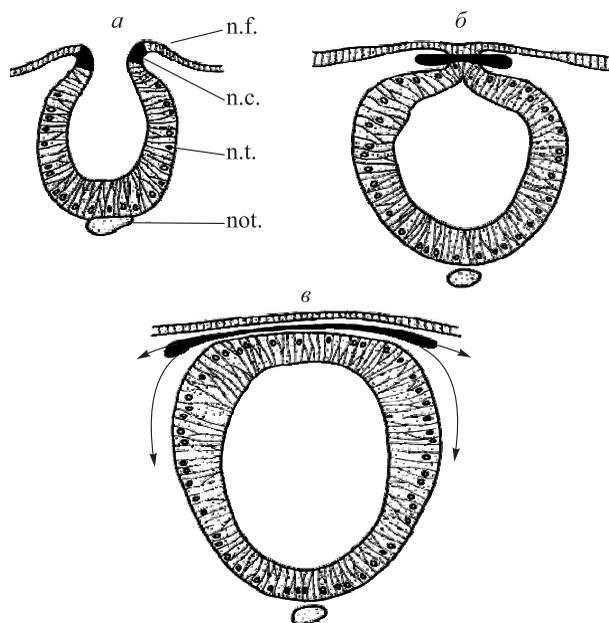
Нервный гребень давно привлекает внимание биологов, занимающихся вопросами эволюционного развития [1], а в последнее время – и клинических специалистов, поскольку исследования последнего десятилетия значительно расширили границы познания об участии нервного гребня и его клеток в развитии патологии человека [2]. Нервный гребень – это морфологический термин – название, данное складке нейральной эктодермы на стыке между нейральной и эпидермальной эктодермой у эмбрионов позвоночных на стадии нейрулы [3].

Нервный гребень состоит из особой популяции клеток, которые дают начало поразительному количеству типов клеток и столь же удивительному числу тканей и органов [3]. Все зародышевые слои на стадии бластулы изначально являются эпителиальными. За некоторыми исключениями, эндодерма и эктодерма и их производные остаются эпителиальными. Однако мезодерма и нервный гребень (третий и четвертый зародышевые слои) расслаиваются как мезенхимальные клетки после прохождения эпителиально-мезенхимальной трансформации. Для того чтобы произошло отслоение, этому предшествуют клеточные процессы – потеря межклеточных адгезий, растворение базальной пластинки, изменение полярности клеток и начало миграции – эпителиальные клетки в дорсальной нервной трубке теряют свою эпи-

телиальную организацию, трансформируются в мезенхимальный фенотип и покидают нервную трубку в виде мезенхимальных клеток [3].

На рис. 1 представлены последовательные стадии миграции клеток нервного гребня, отражены эмбриональные структуры и пути, которые проходят клетки нервного гребня [4].

Прежнее название нервного гребня, эктомезенхима, описывает его происхождение, а не локализацию, поскольку это эктодермальное производное, которое дает начало широкому спектру мезенхимальных структур [5]. Нервный гребень возникает во время гастролы из широкой полумесячной зоны в области эктодермы, которая характеризуется экспрессией BMP4. Он берет начало из эктодермы на стыке не-нейральной эктодермы и предполагаемой нейральной эктодермы. Эти две ткани взаимодействуют, чтобы инициировать «образование» нервного гребня. Секретируемые эктодермой белки BMP4 и BMP7 индуцируют экспрессию белков slug и Rhob в клетках, которые становятся нервным гребнем, и в отсутствие одного из них клетки нервного гребня не могут покинуть нервную трубку [4]. Белок Rhob участвует в образовании цитоскелетных элементов, необходимых для миграции клеток нервного гребня [3]. Нервный гребень впервые виден как утолщенная область непосредственно перед закрытием нервной трубки. Когда нервная трубка закрывается, нервный гребень становится между



**Рис. 1.** Срезы нервной трубки на трех последовательных стадиях для иллюстрации происхождения нервного гребня. Стрелками показаны пути, пройденные мигрирующими клетками нервного гребня. n.c. – нервный гребень; n.f. – нервная складка; n.t. – нервная трубка; not – нотохорд [4]

**Fig. 1.** Sections through the neural tube at three consecutive stages to illustrate the origin of the neural crest. Arrows show the paths taken by the migrating neural crest cells. n.c. – neural crest; n.f. – neural fold; n.t. – neural tube; not – notochord [4]

ней и вышележащей эктодермой, и по мере того, как ткани отделяются друг от друга, клетки нервного гребня оседают на дорсальной поверхности нервной трубки [4].

Формирование и последующее развитие нервного гребня происходят от головной части эмбриона к хвостовой. Как правило, определяются три основные области нервного гребня:

1) краниальный (cranial) нервный гребень, который лежит впереди сомитов и дает начало скелетным структурам лица, меланоцитам, нейронам, ганглиям и глиальным клеткам;

2) вагальный (vagal) нервный гребень, который связан с 1-й по 7-ю пару сомитов, дает начало энтеральным нейронам кишечника, меланоцитам и т.д. и включает сердечный нервный гребень, который дает начало компонентам сердца, в том числе в сердечной перегородке (на уровне 1–3-й пары сомитов);

3) туловищный (trunk and tail) нервный гребень (симпатические нейроны), который лежит после 8-й пары сомитов и включает адренальный (adrenal) нервный гребень на уровне 18–24-й

пары сомитов (формируется медуллярная ткань надпочечников).

Огромный спектр типов клеток служит важным источником доказательств того, что нервный гребень является зародышевым листком, что позволяет довести число зародышевых листков до четырех: эктодерма, энтодерма, мезодерма и нервный гребень [6].

Целью настоящего обзора является описание истории открытия и изучения нервного гребня и клеток нервного гребня на основе анализа литературных данных. При его написании выполнен анализ научных литературных источников по поисковым словосочетаниям «нервный гребень», «клетки нервного гребня», «морфология клеток нервного гребня», «зародышевые листки», «эмбриональное развитие» в компьютерных базах данных PubMed, Scopus, Web of Science, eLibrary. Глубина аналитического поиска соответствует периоду открытия нервного гребня и первому упоминанию его как эмбриональной морфологической структуры в научной литературе.

Представленная информация подтверждает высокий интерес ученых-исследователей и клинических специалистов в изучении нервного гребня и его клеток. Особое внимание в последние десятилетия уделяется участию клеток нервного гребня в формировании соматических патологий и патологий костно-мышечной системы. Источники литературы представлены 169 полнотекстовыми рукописями и монографиями в основном на английском языке.

### Исторические периоды открытия и изучения нервного гребня

Хронология открытия, изучения нервного гребня и его клеток охватывает три столетия. Этот достаточно значимый промежуток времени насыщен весомыми результатами, которые практически изменили видение и понимание биологии развития и эмбриологии позвоночных.

1874–1879 гг.

Морфологическое описание нервного гребня впервые в эмбриологии появилось благодаря В. Гису (W. His), профессору анатомии и физиологии (Базель, Швейцария). В 1868 г. он идентифицировал полосу клеток, расположенную между развивающейся нервной трубкой и будущей эпидермальной эктодермой, как источник спинного и черепного ганглиев у куриных эмбрионов и назвал ее «Zwischenstrang» – «промежуточный канатик» [7]. В 1874 г. В. Гис включил Zwischenstrang – нервный гребень, каким мы его знаем сейчас, в число органообразующих зародышевых областей [8].

В научной литературе термин «нервный гребень» («neural crest») впервые использовал в 1879 г. в статье о развитии органа обоняния А.М. Маршалл (A.M. Marshall), профессор зоологии в колледже Оуэнс, Манчестер [9]. В работе о развитии черепных нервов у куриных эмбрионов [10] ученый использовал термин «нервный хребет» («neural ridge») для обозначения клеток, дающих начало черепным и спинномозговым ганглиям. Понимая, что данный термин менее описателен, чем хотелось бы, год спустя он заменил его термином «нервный гребень» («neural crest») [3]. «Пользуясь случаем, я хочу внести небольшое изменение в номенклатуру, принятую в моей предыдущей работе. Там я предложил термин “нервный хребет” (neural ridge) для обозначения продольного ряда клеток, который вырастает из угла повторного входа между наружным эпибластом и невральным каналом, и из которого возникают черепные или спинномозговые нервы. Поскольку этот хребет (ridge) появляется до закрытия нервного канала, очевидно, что существует два нервных хребта (neural ridges), по одному с каждой стороны; но я также применяю тот же термин, нервный хребет (neural ridge), к единственному выросту, образующемуся в результате слияния нервных хребтов (neural ridges) с обеих сторон после полного закрытия нервного канала и после того, как наружный эпибласт полностью отделился от нервного канала. Я предлагаю в будущем говорить об этом единственном срединном выросте как о нервном гребне (neural crest), ограничивая термин нервный хребет (neural ridge) прежним употреблением» [3].

В. Гис и А.М. Маршалл описали нервный гребень как источник черепных и спинномозговых ганглиев и нейронов, что было принято другими исследователями, поскольку эти типы клеток и нервный гребень связаны с дорсальной нервной трубкой, источником дорсальной нервной системы.

#### 1890–1900 гг.

В 1890-х годах Дж.Б. Платт (J.B. Platt) утверждала, что черепно-лицевые и глоточные хрящи и дентинообразующие клетки (одонтобласты) *Necturus maculosus* возникли из эктодермы, прилегающей к нервной трубке [11, 12]. Этот вывод не был принят, поскольку противоречил укоренившейся теории зародышевого слоя того времени, согласно которой скелетные ткани возникли из мезодермы, а не из эктодермы [3]. Период XX в. представлен исследованиями, в которых нервный гребень был обозначен основным источником мезенхимы, соединительной ткани, хряща и не только. Проводились многочисленные рабо-

ты по изучению влияния окружающих тканей на миграцию, дифференцировку клеток нервного гребня. Морфологические исследования выявили плюрипотентность клеток нервного гребня в процессе их дальнейшей дифференцировки.

#### 1920–1940 гг.

Исследовательские работы L.S. Stone [13] и C.P. Raven [14], демонстрировавшие происхождение скелетных тканей из нервного гребня, отражали результаты изысканий многих эмбриологов этого исторического периода.

#### 1940–1960 гг.

Еще более подробные результаты, свидетельствующие, что клетки нервного гребня дифференцируются в остеобласты у *Ambystoma*, были представлены в работах S. Sellman [15], G.R. de Beer [16]. Несмотря на эти исследования, до 1950-х годов интерес эволюционистов был сосредоточен на нервном гребне как источнике пигментных клеток (хроматофоров) [17–19] и нейронных элементов, таких как спинальные ганглии [3]. Важной вехой на пути к пониманию нервного гребня является монография S. Horstadius [20]. Опубликованная в 1950 г., через 82 года после открытия нервного гребня, она была переиздана в 1969 и 1988 гг. [3]. В своей работе S. Horstadius представляет обширное экспериментальное исследование происхождения черепно-лицевых хрящей и дентина у *Amblystoma mexicanum* [21] и убедительные доказательства вклада нервного гребня в развитие перепончатой кости черепа [22]. Работы D.R. Newth затрагивали концепцию влияния клеток нервного гребня на формирование зародышевых листков у *Lampetra fluviatilis* [23, 24].

#### 1960–1980 гг.

В 1960-х годах начались исследования механизмов миграции клеток нервного гребня и перехода от эмбрионов амфибий к эмбрионам птиц в качестве выбранных организмов [3]. Новое направление в изучении нервного гребня и его клеток открыли фундаментальные исследования J.A. Weston [25, 26], M.C. Johnston [27] и J. Holtfreter [28] по миграции стволовых и черепных клеток нервного гребня у куриных эмбрионов, исследования P. Chibon [29] влияния нервного гребня на формирование скелета у *Pleurodeles waltlii*, открытие и использование ядерного маркера перепелов N.M. Le Douarin [30], а также фундаментальная работа J.A. Weston по миграции и дифференцировке клеток нервного гребня [31, 32].

Подробное изучение клеток нервного гребня выполнено в 1970-х годах. Установлено, что микроокружение, в котором они находятся, является

основным фактором, определяющим их миграцию, дифференцировку и морфогенез у нормальных эмбрионов и у эмбрионов с аномалиями, возникшими в результате мутаций или воздействия тератогенов [33–36].

*1980–1999 гг.*

Исследование нервного гребня и его клеток в этот период времени не ограничивалось только морфологическими исследованиями. Спектр изучения расширился знаниями о причине миграции клеток нервного гребня, факторах, влияющих на формирование миграционного пути, а также микроокружения, которое оказывает взаимомодулирующее влияние на дальнейшую дифференцировку клеток нервного гребня. Результаты многогранных исследований этого времени масштабны. Но мы позволили себе определить следующие направления этих изысканий, возможно, допуская погрешность в указании не всех существующих работ представленных направлений.

Изучению клеточно-молекулярной структуры нервного гребня посвящены работы E. Dupin et al. [37], в которых описаны следующие последовательности клеточных изменений: клетки нервного гребня удлиняются и перемещают свои органеллы в базальную область эпителия; утрачиваются апикальные контакты между клетками, что приводит к развитию стратифицированного эпителия с базальными свободными вытянутыми клетками [38]; отростки базальных клеток проникают в базальную пластинку, которая затем деградирует или нарушается, позволяя им освободиться от нейроэпителия; апикальные клетки формируют новую базальную пластинку [39, 40].

Дальнейшие исследования по изучению происхождения и морфогенеза клеток нервного гребня выявили следующее: незадолго до выхода из нервной трубки клетки нервного гребня уплощаются и переориентируются таким образом, что самая длинная ось каждой из них располагается под прямым углом к оси эмбриона, происходит уменьшение межклеточных пространств [41, 42]. Экспрессия эндогенных галактозидсвязывающих лектинов увеличивается во время миграции клеток нервного гребня и снижается при их адгезии, совпадая с экспрессией NCAM и кадгеринов. Экспрессия и/или снижение регуляции молекул клеточной адгезии необходимы для последовательности событий, которые инициируют мезенхимальную миграцию клеток и контролируют эпителиально-мезенхимальную трансформацию. Для индукции последней требуется по меньшей мере четыре процесса: уменьшение адгезии клеток; снижение экспрессии NCAM; утрата Cad2; модуляция экспрессии интегринов, семейства

трансмембранных рецепторов, связывающих фибронектин, ламинин, коллаген I типа и другие компоненты внеклеточного матрикса, с которыми сталкиваются мигрирующие клетки [43–45].

На клеточном уровне во время эпителиально-мезенхимальной трансформации происходит снижение регуляции адгезивных соединений и десмосом, массивная перестройка цитоскелета и ремоделирование актина, большая часть которого находится под контролем членов ГТФаз семейства Rho или взаимодействия Ras-Rho и требуется для инициирования эпителиально-мезенхимальной трансформации [46]; ее сроки регулирует Cad6B. Клетки нервного гребня, особенно его ствола (TNCCs), нуждаются в бесклеточных пространствах, через которые они могут мигрировать. Гиалуронан, также известный как гиалуриновая кислота, представляет собой чередующийся полимер глюкоуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина, соединенных 1–3 связями. На ранних стадиях развития гиалуронан участвует в поднятии и закрытии нервных складок. Внеклеточный матрикс вокруг нервных складок богат гиалуронаном. Впоследствии, благодаря разнообразным связывающим доменам, гиалуронан взаимодействует по меньшей мере с 30 генами. Взаимодействия гиалуронана с версиканом или сам версикан (белок внеклеточного матрикса) могут регулировать эпителиально-мезенхимальную трансформацию. Гиалуронан вовлечен в отслоение клеток нервного гребня от нервной трубки (особенно в стволе) и в открытии пространств, через которые мигрируют TNCCs [47–49]. Ингибиторы протеинкиназ могут инициировать эпителиально-мезенхимальную трансформацию, необходимую для расслаивания нервного гребня. Клетки нервного гребня также вырабатывают протеазы, такие как активатор плазминогена, которые помогают создавать пространства, через которые они мигрируют [50]. Металлопротеиназы становятся регуляторами как при трансформации клеток нервного гребня из эпителиальных в мезенхимальные, так и при миграции. Матриксная металлопротеаза-2 (Mmp2) экспрессируется в клетках нервного гребня, когда они отделяются от нервной трубки [51].

Особое внимание уделялось исследованию формирования миграционного пути клеток нервного гребня. Миграция клеток из нервной трубки происходит волнообразно от передней к задней части тела [52–54]. Важно, что она следует непосредственно за волной сегментации сомитов, каждая пара сомитов влияет на выброс клеток нервного гребня в своей окрестности, воздействуя на взаимосвязь BMP4 и его ингибитора noggin [4]. BMP4 играет важную роль в высвобождении клеток нервного гребня из нервной

трубки [55–58]. Клетки краниального нервного гребня (CNCCs) мигрируют в потоках и колонизируют верхнечелюстной, нижнечелюстной, срединный и латеральный носовые отростки, в дальнейшем формируя соединительную ткань; хрящ и кость – самый роstralный поток мигрирует в область первой (нижнечелюстной) дуги, из которой развиваются челюсти; более каудальный поток мигрирует ко второй (подъязычной) дуге; самый каудальный поток дает начало фарингеальным дугам [59–61]. TNCCs мигрируют по двум основным путям – вниз по латеральной стороне нервной трубки и в переднюю часть соседних сомитов, следуя за базальной пластинкой дермариума. Это вентральный путь, который повторяется на уровне одного сомита за другим вниз по стволу. Его сменяет дорсолатеральный путь, где клетки мигрируют под кожей [62, 63]. Дальнейшие исследования детализировали направления миграции TNCCs в «рамках» двух основных путей – поверхностно, вдоль дорсального ствола эпидермальной эктодермы; более медиально, вдоль латеральных краев сомитов; между сомитами; вдоль границы дерматома/миотома в самих сомитах (через роstralную половину

каждого сомита); между спинным мозгом и сомитами в наиболее медиальной популяции [64, 65].

Основные сигналы, направляющие миграцию клеток нервного гребня, «формируются» окружающей средой [66–70]. F-спондин, который экспрессируется только в задней части сомитов, препятствует проникновению клеток гребня в эту область. Аналогично эфрин-белки ингибируют прохождение клеток нервного гребня через заднюю область сомитов [71–75]; на направление, в котором они мигрируют, также влияет нервная трубка [76, 77]. Окружающие ткани оказывают значительную часть своего влияния на нервный гребень через внеклеточный матрикс, наиболее важными компонентами которого являются фибронектин, ламинин, тенасцин, коллаген и различные протеогликаны [78, 79]. Интегрины и другие молекулы адгезии позволяют клеткам нервного гребня взаимодействовать с внеклеточным матриксом [80] и играют определенную роль в направлении миграции [81–84].

Другим из изучаемых направлений была дальнейшая дифференцировка клеток нервного гребня и их производных (таблица) [85–87]. Клетки нервного гребня, образующиеся в области головы (краниального), формируют хрящи, кости чере-

*Производные нервного гребня по отношению к четырем основным областям гребня [3]*

*Derivatives of the neural crest in relation to the four major regions of the crest [3]*

Клеточное производное	
Краниальный нервный гребень	Мезенхима (индукция тимуса и паращитовидных желез)
	Соединительная ткань (включая мышечные оболочки)
	Хрящевая ткань
	Костная ткань
	Дентин (одонтобласты)
	Парафолликулярные клетки (ульtimoбранхиальные тела) щитовидной железы
	Роговица
	Склера
	Цилиарная мышца и мышцы для прикрепления глаза
	Внутреннее ухо (с отическим плакодом)
	Сенсорные ганглии черепных нервов V, VI, IX и X
Вагальный и крестцовый нервный гребень	Нейроны парасимпатической нервной системы пищеварительного канала
	Нейроны парасимпатической нервной системы кровеносных сосудов
	Энтеральные ганглии
Туловищный нервный гребень	Пигментные клетки Меркеля
	Дорсальные корешковые ганглии
	Нейроны и ганглии симпатической нервной системы
	Хромаффинные клетки мозгового слоя надпочечников
Сердечный нервный гребень	Эпинефрин-продуцирующие клетки надпочечника
	Соединительная ткань, связанная с большими сосудами сердца
	Аортолегочная перегородка сердца
	Гладкие мышцы крупных артерий
	Ганглии (целиакия, верхний и нижний брыжеечные, а также аортальный почечный)

па и лицевого скелета [88, 89], дают начало соединительной ткани [90], а также шванновским и краниальным сенсорным ганглиям [91–93]. Клетки вагального нервного гребня (непосредственно позади головы) и в крестцовых отделах формируют всю энтеральную нервную систему [94–96]. Клетки туловищного нервного гребня мигрируют в виде двух отдельных потоков; дорсальный проходит латерально под эктодермой, пока не достигнет средней вентральной стенки тела. В конце концов, он проникает в вещество дермы и образует пигментные клетки [97, 98]. По мере того как вентролатеральный поток проходит через передние половины сомитов, некоторые клетки остаются там и дифференцируются в дорсальные корешковые ганглии, в то время как другие дают начало симпатическим ганглиям [99], шванновским и адреномедулярным клеткам [100, 101]. Сердечный нервный гребень простирается от первого до третьего сомита и участвует в формировании сердечной перегородки, электрогенерирующей и проводящей системы сердца [102–104].

Взаимомодулирующее влияние клеток нервного гребня и окружающих эмбриональных тканей оказывает непосредственное влияние на дальнейшую дифференцировку клеток нервного гребня [105–108]. TNCCs, из которых развиваются меланобласты, становятся специфическими (детерминированными) вскоре после выхода из нервной трубки [109–111], в то время как другие остаются плюрипотентными до тех пор, пока они не достигнут места назначения [112–116].

Исследование участия клеток нервного гребня в развитии мутаций сформировало, на наш взгляд, отдельное направление. Изменение в процессе расслоения нервного гребня, обусловленное сверхэкспрессией Cad2 или Cad7 в нервных трубках эмбрионов, ингибирует отслоение клеток нервного гребня, препятствует миграции меланоцитов по нормальному дорсолатеральному пути миграции и приводит к накоплению меланоцитов и их предшественников внутри нервной трубки [117–120]. Cad2 ингибирует эпителиально-мезенхимальную трансформацию через клеточную адгезию и пути Wnt-сигнализации; уровень Cad2 снижается в дорсальной нервной трубке, что приводит к уменьшению содержания Vmp4 через сигнал Adam10 и торможению расслаивания нервного гребня [121]. Аналогичным образом воздействие на премиграционный нервный гребень витамином А (ретиноевая кислота) усиливает действие NCAM [122–125]. Следовательно, клетки нервного гребня не могут инициировать эпителиально-мезенхимальную трансформацию. Они накапливаются в нейроэпителии, что

приводит к черепно-лицевым аномалиям. Cad2 ингибирует расслаивание (которое знаменует начало миграции) по крайней мере двумя способами: с помощью механизма, зависящего от адгезии клеток, и путем подавления канонического Wnt-сигнала [126, 127].

Нокаут гиалуронансинтазы-2 (Has2), одного из членов семейства трех генов, участвующих в синтезе гиалуронана у млекопитающих, нарушает развитие эндокардиальной подушки сердца (производное клеток нервного гребня) (tuber endocardiale atrioventriculare, LNE), сформированный дефект связан с ингибированием миграции клеток сердечного нервного гребня (CarNCCs) [128–132].

#### *2000 г. – настоящее время*

Последние десятилетия работы клинических исследователей были сфокусированы на проблеме развития патологии при участии клеток нервного гребня. Экзо- и эндогенные факторы, вызывающие нарушения в физиологических процессах миграции, дифференцировки и взаимодействия, способствуют развитию многих патологий. Изучение патогенеза рабдомиосаркомы и связанного с ним эмбрионального транскрипционного фактора PAX3, необходимость экспрессии PAX3 при формировании миграционного пути клеток нервного гребня представлены в работах J. Anderson et al. [133–136].

Особенности механизмов подвижности и пролиферации клеток нервного гребня стали основой изучения опухолеобразования и метастазирования в постнатальном периоде [137]. Представлены доказательства, что в опухолевых клетках выявлены генетические и молекулярные особенности, присущие клеткам нервного гребня (клеточные трансформации), а также результаты изучения новообразований, возникающих из клеток нервного гребня. Рассматриваются механистические процессы, общие для процессов их онкогенного и метастатического развития и онтогенеза эмбриональных клеток нервного гребня [138].

Нейрокриптопатии – это класс патологий, которые являются результатом аномальной миграции и дифференцировки, а также гибели клеток нервного гребня во время эмбрионального развития [139]. Различные нарушения в развитии щитовидной железы, органов слуха, пигментации кожи, черепно-лицевые и сердечные аномалии, нарушения в работе пищеварительного тракта, а также опухоли могут рассматриваться как нейрокриптопатии. В проведенных исследованиях [140–142] рассматривается существующая классификация нейрокриптопатий и предлагается

новый способ, основанный на эмбриональном происхождении пораженных тканей, с учетом последних открытий в отношении молекулярных механизмов, определяющих формирование нервного гребня, и на возросшей сложности современных методов молекулярной эмбриологии.

Интерес исследователей-фундаменталистов базируется на выявлении маркеров, способствующих идентификации клеток нервного гребня в эмбриональном и постнатальном периодах. В работе M. Kleber et al. представлены результаты исследования канонического Wnt-сигнала, который способствует сенсорному нейрогенезу в клетках нервного гребня, а также его взаимодействие с морфогенным белком BMP [143]. Доказано, что развитие клеток нервного гребня регулируется комбинаторными эффектами факторов роста, которые взаимодействуют с изменяющимися внутренними сигналами клетки [144].

В работах D. Giovannone et al. представлены результаты исследований миграции клеток нервного гребня при их идентификации HNK1 (нейральный маркер) – установлены закономерности волнообразного отслоения клеток нервного гребня от 14-й пары сомитов к 19-й паре [145, 146]. Определено, что предшественники меланоцитов начинают миграцию в дорсолатеральном направлении к 17-й паре сомитов [147].

Изучению молекулярных механизмов клеточной дифференцировки и реализации мультипотентности клеток нервного гребня на основе данных транскриптомики и протеомики посвящены работы сотрудников Каролинского института (Стокгольм, Швеция) в соавторстве с И.И. Адамейко и В.А. Дячуком [148]. Основные результаты работы И.И. Адамейко сфокусированы на роли клеток нервного гребня в развитии, эволюции и регенерации [149]. И.И. Адамейко и соавт. предложили новую концепцию возникновения клеток нервного гребня в тесной связи с развитием фотосенсорных систем в процессе эволюции хордовых, а также установили мультипотентность и терапевтический потенциал периферических глиальных клеток [150]. Исследования мультипотентности клеток нервного гребня отражены в работах Е.С. Пшеничковой и А.С. Ворониной [151].

Вопросы эволюции, структурной и функциональной организации центральной нервной системы всех основных групп позвоночных, общие представления об уровнях и принципах организации нервной системы, строения и эволюционных преобразованиях спинного и головного мозга позвоночных, структурно-функциональная организация отделов головного мозга (ствола головного

мозга, мозжечка, промежуточного и конечного мозга), включая вариантную морфологию нервных центров ядерного и коркового типа, систем проводящих путей центральной нервной системы в аспекте теории эволюции нервной системы позвоночных, представлены в работе Д.К. Обухова, Н.Г. Андреевой [152].

Результаты исследований нарушения миграции клеток нервного гребня (эктопическая локализация) и взаимомодулирующее влияние окружающих тканей и клеток нервного гребня отражены в работах фундаменталиста-морфолога А.А. Зайдман и соавт. [153]. В результатах представлены этиопатогенетические аспекты формирования сколиотической деформации позвоночника [154].

### **Нервный гребень и зародышевые листки**

На наш взгляд, эта область изучения эмбриологии заслуживает отдельного внимания. Первые данные о теории зародышевых слоев упоминаются в начале XIX в. Х.И. Пандер в 1817 г. в ходе исследований развития куриных эмбрионов определил, что бластодерма образована тремя зародышевыми слоями, которые сегодня известны как эктодерма, мезодерма и энтодерма, описал верхний «серозный», нижний «слизистый» и нечетко определенный средний «сосудистый» слой и ввел термины *Kembla* (зародышевый слой) и *Keimhaut* (бластодерма) [155]. Некоторое время спустя многими биологами было признано, что все эмбрионы позвоночных построены по трехслойному типу.

На основе изучения организации кишечнополостных Т.Г. Гексли (Т.Н. Huxley) пришел к важному выводу, что наружный и внутренний слой взрослых кишечнополостных гомологичны наружному и внутреннему слоям эмбрионов позвоночных [156]. Теория Гексли трансформировала концепцию зародышевых слоев с позвоночных на беспозвоночных, с эмбрионов на взрослых особей и с онтогенеза на филогенез. Ни один биолог не мог игнорировать зародышевые слои [3]. В 1853 г. G.J. Allman определил термины «эктодерма» и «энтодерма» для обозначения наружного и внутреннего слоев гидроида *Cordylophora* [3]. В своем энциклопедическом труде о развитии животных, опубликованном в 1850–1855 гг., польский эмбриолог-физиолог R. Remak дал первые гистологические описания каждого зародышевого слоя [1].

Термин «мезенхима» ввели братья О. Hertwig и R. Hertwig для тех клеток, которые покидают мезодермальный зародышевый слой во время

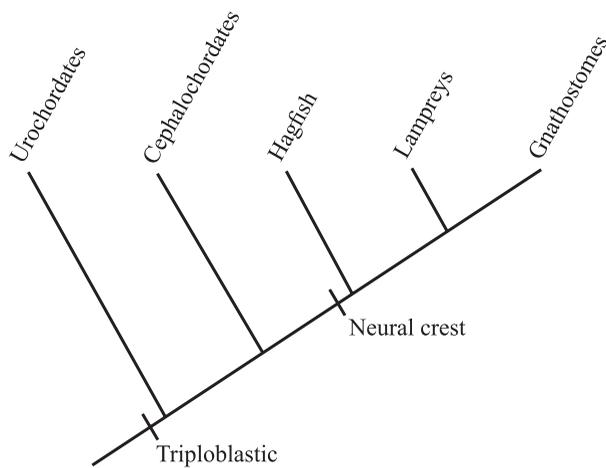
формирования кишечника и образуют элементы соединительной ткани или крови [157]. В 1877 г. влиятельный английский зоолог E.R. Lankester расширил концепцию зародышевых слоев из онтогенеза в систематику, разделив царство животных на три класса на основе количества зародышевых слоев [158]:

*Homoblastica* – одноклеточные организмы;

*Diploblastica* (диплобласты, двухслойные животные) – губки и кишечнополостные;

*Triploblastica* (трехслойные животные) – остальная часть животного царства.

Схема Ланкестера просуществовала 125 лет, пока не были собраны доказательства того, что позвоночные являются тетрабластическими, а не



**Рис. 2.** Филогенез современных хордовых (*urochordates*, *cephalochordates*), бесчелюстных (*hagfish*, *lampreys*) и челюстных (*gnathostomes*) позвоночных. *Urochordates*, *Cephalochordates* являются трипобластами, имеющие эктодерму, энтодерму и мезодерму в качестве зародышевых слоев. Четвертый зародышевый слой, нервный гребень, возник у общего предка бесчелюстных и челюстных позвоночных. Этот филогенез показывает, что *cephalochordates* являются сестринской группой по отношению к *vertebrates*, а *urochordates* – более низшей группой [3].

**Fig. 2.** A phylogeny of extant chordates (*urochordates*, *cephalochordates*), jawless vertebrates (*hagfish*, *lampreys*), and jawed vertebrates (*gnathostomes*). *Urochordates* and *cephalochordates* are triploblastic, having ectoderm, endoderm, and mesoderm as germ layers. The fourth germ layer, the neural crest, arose in the common ancestor of jawless and jawed vertebrates. This phylogeny shows *cephalochordates* as the sister group to *vertebrates*, with *urochordates* as a more basal group [3].

трибластическими, а нервный гребень представляет собой четвертый зародышевый слой (рис. 2) [3].

Эктодерма и энтодерма – первичные зародышевые слои. Они первыми появились в эволюции животных, раньше всех сформировались в эмбриональном периоде и определяются цитоплазматическими факторами, известными как материнский цитоплазматический контроль [3]. Мезодерма – вторичный зародышевый слой. Он возникает путем активации генов зиготы после индуктивных взаимодействий между эктодермой и энтодермой [159–161]. Нервный гребень появляется на ранних стадиях развития и дает начало различным типам клеток и тканей. Как и мезодерма, нервный гребень возникает путем вторичной индукции из первичного зародышевого слоя и, таким образом, отвечает критериям вторичного зародышевого слоя.

Как четвертый зародышевый слой, нервный гребень присущ только позвоночным, которые поэтому являются тетра-, а не трибластическими [162–169]. Действительно, нервный гребень является синапоморфией позвоночных [3]. Кладистический анализ, проведенный M.K. Vickaryous and B.K. Hall [168], а также выполненный J.-R. Martinez-Morales et al. с использованием биоинформатики анализ тканеспецифических генов и генных программ [169] обеспечивают независимое подтверждение родственных связей между производными клеток нервного гребня с молекулярной точки зрения и эволюционного развития [3].

Три зародышевых слоя, признанные в течение последних почти 180 лет, могут быть заменены четырьмя зародышевыми слоями, два из которых являются первичными (эктодерма и энтодерма) и два – вторичными (мезодерма и нервный гребень) [3].

Представленные научные данные не являются аксиомой в изучении эволюции развития хордовых, что дает основание для продолжения изучения появления и организации Vertebrate.

## Заключение

Нервный гребень и клетки нервного гребня являются уникальными эволюционными структурами. Закономерности образования, причины, обуславливающие процесс миграции, дифференцировки, взаимодействия клеток нервного гребня с другими структурами в эмбриогенезе, а также их потенциал, который реализуется в постнатальном периоде, продолжают быть предметом исследования и в настоящее время. Исторические периоды открытия и изучения нервного гребня и его клеток свидетельствуют, что данная струк-

тура не сразу была принята в научном мире. До сих пор нет единого мнения, что нервный гребень является четвертым зародышевым листком. Бесспорным является лишь тот факт, на наш взгляд, что его существование оказывает многогранное влияние на развитие и жизнь организма. Вариативность нервного гребня и клеток нервного гребня оставляет возможность для дальнейших исследований в области нарушения развития опорно-двигательного аппарата, а также соматических патологий. Понимание патогенетических механизмов, возникающих при нарушении расслаивания нервного гребня, отслоения клеток нервного гребня, миграции, дифференцировки, позволит разработать методики, воздействующие на реперные механизмы возникновения патологии.

### Список литературы / References

1. Remak R. Untersuchungen über die Entwicklung der Wirbelthiere. Berlin: Walter De Gruyter Incorporated, 1855. 194 p.
2. Etchevers H.C., Dupin E., le Douarin N.M. The diverse neural crest: from embryology to human pathology. *Development*. 2019;146(5):dev169821. doi: 10.1242/dev.169821
3. Hall B.K. The neural crest and neural crest cells in vertebrate development and evolution. Springer Science Business Media, LLC, 2010. 400 p. doi: 10.1007/978-0-387-09846-3
4. Bellairs R., Osmond M. Atlas of Chick Development 3rd Edition. San Diego: Elsevier Ltd., 2014. 660 p.
5. Gammill L.S., Bronner-Fraser M. Genomic analysis of neural crest induction. *Development*. 2002;129(24): 5731–5741. doi: 10.1242/dev.00175
6. Hall B.K. Germ layers and the germ-layer theory revisited: Primary and secondary germ layers, neural crest as a fourth germ layer, homology, demise of the germ-layer theory. *Evolut. Biol*. 1998;30:121–186. doi: 10.1007/978-1-4899-1751-5\_5
7. His W. Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbelthierleibes: die erste Entwicklung des Hühnchens im Ei. Leipzig: F.C.W. Vogel, 1868. doi: 10.5962/bhl.title.15288
8. His W. Unsere Körperform und das physiologische Problem ihrer Entstehung: Briefe an einen befreundeten Naturforscher. Leipzig: F.C.W. Vogel, 1874.
9. Marshall A.M. The morphology of the vertebrate olfactory organ. *Quart. J. Microsc. Sci.* 1879;19:300–340.
10. Marshall A.M. The development of the cranial nerves in the chick. *Quart. J. Microsc. Sci.* 1878;18:10–40.
11. Platt J.B. The development of the cartilaginous skull and of the branchial and hypoglossal musculature in *Necturus*. *Morphol. Jb.* 1897;25:377–464.
12. Platt J.B. Ontogenetic differentiation of the ectoderm in *Necturus*. II. On the development of the peripheral nervous system. *Quart. J. Microsc. Sci.* 1896;38:485–547.
13. Stone L.S. Experiments showing the role of migrating neural crest (mesectoderm) in the formation of head skeleton and loose connective tissue in *Rana palustris*. *Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org.* 1929;118:40–77. doi: 10.1007/BF02108871
14. Raven C.P. Zur entwicklung der Ganglienleiste. I. Die Kinematik der Ganglienleistenentwicklung bei den Urodelen. *Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org.* 1931;125(2-3):210–292. doi: 10.1007/BF00576356
15. Sellman S. Some experiments on the determination of the larval tooth in *Amblystoma mexicanum*. *Odont. Tidskr.* 1946;54:1–128.
16. de Beer G.R. The differentiation of neural crest cells into visceral cartilages and odontoblast in *Amblystoma*, and a re-examination of the germ-layer theory. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1947;2;134(876):377–398.
17. DuShane G.P. The embryology of vertebrate pigment cells. Part I. Amphibia. *Quart. Rev. Biol.* 1943;18:108–127.
18. DuShane G.P. The embryology of vertebrate pigment cells. Part II. Birds. *Quart. Rev. Biol.* 1944;19:98–117. doi: 10.1086/394689
19. Niu M.C. The axial organization of the neural crest, studied with particular reference to its pigmentary component. *J. Exp. Zool.* 1947;105(1):79–113. doi: 10.1002/jez.1401050105
20. Hörstadius S. The neural crest: its properties and derivatives in the light of experimental research. London: Oxford Univ. Press, 1950.
21. Hörstadius S., Sellman S. Experimental studies on the determination of the chondrocranium in *Amblystoma mexicanum*. *Ark. Zool.* 1941;1;33(13):1–8.
22. Hörstadius S., Sellman S. Experimentelle Untersuchungen über die Determination des knorpeligen Kopfskelettes bei Urodelen. *Nova Acta R. Soc. Scient. Upsal. Ser.* 1946;4;13(8).
23. Newth D.R. Fate of the neural crest in lampreys. *Nature*. 1950;18;165(4190):284. doi: 10.1038/165284a0
24. Newth D.R. On the neural crest of the lamprey embryo. *Development*. 1956;4(4):358–375. doi: 10.1242/dev.4.4.358
25. Weston J.A. A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. *Dev. Biol.* 1963;6:279–310. doi: 10.1016/0012-1606(63)90016-2
26. Weston J.A. The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv. Morphog.* 1970;8:41–114. doi: 10.1016/b978-0-12-028608-9.50006-5

27. Johnston M.C. A radioautographic study of the migration and fate of cranial neural crest cells in the chick embryo. *Anat. Rec.* 1966;156(2):143–155. doi: 10.1002/ar.1091560204
28. Holtfreter J. Epithelial-mesenchymal interactions. Ed. R. Fleischmajer, ... R.E. Billingham. 18th Hahnemann symposium. Baltimore: Williams & Wilkins, 1968. 326 p.
29. Chibon P. Nuclear labelling by tritiated thymidine of neural crest derivatives in the amphibian *Urodele Pleurodeles waltlii* Michah. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1967;18(3):343–358.
30. le Douarin N.M. Cell recognition based on natural morphological nuclear markers. *Med. Biol.* 1974;52(5):281–319.
31. Weston J.A. A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. *Dev. Biol.* 1963;6:279–310. doi: 10.1016/0012-1606(63)90016-2
32. Weston J.A. The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv. Morphog.* 1970;8:41–114. doi: 10.1016/b978-0-12-028608-9.50006-5
33. Bolande R.P. The neurocristopathies: A unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Human. Pathol.* 1974;5:409–429. doi: 10.1016/S0046-8177(74)80021-3
34. le Lièvre C., le Douarin N.M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1975;34:125–154.
35. Hassell J.R., Greenberg J.H., Johnston M.C. Inhibition of cranial neural crest cell development by vitamin A in cultured chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 1977;39:267–271.
36. le Lièvre C. Participation of neural crest-derived cells in the genesis of the skull in birds. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1978;47:17–37.
37. Dupin E., Sextier-Sainte-Claire Deville F., Nataf V., le Douarin N.M. The ontogeny of the neural crest. *C. R. Acad. Sci. III.* 1993;316(9):1062–1081.
38. Baker C.V.H., Bronner-Fraser M., le Douarin N.M., Teillet M.A. Early- and late-migrating cranial neural crest cell populations have equivalent developmental potential *in vivo*. *Development.* 1997;124(16):3077–3087. doi: 10.1242/dev.124.16.3077
39. le Douarin N.M., Kalcheim C. The neural crest. 2nd Edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. 445 p.
40. le Douarin N., Kalcheim C. The neural crest. Cambridge: Cambridge University Press, 1999. 445 p.
41. Sieber-Blum M. Mechanisms of neural crest diversification. *Comments Dev. Neurobiol.* 1990;4:225–249.
42. Perris R., Krotoski D., Lallier T., Domingo C., Sorrell J.M., Bronner-Fraser M. Spatial and temporal changes in the distribution of proteoglycans during avian neural crest development. *Development.* 1991;111(2):583–599. doi: 10.1242/dev.111.2.583
43. Erickson C.A. Morphogenesis of the avian trunk neural crest: use of morphological techniques in elucidating the process. *Microsc. Res. Tech.* 1993;1;26(4):329–351. doi: 10.1002/jemt.1070260406
44. Ito K., Morita T., Sieber-Blum M. *In vitro* clonal analysis of mouse neural crest development. *Dev. Biol.* 1993;157(2):517–525. doi: 10.1006/dbio.1993.1154
45. Stocker K.M., Brown A.M., Ciment G. Gene transfer of lacZ into avian neural tube and neural crest cells by retroviral infection of grafted embryonic tissues. *J. Neurosci. Res.* 1993;34(1):135–145. doi: 10.1002/jnr.490340114
46. Raible D.W., Eisen J.S. Regulatory interactions in zebrafish neural crest. *Development.* 1996;122(2):501–507. doi: 10.1242/dev.122.2.501
47. Nakata K., Nagai T., Aruga J., Mikoshiba K. *Xenopus Zic3*, a primary regulator both in neural and neural crest development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;28;94(22):11980–11985. doi: 10.1073/pnas.94.22.11980
48. Baker C.V.H., Bronner-Fraser M. The origins of the neural crest. Part I: Embryonic induction. *Mech. Dev.* 1997;69(1-2):3–11. doi: 10.1016/s0925-4773(97)00132-9
49. Baker C.V.H., Bronner-Fraser M. The origins of the neural crest. Part II: An evolutionary perspective. *Mech. Dev.* 1997;69(1-2):13–29. doi: 10.1016/s0925-4773(97)00129-9
50. la Bonne C., Bronner-Fraser M. Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Development.* 1998;125(13):2403–2414. doi: 10.1242/dev.125.13.2403
51. Hall B.K. The neural crest in development and evolution. New York: Springer, 1999.
52. Lumsden A., Sprawson N., Graham A. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development.* 1991;113(4):1281–1291. doi: 10.1242/dev.113.4.1281
53. Kuratani S., Kirby M.L. Migration and distribution of circumpharyngeal crest cells in the chick embryo: Formation of the circumpharyngeal ridge and E/c8+ crest cells in the vertebrate head region. *Anat. Rec.* 1992;234(2):263–280. doi: 10.1002/ar.1092340213
54. Fukiishi Y., Morriss-Kay G.M. Migration of cranial neural crest cells to the pharyngeal arches and heart in rat embryos. *Cell Tissue Res.* 1992;268(1):1–8. doi: 10.1007/BF00338048
55. Collazo A., Bronner-Fraser M., Fraser S.E. Vital dye labelling of *Xenopus laevis* trunk neural crest reveals multipotency and novel pathways of migration. *Development.* 1993;118(2):363–376. doi: 10.1242/dev.118.2.363
56. Erickson C.A. From the crest to the periphery: control of pigment cell migration and lineage segregation

- gation. *Pigment Cell Res.* 1993;6(5):336–347. doi: 10.1111/j.1600-0749.1993.tb00611.x
57. Erickson C.A., Goins T.L. Avian neural crest cells can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. *Development.* 1995;121(3):915–924. doi: 10.1242/dev.121.3.915
58. Graveson A.C., Hall B.K. The relationship between migration and chondrogenic potential of trunk neural crest cells in *Ambystoma mexicanum*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 1995;204(7–8):477–483. doi: 10.1007/BF00360855
59. Peterson P.E., Blankenship T.H., Wilson D.B., Hendrickx A.G. Analysis of hindbrain neural crest migration in the long-tailed monkey (*Macaca fascicularis*). *Anat. Embryol. (Berl.)*. 1996;194(3):235–246. doi: 10.1007/BF00187134
60. Blankenship T.N., Peterson P.E., Hendrickx A.G. Emigration of neural crest cells from macaque optic vesicles is correlated with discontinuities in its basement membrane. *J. Anat.* 1996;188(2):473–483.
61. Krull C.E., Lansford R., Gale N.W., Collazo A., Marcelle C., Yancopoulos G.D., Fraser S.E., Bronner-Fraser M. Interactions of Eph-related receptors and ligands confer rostrocaudal pattern to trunk neural crest migration. *Curr. Biol.* 1997;1;7(8):571–580. doi: 10.1016/s0960-9822(06)00256-9
62. Serbedzija G.N., McMahon A.P. Analysis of neural crest cell migration in *Splotch* mice using a neural crest-specific LacZ reporter. *Dev. Biol.* 1997;15;185(2):139–147. doi: 10.1006/dbio.1997.8551
63. Conway S.J., Henderson D.J., Copp A.J. *Pax3* is required for cardiac neural crest migration in the mouse: Evidence from the *Splotch* (*Sp2H*) mutant. *Development.* 1997;124(2):505–514. doi: 10.1242/dev.124.2.505
64. Poelmann R.E., Mikawa T., Gittenberger-de Groot A.C. Neural crest cells in outflow tract septation of the embryonic chicken heart: Differentiation and apoptosis. *Dev. Dyn.* 1998;212(3):373–384. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199807)212:3<373:AID-AJA5>3.0.CO;2-E
65. Vaglia J.L., Hall B.K. Regulation of neural crest cell populations in vertebrates: Occurrence, distribution and underlying mechanisms. *Int. J. Dev. Biol.* 1999;43(2):95–110.
66. Poelmann R.E., Gittenberger-de Groot A.C., Mentink M.M.T., Delpech B., Girard N., Christ B. The extracellular matrix during neural crest formation and migration in rat embryos. *Anat. Embryol. (Berl.)*. 1990;182(1):29–39. doi: 10.1007/BF00187525
67. Bronner-Fraser M., Wolf J.J., Murray B.A. Effects of antibodies against N-cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube. *Dev. Biol.* 1992;153(2):291–301. doi: 10.1016/0012-1606(92)90114-v
68. Peters-Van der Sanden M.J., Kirby M.L., Gittenberger-de Groot A., Tibboel D., Mulder M.P., Meijers C. Ablation of various regions within the avian vagal neural crest has differential effects on ganglion formation in the fore-, mid- and hindgut. *Dev. Dyn.* 1993;196(3):183–194. doi: 10.1002/aja.1001960305
69. Spence S.G., Poole T.J. Developing blood vessels and associated extracellular matrix as substrates for neural crest migration in Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Int. J. Dev. Biol.* 1994;38(1):85–98.
70. Lee Y.M., Osumi-Yamashita N., Ninomiya Y., Moon C.K., Eriksson U., Eto K. Retinoic acid stage-dependently alters the migration pattern and identity of hindbrain neural crest cells. *Development.* 1995;121(3):825–837. doi: 10.1242/dev.121.3.825
71. Ito K., Morita T. Role of retinoic acid in mouse neural crest cell development *in vitro*. *Dev. Dyn.* 1995;204(2):211–218. doi: 10.1002/aja.1002040212
72. Moiseiwitsch J.R., Lauder J.M. Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995;1;92(16):7182–7186. doi: 10.1073/pnas.92.16.7182
73. Newgreen D.F., Minichiello J. Control of epitheliomesenchymal transformation. I. Events in the onset of neural crest cell migration are separable and inducible by protein kinase inhibitors. *Dev. Biol.* 1995;170(1):91–101. doi: 10.1006/dbio.1995.1198
74. Rowe A., Brickell P.M. Expression of the chicken retinoic X receptor-gamma gene in migrating cranial neural crest cells. *Anat. Embryol. (Berl.)*. 1995;192(1):1–8. doi: 10.1007/BF00186986
75. Olsson L., Svensson K., Perris R. Effects of extracellular matrix molecules on subepidermal neural crest cell migration in wild type and white mutant (*dd*) axolotl embryos. *Pigment Cell Res.* 1996; 9(1):18–27. doi: 10.1111/j.1600-0749.1996.tb00082.x
76. Olsson L., Stigson M., Perris R., Sorrell J.M., Löfberg J. Distribution of keratin sulfate and chondroitin sulfate in wild type and white mutant axolotl embryos during neural crest cell-migration. *Pigment Cell Res.* 1996;9(1):5–17. doi: 10.1111/j.1600-0749.1996.tb00081.x
77. Ikeya M., Lee S.M.K., Johnson J.E., McMahon A.P., Takada S. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature.* 1997;30;389(6654):966–970. doi: 10.1038/40146
78. Mayor R., Guerrero N., Martínez C. Role of FGF and Noggin in neural crest induction. *Dev. Biol.* 1997;1;189(1):1–12. doi: 10.1006/dbio.1997.8634
79. Smith A., Robinson V., Patel K., Wilkinson D.G. The EphA4 and EphB1 receptor tyrosine kinases and ephrin-B2 ligand regulate targeted migration of branchial neural crest cells. *Curr. Biol.* 1997; 1;7(8):561–570. doi: 10.1016/s0960-9822(06)00255-7
80. Wehrle-Haller B., Weston J.A. Receptor tyrosine kinase-dependent neural crest migration in response to differentially localized growth factors. *Bioessays.* 1997;19(4):337–345. doi: 10.1002/bies.950190411

81. Moro Balbás J.A., Gato A., Alonso M., Barbosa E. Local increase level of chondroitin sulfate induces changes in the rhombencephalic neural crest migration. *Int. J. Dev. Biol.* 1998;42(2):207–216.
82. Nakagawa S., Takeichi M. Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development.* 1998;125(15):2963–2971. doi: 10.1242/dev.125.15.2963
83. Baker J.C., Beddington R.S.P., Harland R.M. WNT signaling in *Xenopus* embryos inhibits bmp4 expression and activates neural development. *Genes Dev.* 1999;13(23):3149–3159. doi: 10.1101/gad.13.23.3149
84. Tucker R.P., Hagios C., Chiquet-Ehrismann R., Lawler J., Hall R.J., Erickson C.A. Thrombospondin-1 and neural crest cell migration. *Dev. Dyn.* 1999;214(4):312–322. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199904)214:4<312::AID-AJA4>3.0.CO;2-A
85. Osumi-Yamashita N., Eto K. Mammalian cranial neural crest cells and facial development. *Develop. Growth. Differ.* 1990;32(5):451–459. doi: 10.1111/j.1440-169X.1990.00451.x
86. Seufert D.W., Hall B.K. Tissue interactions involving cranial neural crest in cartilage formation in *Xenopus laevis* (Daudin). *Cell. Differ. Dev.* 1990;1;32(2):153–165. doi: 10.1016/0922-3371(90)90109-a
87. Hall B.K., Ekanayake S. Effects of growth factors on the differentiation of neural crest cells and neural crest cell-derivatives. *Int. J. Dev. Biol.* 1991;35(4):367–387.
88. Maxwell G.D., Forbes M.E. Spectrum of *in vitro* differentiation of quail trunk neural crest cells isolated by cell sorting using the HNK-1 antibody and analysis of the adrenergic development of HNK-1+ sorted subpopulations. *J. Neurobiol.* 1991;22(3):276–286. doi: 10.1002/neu.480220307
89. Stocker K.M., Sherman L., Rees S., Ciment G. Basic FGF and TGF-beta1 influence commitment to melanogenesis in neural crest-derived cells of avian embryos. *Development.* 1991;111(2):635–645. doi: 10.1242/dev.111.2.635
90. Gvirtzman G., Goldstein R.S., Kalcheim C. A positive correlation between permissiveness of mesoderm to neural crest migration and early DRG growth. *J. Neurobiol.* 1992;23(3):205–216. doi: 10.1002/neu.480230302
91. le Douarin N.M., Dupin E., Baroffio A., Dulac C. New insights into the development of neural crest derivatives. *Int. Rev. Cytol.* 1992;138:269–314. doi: 10.1016/s0074-7696(08)61591-0
92. le Douarin N.M., Ziller C., Couly G.F. Patterning of neural crest derivatives in the avian embryo: *in vivo* and *in vitro* studies. *Dev. Biol.* 1993;159(1):24–49. doi: 10.1006/dbio.1993.1219
93. Sherman L., Stocker K.M., Morrison R., Ciment G. Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts intracellularly to cause the transdifferentiation of avian neural crest-derived Schwann cell precursors into melanocytes. *Development.* 1993;118(4):1313–1326. doi: 10.1242/dev.118.4.1313
94. Asamoto K., Nojyo Y., Aoyama H. Restriction of the fate of early migrating trunk neural crest in gangliogenesis of avian embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 1995;39(6):975–984.
95. Goldstein R.S., Avivi C., Geffe R. Initial axial level-dependent differences in size of avian dorsal root ganglia are imposed by the sclerotome. *Dev. Biol.* 1995;168(1):214–222. doi: 10.1006/dbio.1995.1073
96. Nieto M.A., Sechrist J., Wilkinson D.G., Bronner-Fraser M. Relationship between spatially restricted Krox-20 gene expression in branchial neural crest and segmentation in the chick embryo hindbrain. *EMBO J.* 1995;18;14(8):1697–1710. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07159.x
97. Robertson K., Mason I. Expression of *ret* in the chicken embryo suggests roles in regionalization of the vagal neural tube and somites and in development of multiple neural crest and placodal lineages. *Mech. Dev.* 1995;53(3):329–344. doi: 10.1016/0925-4773(95)00449-1
98. Lahav R., Ziller C., Dupin E., le Douarin N.M. Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996;30;93(9):3892–3897. doi: 10.1073/pnas.93.9.3892
99. Anderson D.J. Cellular and molecular biology of neural crest cell lineage determination. *Trends Genet.* 1997;13(7):276–280. doi: 10.1016/s0168-9525(97)01187-6
100. Graveson A.C., Smith M.M., Hall B.K. Neural crest potential for tooth development in a urodele amphibian: developmental and evolutionary significance. *Dev. Biol.* 1997;1;188(1):34–42. doi: 10.1006/dbio.1997.8563
101. Kerr R.S.E., Newgreen D.F. Isolation and characterization of chondroitin sulfate proteoglycans from embryonic quail that influence neural crest cell behavior. *Dev. Biol.* 1997;192(1):108–124. doi: 10.1006/dbio.1997.8731
102. Soriano P. The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development.* 1997;124(14):2691–2700. doi: 10.1242/dev.124.14.2691
103. Wehrle-Haller B., Weston J.A. Receptor tyrosine kinase-dependent neural crest migration in response to differentially localized growth factors. *Bioessays.* 1997;19(4):337–345. doi: 10.1002/bies.950190411
104. Thomas T., Kurihara H., Yamagishi H., Kurihara Y., Yazaki Y., Olson E.N., Srivastava D. A signaling cascade involving endothelin-1, dHAND and *msx1* regulates development of neural-crest-derived branchial

arch mesenchyme. *Development*. 1998;125(16):3005–3014. doi: 10.1242/dev.125.16.3005

105. Takahashi Y., le Douarin N.M. cDNA cloning of a quail homeobox gene and its expression in neural crest-derived mesenchyme and lateral plate mesoderm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990; 87(19):7482–7486. doi: 10.1073/pnas.87.19.7482

106. Gvirtzman G., Goldstein R.S., Kalcheim C. A positive correlation between permissiveness of mesoderm to neural crest migration and early DRG growth. *J. Neurobiol.* 1992;23(3):205–216. doi: 10.1002/neu.480230302

107. Rothman T.P., Goldowitz D., Gershon M.D. Inhibition of migration of neural crest-derived cells by the abnormal mesenchyme of the presumptive aganglionic bowel of ls/ls mice: analysis with aggregation and interspecies chimeras. *Dev. Biol.* 1993;159(2):559–573. doi: 10.1006/dbio.1993.1264

108. Osumi-Yamashita N., Ninomiya Y., Doi H., Eto K. The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. *Dev. Biol.* 1994;164(2):409–419. doi: 10.1006/dbio.1994.1211

109. Dickinson M.E., Sellek M.A.J., McMahon A.P., Bronner-Fraser M. Dorsalization of the neural tube by the non-neural ectoderm. *Development*. 1995;121(7):2099–2106. doi: 10.1242/dev.121.7.2099

110. Dunlop L.L., Hall B.K. Relationships between cellular condensation, preosteoblast formation and epithelial–mesenchymal interactions in initiation of osteogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 1995;39(2):357–371.

111. Liem K.F.Jr., Tremml G., Roelink H., Jessell T.M. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell*. 1995; 2;82(6):969–979. doi: 10.1016/0092-8674(95)90276-7

112. Wilson P.A., Hemmati-Brivanlou A. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by BMP-4. *Nature*. 1995;27;376(6538):331–333. doi: 10.1038/376331a0

113. Holland N.D., Panganiban G., Henyey E.L., Holland L.Z. Sequence and developmental expression of *AmphiD11*, an amphioxus *Distal-less* gene transcribed in the ectoderm, epidermis and nervous system: insights into evolution of craniate forebrain and neural crest. *Development*. 1996;122(9):2911–2920. doi: 10.1242/dev.122.9.2911

114. Imai H., Osumi-Yamashita N., Ninomiya Y., Eto K. Contribution of early-migrating midbrain crest cells to the dental mesenchyme of mandibular molar teeth in rat embryos. *Dev. Biol.* 1996;15;176(2):151–165. doi: 10.1006/dbio.1996.9985

115. Barlow L.A., Northcutt R.G. Taste buds develop autonomously from endoderm without induction by cephalic neural crest or paraxial mesoderm. *Development*. 1997;124(5):949–957. doi: 10.1242/dev.124.5.949

116. Marchant L., Linke C., Ruiz P., Guerrero N., Mayor R. The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. *Dev. Biol.* 1998;15;198(2):319–329.

117. Morrison-Graham K., Schatteman G.C., Bork T., Bowen-Pope D.F., Weston J.A. A PDGF receptor mutation in the mouse (Patch) perturbs the development of a non-neural subset of neural crest-derived cells. *Development*. 1992;115(1):133–142. doi: 10.1242/dev.115.1.133

118. Couly G.F., Coltey P.M., le Douarin N.M. The triple origin of the skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development*. 1993;117(2):409–429. doi: 10.1242/dev.117.2.409

119. Gendron-Maguire M., Mallo M., Zhang M., Gridley T. *Hoxa-2* mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal elements derived from cranial neural crest. *Cell*. 1993;31;75(7):1317–1331. doi: 10.1016/0092-8674(93)90619-2

120. Brannan C.I., Perkins A.S., Vogel K.S., Ratner N., Nordlund M.L., Reid S.W., Buchberg A.M., Jenkins N.A., Parada L.F., Copeland N.G. Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes Dev.* 1994;1;8(9):1019–1029. doi: 10.1101/gad.8.9.1019

121. Takahashi Y., Bontoux M., le Douarin N.M. Epithelio-mesenchymal interactions are critical for *Quox 7* expression and membrane bone differentiation in the neural crest derived mandibular mesenchyme. *EMBO J.* 1991;10(9):2387–2393. doi: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb07777.x

122. Hart R.C., McCue P.A., Ragland W.L., Winn K.J., Unger E.R. Avian model for 13-cis-retinoic acid embryopathy: demonstration of neural crest related defects. *Teratology*. 1990;41(4):463–472. doi: 10.1002/tera.1420410411

123. Thisse C., Thisse B., Postlethwait J.H. Expression of *snail2*, a second member of the zebrafish *Snail* family, in cephalic mesendoderm and presumptive neural crest of wild-type and spadetail mutant embryos. *Dev. Biol.* 1995;172(1):86–99. doi: 10.1006/dbio.1995.0007

124. Tremblay P., Kessel M., Gruss P. A transgenic neuroanatomical marker identifies cranial neural crest deficiencies associated with the *Pax3* mutant *Splotch*. *Dev. Biol.* 1995;171(2):317–329. doi: 10.1006/dbio.1995.1284

125. Henion P.D., Raible D.W., Beattie C.E., Stoesser K.L., Weston J.A., Eisen J.S. Screen for mutations affecting development of zebrafish neural crest. *Dev. Genet.* 1996;18(1):11–17. doi: 10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:1<11::AID-DVG2>3.0.CO;2-4

126. Kelsh R.N., Brand M., Jiang Y.-J., Heisenberg C.-P., Lin S., Haffter P., Odenthal J., Mullins M.C., van Eeden F.J., Furutani-Seiki M., ... Nüsslein-Volhard C. Zebrafish pigmentation mutations and the

- processes of neural crest development. *Development*. 1996;123:369–389. doi: 10.1242/dev.123.1.369
127. Zhang J., Hagopian-Donaldson S., Serbedzija G., Elsemore J., Plehn-Dujowich D., McMahon A.P., Flavell R.A., Williams T. Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature*. 1996;16;381(6579):238–241. doi: 10.1038/381238a0
128. Ewart J.L., Cohen M.F., Meyer R.A., Huang G.Y., Wessels A., Gourdie R.G., Chin A.J., Park S.M., Lazatin B.O., Villabon S., Lo C.W. Heart and neural tube defects in transgenic mice overexpressing the Cx43 gap junction gene. *Development*. 1997;124(7):1281–1292. doi: 10.1242/dev.124.7.1281
129. Goh K.L., Yang J.T., Hynes R.O. Mesodermal defects and cranial neural crest apoptosis in alpha5 integrin-null embryos. *Development*. 1997;124(21):4309–4319. doi: 10.1242/dev.124.21.4309
130. Clouthier D.E., Hosoda K., Richardson J.A., Williams S.C., Yanagisawa H., Kuwaki T., Kumada M., Hammer R.E., Yanagisawa M. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development*. 1998;125(5):813–824. doi: 10.1242/dev.125.5.813
131. Corcoran J. What are the molecular mechanisms of neural tube defects? *Bioessays*. 1998;20(1):6–8. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199801)20:1<6::AID-BIES3>3.0.CO;2-T
132. Takahashi K., Nuckolls G.H., Tanaka O., Semba I., Takahashi I., Dashner R., Shum L., Slavkin H.C. Adenovirus-mediated ectopic expression of Msx2 in even-numbered rhombomeres induces apoptotic elimination of cranial neural crest cells *in ovo*. *Development*. 1998;125(9):1627–1635. doi: 10.1242/dev.125.9.1627
133. Anderson J., Ramsay A., Gould S., Pritchard-Jones K. PAX3-FKHR induces morphological change and enhances cellular proliferation and invasion in rhabdomyosarcoma. *Am. J. Pathol.* 2001;159(3):1089–1096. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61784-1
134. Barber T.D., Barber M.C., Tomescu O., Barr F.G., Ruben S., Friedman T.B. Identification of target genes regulated by PAX3 and PAX3-FKHR in embryogenesis and alveolar rhabdomyosarcoma. *Genomics*. 2002;79(3):278–284. doi: 10.1006/geno.2002.6703
135. Blake J.A., Ziman M.R. Pax3 transcripts in melanoblast development. *Dev. Growth. Differ.* 2005;47(9):627–635. doi: 10.1111/j.1440-169X.2005.00835.x
136. Boudjadi S., Chatterjee B., Sun W., Vemu P., Barr F.G. The expression and function of PAX3 in development and disease. *Gene*. 2018;5;666:145–157. doi: 10.1016/j.gene.2018.04.087
137. Powell D.R., Blasky A.J., Britt S.G., Artinger K.B. Riding the crest of the wave: parallels between the neural crest and cancer in epithelial-to-mesenchymal transition and migration. *Wiley Interdiscip Rev. Syst. Biol. Med.* 2013;5(4):511–522. doi: 10.1002/wsbm.1224
138. Maguire L.H., Thomas A.R., Goldstein A.M. Tumors of the neural crest: Common themes in development and cancer. *Dev. Dyn.* 2015;244(3):311–322. doi: 10.1002/dvdy.24226
139. Vega-Lopez G.A., Cerrizuela S., Tribulo C., Aybar M.J. Neurocristopathies: New insights 150 years after the neural crest discovery. *Dev. Biol.* 2018;1;444:1:110–143. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.05.013
140. Etchevers H.C., Dupin E., Le Douarin N.M. The diverse neural crest: from embryology to human pathology. *Development*. 2019;11;146(5):dev169821. doi: 10.1242/dev.169821
141. Ritter K.E., Martin D.M. Neural crest contributions to the ear: implications for congenital hearing disorders. *Hear Res.* 2019;376:22–32. doi: 10.1016/j.heares.2018.11.005
142. Medina-Cuadra L., Monsoro-Burq A.H. Xenopus, an emerging model for studying pathologies of the neural crest. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2021;145:313–348. doi: 10.1016/bs.ctdb.2021.03.002
143. Kléber M., Lee H.-Y., Wurdak H., Buchstaller J., Riccomagno M.M., Ittner L.M., Suter U., Epstein D.J., Sommer L. Neural crest stem cell maintenance by combinatorial Wnt and BMP signaling. *J. Cell Biol.* 2005;25;169(2):309–320. doi: 10.1083/jcb.200411095
144. Rinon A., Molchadsky A., Nathan E., Yovel G., Rotter V., Sarig R., Tzahor E. p53 coordinates cranial neural crest cell growth and epithelial-mesenchymal transition/delamination processes. *Development*. 2011;38(9):1827–1838. doi: 10.1242/dev.053645
145. Giovannone D., Ortega B., Reyes M., El-Ghali N., Rabadi M., Sao S., de Bellard M.E. Chicken trunk neural crest migration visualized with HNK1. *Acta Histochem.* 2015;117(3):255–266. doi: 10.1016/j.acthis.2015.03.002
146. Arrigo A.B., Lin J.-H.I. Endocytic protein defects in the neural crest cell lineage and its pathway are associated with congenital heart defects. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;16;22(16):8816. doi: 10.3390/ijms22168816
147. Manzari-Tavakoli A., Babajani A., Farjoo M.H., Hajinasrollah M., Bahrami S., Niknejad H. The cross-talks among bone morphogenetic protein (BMP) signaling and other prominent pathways involved in neural differentiation. *Front. Mol. Neurosci.* 2022;15;15:827275. doi: 10.3389/fnmol.2022.827275
148. Newton P.T., Li L., Zhou B., Schweingruber C., Hovorakova M., Xie M., Sun X., Sandhow L., Artemov A.V., Ivashkin E., ... Chagin A.S. A radical switch in clonality reveals a stem cell niche in the epiphyseal growth plate. *Nature*. 2019;567(7747):234–238. doi: 10.1038/s41586-019-0989-6
149. Ivashkin E., Adameyko I. Progenitors of the protochordate ocellus as an evolutionary origin

- of the neural crest. *Evodevo*. 2013;10;4(1):12. doi: 10.1186/2041-9139-4-12
150. Kastriti M.E., Adameyko I. Specification, plasticity and evolutionary origin of peripheral glial cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2017;47:196–202. doi: 10.1016/j.conb.2017.11.004
151. Пшенникова Е.С., Воронина А.С. Нервный гребень – своеобразная популяция эмбриональных клеток. *Молекул. биол.* 2019;53(2):256–267. doi: 10.1134/S0026898419020137
- Pshennikova E.S., Voronina A.S. Nerve ridge – an unusual population of embryonic cells. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*. 2019;53(2):256–267. [In Russian]. doi: 10.1134/S0026898419020137
152. Обухов Д.К., Андреева Н.Г. Эволюционная морфология нервной системы позвоночных. М.: Юрайт. 2017. 384 с.
- Obukhov D.K., Andreeva N.G. Evolutionary morphology of the vertebrate nervous system. Moscow: Yurite, 2017. 384 p. [In Russian].
153. Зайдман А.М., Строкова Е.Л., Киселева Е.В., Агеева Т. А., Сульдина Л.А., Струнов А.А., Шевченко А.И. Эктопическая локализация клеток нервного гребня – этиологический фактор сколиотической болезни. *Хирургия позвоночника*. 2015;12(4):88–97. doi: 10.14531/ss2015.4.88-97
- Zaidman A.M., Strokova E.L., Kiseleva E.V., Ageeva T.A., Suldina L.A., Strunov A.A., Shevchenko A.I. Ectopic localization of neural crest cells: etiological factor of scoliotic. *Khirurgia pozvonochnika = Spine Surgery*. 2015;12(4):88–97. [In Russian]. doi: 10.14531/ss2015.4.88-97
154. Zaydman A.M., Strokova E.L., Pahomova N.Y., Gusev A.F., Mikhaylovskiy M.V., Shevchenko A.I., Zaidman M.N., Shilo A.R., Subbotin V.M. Etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis: Review of the literature and new epigenetic hypothesis on altered neural crest cells migration in early embryogenesis as the key event. *Med. Hypotheses*. 2021;151:110585. doi: 10.1016/j.mehy.2021.110585
155. Pander C. Dissertatio inauguralis sistens historiam metamorphoseos, quam ovum incubatum prioribus quinque diebus subit. Wirceburgi: Typis Francisci Ernesti Nitribitt, Universitatis typographi, 1817. 69 p.
156. Huxley T.H. On the anatomy and the affinities of the family of the medusae. London: Royal Society, 1849. 835 p.
157. Hertwig O., Hertwig R. Die Coelomtheorie: Versuch einer Erklärung des mittleren Keimblattes. Jena: Gustav Fischer, 1881. 340 p.
158. Lankester E.R. 1877. Memoirs: notes on the embryology and classification of the Animal Kingdom: comprising a revision of speculations relative to the origin and significance of the germ-layers. *Quar. J. Microsc. Sci. New Series*;17:399–454.
159. Sasai Y., de Robertis E.M. Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev. Biol.* 1997;182(1):5–20. doi: 10.1006/dbio.1996.8445
160. Martindale M.Q., Pang K., Finnerty J.R. Investigating the origins of triploblasty: ‘mesodermal’ gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone *Nematostella vectensis* (phylum, Cnidaria; class, Anthozoa). *Development*. 2004;131(10):2463–2474. doi: 10.1242/dev.01119
161. Putnam N.H., Srivastava M., Helsten U., Dirks B., Chapman J., Salamov A., Terry A., Shapiro H., Lindquist E., Kapitonov V.V., ... Rokhsar D.S. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoires and genomic organization. *Science*. 2007;6;317(5834):86–94. doi: 10.1126/science.1139158
162. Hall B.K. Evolutionary Developmental Biology. 2nd edition. Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1999. 509 p.
163. Hall B.K. The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol. Dev.* 2000;2(1):3–5. doi: 10.1046/j.1525-142x.2000.00032.x
164. Opitz J.M., Clark E.B. Heart development: an introduction. *Am. J. Med. Gen.* 2000;97(4):238–247. doi:10.1002/1096-8628(200024)97:4<238::AID-AJMG1274>3.0.CO;2-G
165. Carstens M.H. Development of the facial midline. *J. Craniofac. Surg.* 2002;13(1):129–187. doi: 10.1097/00001665-200201000-00032
166. Stone J.R., Hall B.K. Latent homologues for the neural crest as an evolutionary novelty. *Evol. Dev.* 2004;6(2):123–129. doi: 10.1111/j.1525-142x.2004.04014.x
167. Hall B.K. Bone and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology. Elsevier, 2015. doi: 10.1016/C2013-0-00143-0
168. Vickaryous M.K., Hall B.K. Human cell type diversity, evolution, development, and classification with special reference to cells derived from the neural crest. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2006;81(3):425–455. doi: 10.1017/S1464793106007068
169. Martinez-Morales J.-R., Henrich T., Ramiálison M., Wittbrodt J. New genes in the evolution of the neural crest differentiation program. *Genome Biol.* 2007;8(3):R36. doi: 10.1186/gb-2007-8-3-r36

**Сведения об авторах:**

**Наталья Юрьевна Пахомова**, к.м.н., ORCID: 0000-0002-9575-4096, e-mail: NPahomova@niito.ru  
**Елена Леонидовна Строкова**, к.б.н., ORCID: 0000-0002-5789-6982, e-mail: EZavyalova@niito.ru  
**Андрей Александрович Корыткин**, к.м.н., ORCID: 0000-0001-9231-5891, e-mail: andrey.korytkin@gmail.com  
**Вадим Витальевич Кожевников**, к.м.н., ORCID: 0000-0003-2556-3347, e-mail: vadim-barnaul@bk.ru  
**Аркадий Федорович Гусев**, к.м.н., ORCID: 0000-0003-1572-0089, e-mail: agusev@niito.ru  
**Алла Михайловна Зайдман**, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-6613-1615, e-mail: zaydmanam@gmail.com

**Information about the authors:**

**Natalya Yu. Pakhomova**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-9575-4096, e-mail: NPahomova@niito.ru  
**Elena L. Strokovna**, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-5789-6982, e-mail: EZavyalova@niito.ru  
**Andrey A. Korytkin**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-9231-5891, e-mail: andrey.korytkin@gmail.com  
**Vadim V. Kozhevnikov**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-2556-3347, e-mail: vadim-barnaul@bk.ru  
**Arkady F. Gusev**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-1572-0089, e-mail: agusev@niito.ru  
**Alla M. Zaydman**, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-6613-1615, e-mail: zaydmanam@gmail.com

*Поступила в редакцию 10.10.2022*

*После доработки 11.11.2022*

*Принята к публикации 07.12.2022*

*Received 10.10.2022*

*Revision received 11.11.2022*

*Accepted 07.12.2022*

## Эхинококкоз и альвеококкоз головного мозга в практике нейрохирурга (обзор литературы и клинические случаи)

П.Г. Шнякин<sup>1,2</sup>, П.Г. Руденко<sup>1,2</sup>, А.В. Ботов<sup>1,2</sup>, И.А. Казадаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России  
660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

<sup>2</sup>Краевая клиническая больница  
660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3а

### Резюме

В статье представлен обзор современных научных публикаций по эхинококкозу и альвеококкозу головного мозга, которые встречаются в 1–4 % случаев среди всех объемных образований центральной нервной системы. Несмотря на то что данные паразитарные заболевания более характерны для эндемичных районов развивающихся стран Азии, Южной Америки, Австралии и Новой Зеландии, отдельные клинические случаи наблюдаются повсеместно, в том числе за счет миграции населения, и их необходимо дифференцировать, в первую очередь, с внутримозговыми кистами, абсцессами, кистозными опухолями. Клинические проявления эхинококкоза и альвеококкоза головного мозга включают развитие гипертензивной симптоматики, очагового неврологического дефицита, судорожного синдрома (при корковой локализации кист). В обзоре представлены современные возможности методов диагностики (среди которых главную роль играют методы нейровизуализации, такие как мультиспиральная компьютерная томография и магнитно-резонансная томография с использованием контраста/парамагнетика), а также хирургического и медикаментозного лечения пациентов с эхинококкозом и альвеококкозом головного мозга. Также описаны два собственных клинических наблюдения пациентов, находившихся на стационарном лечении в нейрохирургическом отделении Краевой клинической больницы г. Красноярска.

**Ключевые слова:** эхинококкоз головного мозга, альвеококкоз головного мозга, гидатидные кисты головного мозга.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Казадаева И.А., e-mail: inna.alex913@gmail.com

**Для цитирования:** Шнякин П.Г., Руденко П.Г., Ботов А.В., Казадаева И.А. Эхинококкоз и альвеококкоз головного мозга в практике нейрохирурга (обзор литературы и клинические случаи). *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(1):30–39. doi: 10.18699/SSMJ20230103

## Echinococcosis and alveococcosis of the brain in the practice of a neurosurgeon (a review literature and clinical cases)

P.G. Shnyakin<sup>1,2</sup>, P.G. Rudenko<sup>1,2</sup>, A.V. Botov<sup>1,2</sup>, I.A. Kazadaeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Professor V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University of Minzdrav of Russia  
660022, Krasnoyarsk, Partizana Zheleznyaka str., 1

<sup>2</sup>Krasnoyarsk Clinical Regional Hospital  
660022, Krasnoyarsk, Partizana Zheleznyaka str., 3a

### Abstract

The article presents an overview of modern scientific publications on echinococcosis and alveococcosis of the brain, which occur in 1–4 % of cases among all volumetric formations of the central nervous system. Despite the fact that these parasitic diseases are more common in endemic areas of developing countries in Asia, South America, Australia and New Zealand, isolated clinical cases are observed everywhere, including due to population migration, and they must be

differentiated, first of all, from intracerebral cysts, abscesses, cystic tumors. Clinical manifestations of echinococcosis and alveococcosis of the brain include the development of hypertensive symptoms, focal neurological deficit, convulsive syndrome (with cortical localization of cysts). The article presents the modern possibilities of diagnostic methods (among which the main role is played by neuroimaging methods, such as multislice computed tomography and magnetic resonance imaging using contrast/paramagnet), and surgical and medical treatment of patients with echinococcosis and alveococcosis of the brain. The article also describes two own clinical observations of patients who were hospitalized in the neurosurgical department of the Regional Clinical Hospital (Krasnoyarsk).

**Key words:** echinococcosis of the brain, alveococcosis of the brain, hydatid cysts of the brain.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Correspondence author:** Kazadaeva I.A., e-mail: inna.alex913@gmail.com

**Citation:** Shnyakin P.G., Rudenko P.G., Botov A.V., Kazadaeva I.A. Echinococcosis and alveococcosis of the brain in the practice of a neurosurgeon (a review literature and clinical cases). *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(1):30–39. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230103

## Эпидемиология

Паразитарные поражения головного мозга в основном наблюдаются в странах Азии, Южной Америки, Австралии и Новой Зеландии. При этом эпизодически могут встречаться повсеместно, в том числе за счет миграции населения [1, 2]. По данным Т.Н. Трофимовой и соавт., среди всех наблюдаемых случаев эхинококкоза и альвеококкоза головного мозга 92 % пациентов – жители сельской местности [3]. Эхинококковые кисты головного мозга преимущественно наблюдаются у детей [2, 4–9], средний возраст заболевания среди взрослых – 20–30 лет [1, 10, 11]. По некоторым данным, эхинококкоз головного мозга несколько чаще встречается у мужчин [3, 9, 11, 12]. В зарубежной литературе эхинококкоз и альвеококкоз обозначают как «гидатидные заболевания» и «гидатидные кисты» («hydatid disease», «hydatid cyst»), которые в общей структуре объемных образований головного мозга занимают 1–4 % [6, 7, 9, 11, 13].

## Патогенез и клиническая картина

Возбудитель эхинококкоза – ленточный червь *Echinococcus granulosus*, для которого человек является промежуточным хозяином. Паразит попадает в организм алиментарным путем. Типичным является поражение печени (75 %) и легких (15 %), редко затрагиваются почки, селезенка, сердце. На долю центральной нервной системы приходится 2–5 % случаев [14–16]. Возбудитель альвеококкоза – *Echinococcus alveolaris*. Для заболевания характерно длительное (в течение 5–15 лет) бессимптомное поражение печени, а первые симптомы обусловлены чаще всего печеночной недостаточностью. Паразит склонен из печени метастазировать через кровеносную систему и проникать в другие органы, включая головной мозг.

Для альвеококкоза и эхинококкоза более характерно поражение супратенториальных структур (бассейн средней мозговой артерии), чем субтенториальных [16, 17]. R. Alok et al. описали крайне редкий случай удаления эхинококковой кисты варолиевого моста у пятилетней девочки [18]. Описаны немногочисленные случаи поражения эхинококком и альвеококком спинного мозга [1, 19]. Редко могут встречаться внутрижелудочковые и цистернальные локализации паразитов [16, 20, 21]. M. Gazzaz et al. описывают редкий случай эпидурального расположения в задней черепной ямке эхинококковой кисты у ребенка 5 лет [22]. Н. Kharosekar et al. опубликовали клинический случай множественных эхинококковых кист, локализованных в эпидуральном пространстве лобных долей у пациентки 20 лет [9]. Данный случай особо интересен тем, что первичный очаг эхинококкоза в печени, легких или других органах не найден, и случай расценен как первично-множественный церебральный эхинококкоз.

Наиболее часто наблюдается солитарная форма эхинококкоза – одиночная киста, размеры которой варьируют от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров, иногда достигая 10–16 см [1, 2, 23]. Множественные формы встречаются достаточно редко и возникают при разрыве первичной кисты или при первичном заносе протосколексов из печени или легких [2, 24]. А. Yurt et al. описывают клинический случай наличия 24 эхинококковых кист у пациентки 19 лет [25], Н. Cavişoğlu et al. – 19 церебральных эхинококковых кист у подростка 15 лет [26].

Для альвеококкоза более характерно первично-множественное поражение головного мозга [19]. Клинически эхинококкоз и альвеококкоз головного мозга характеризуются развитием гипертензивной симптоматики, очагового неврологического дефицита, судорожного синдрома (при корковой локализации кист) [2, 4, 7, 9, 10]. Большинство пациентов с гидативными кистами жа-

люются на головную боль. По данным Т.Н. Трофимовой и соавт., в патогенезе головной боли могут участвовать не только гипертензионный синдром, но и реактивные изменения в оболочках головного мозга на фоне паразитарной инвазии [3].

Данные паразитозы характеризуются медленным ростом, что определяет длительную компенсацию состояния, и только при достижении больших размеров кист или выраженного перифокального отека могут произойти срыв церебрального комплайенса и появление симптоматики [2]. По данным ряда исследователей, большинство пациентов с эхинококкозом и альвеококкозом головного мозга поступают в состоянии суб- или декомпенсации, что значительно ухудшает прогноз заболевания [3, 7, 12, 27].

### **Диагностика**

Ведущим методом диагностики паразитарного поражения головного мозга является МРТ [3, 5, 27, 28]. Для эхинококкоза характерна крупная однокамерная тонкостенная киста ликворной плотности (низкоинтенсивный сигнал на T1-взвешенных изображениях и высокоинтенсивный на T2-взвешенных изображениях) без перифокального отека [3, 6, 24]. В редких случаях наблюдается перифокальный отек [29]. Некоторые авторы объясняют появление перифокального отека инфицированием и воспалением паразитарной кисты [7, 17]. При введении парамагнетика не отмечается усиления сигнала от стенки кисты [2, 6, 11]. Кальцификаты не характерны и встречаются очень редко, возможны при дегенерации кисты [11, 30, 31]. Для альвеококкоза более характерны множественные мелкие кистозные и кистозно-солидные образования (от 3 до 20 мм) с перифокальным отеком, кольцевидно накапливающие контраст или парамагнетик [2, 3, 27]. Часто наблюдаются кальцинаты, которые лучше видны при проведении МСКТ [3, 11]. Учитывая нейровизуальные характеристики, именно при альвеококкозе наиболее часто могут возникать трудности в дифференциальной диагностике со злокачественными опухолями и абсцессами головного мозга.

Серологическая диагностика основывается на выявлении специфических антител к эхинококковому антигену реакциями непрямой гемагглютинации, латекс-агглютинации и иммуноферментного анализа. При комплексном использовании нескольких видов серологических реакций суммарно они дают положительный результат в 80–85 % случаев [16, 24]. При этом, по многочисленным наблюдениям, у пациентов с гидатидными кистами часто наблюдаются отрицательные реак-

ции на антитела к паразиту, поэтому результаты серологических исследований могут подтвердить диагноз эхинококкоза и альвеококкоза, но отрицательные реакции не могут их полностью исключить [1, 10, 32, 33].

Дифференциальная диагностика эхинококкоза и альвеококкоза достаточно сложна. Кистозные и кистозно-солидные образования при данных паразитозах необходимо дифференцировать с другими паразитами (нейроцистицеркоз), порэнцефалическими кистами, арахноидальными кистами, эпидермальными кистами, церебральными абсцессами и кистозными опухолями [17]. Т.М. Оморов и соавт., наблюдавшие за 15 лет на территории Кыргызстана 105 детей с эхинококкозом головного мозга, отмечают, что первично у 54 пациентов был выставлен диагноз «опухоль головного мозга», у 13 – «абсцесс головного мозга». При этом указывается, что наиболее часто эхинококкоз мозга до операции предполагался при наличии сочетанного поражения печени и легких [4]. Обратную ситуацию описывают Т.Н. Трофимова и соавт., когда из семи пациентов с выставленным по МРТ диагнозом «эхинококкоз головного мозга» после операции и гистологического заключения у троих верифицирована астроцитомы, у двоих – внутримозговые кисты и в одном случае – медуллобластома и абсцесс головного мозга [3].

Кисты при нейроцистицеркозе, как правило, меньшего размера и часто кальцифицированы. Церебральные абсцессы имеют более выраженный перифокальный отек, толстую стенку, которая интенсивно накапливает контрастное вещество, а на МРТ отмечается ограничение диффузии. Кистозные астроцитомы имеют солидный компонент, а арахноидальные и порэнцефалические кисты не со всех сторон окружены паренхимой мозга [5].

Диагноз первичного альвеококкоза и эхинококкоза головного мозга выставляется в случаях отсутствия поражения других органов. При поражении других органов, прежде всего печени и легких, данные паразитозы рассматриваются как вторичные [15]. По некоторым данным, первичные гидатидные кисты головного мозга более характерны для детей [16].

### **Тактика ведения**

Несмотря на то что основа лечения всех паразитозов – длительное назначение противогельминтных препаратов (празиквантел, альбендазол и др.), при поражении головного мозга всегда рассматривается вопрос об их хирургическом удалении [7, 15, 34]. При небольших размерах и

глубинном расположении кисты может рассматриваться консервативная терапия альбендазолом под динамическим нейровизуальным контролем. Медикаментозное лечение также остается единственным выбором, когда по каким-то причинам кисты признаются неоперабельными [10, 35]. Начало терапии может привести к нарастанию отека, что требует применения стероидов. Некоторые авторы рекомендуют начинать использование кортикостероидов за 2–3 дня до лечения и продолжать во время проведения терапии [36]. При больших размерах кисты операция является единственным радикальным методом лечения. По многочисленным данным полное удаление кисты в большинстве случаев приводит к выздоровлению пациентов [4, 6, 16, 33, 37, 38].

Ключевой момент хирургии – не повредить стенку кисты во время удаления во избежание диссеминации процесса и развития анафилактического шока [9, 13, 24]. Большинство авторов для этого рекомендуют использовать технику гидропрепарирования Даулинга (Dowling's technique). Суть метода сводится к экономной энцефалотомии и помещению катетеров между кистой и мозговой паренхимой, по которым вливается физиологический раствор, и постепенно киста выдавливается наружу. При правильном позиционировании головы, используя пробу Вальсальвы, можно удалить кисту целиком без разрыва [34]. По данным С. Onal et al., удалить гидативную кисту без повреждения стенки удается в 60–70 % случаев [39]. А. Ciurea et al. описан случай смерти пациента от анафилактического шока после непреднамеренного вскрытия кисты на операции [6]. В случае интраоперационного вскрытия кисты А.М. Altibi et al. рекомендуют экстренно удалить ее содержимое и промыть образовавшуюся полость гипертоническим раствором [34].

По данным некоторых авторов, рецидивы после операции случаются в 25–30 % случаев [6, 18]. Для снижения риска рецидива все пациенты после операции должны получать противопаразитарные препараты под наблюдением инфекциониста и динамическим нейровизуальным контролем [10, 40]. По длительности приема альбендазола после операции мнения специалистов расходятся, и диапазон колеблется от нескольких дней до нескольких месяцев, в среднем 4–6 месяцев [10, 17, 40]. Некоторые исследователи рекомендуют предоперационное назначение альбендазола, что, по их мнению, способствует снижению напряжения стенки кисты, снижает риск анафилаксии и диссеминации паразита при непреднамеренном интраоперационном разрыве кисты [7, 8, 13, 16].

Ниже представлены два собственных клинических наблюдения.

### Клинический случай № 1

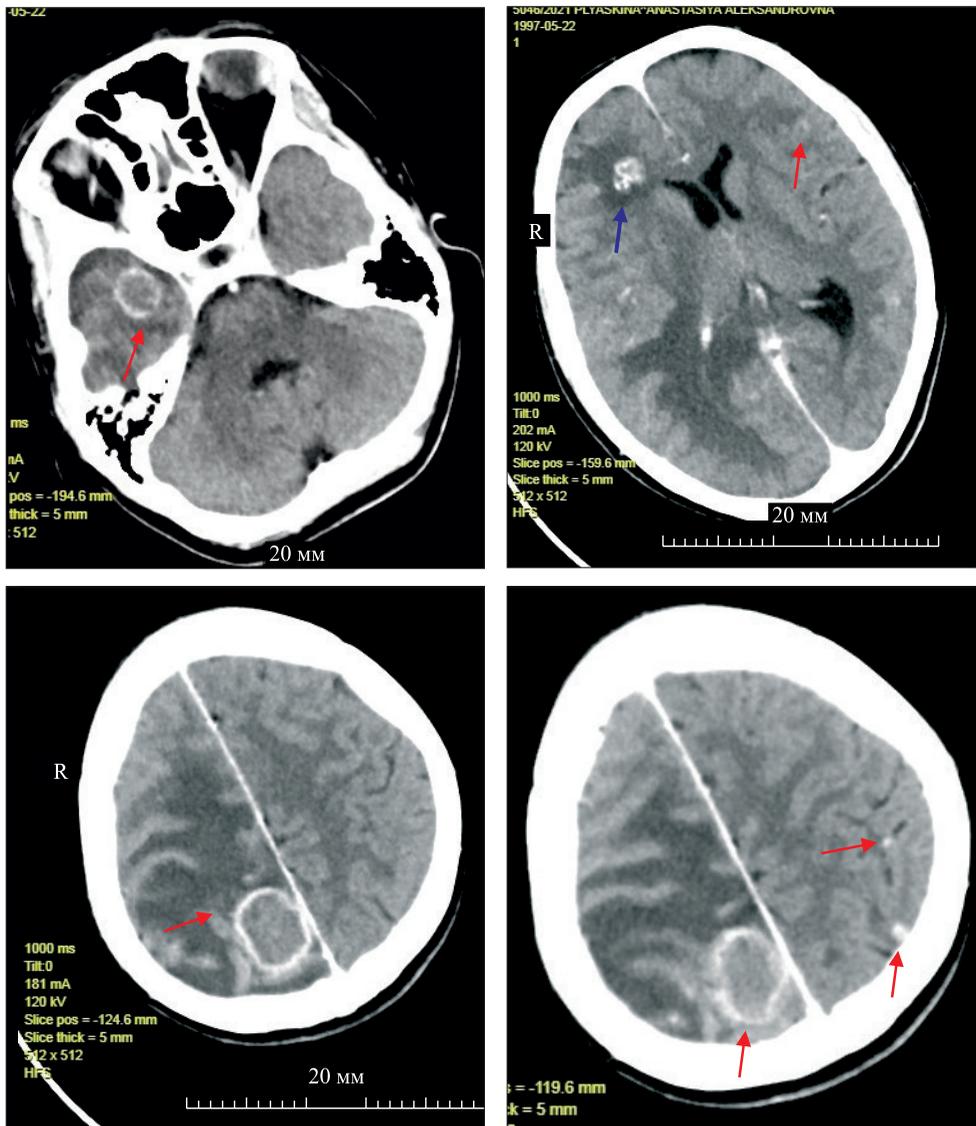
Пациентка П. 23 лет, доставлена «скорой помощью» в приемный покой Краевой клинической больницы. На момент осмотра критика снижена, активно жалоб не предъявляет. Со слов родственников, болеет около одного месяца, когда в послеродовом периоде (естественные роды 1, срочные) отмечала общую слабость, повышение температуры тела (с субфебрильной до 40 °С). Известно, что некоторое время назад наблюдалась в другом лечебном учреждении по поводу объемных образований в печени и легких. В неврологическом статусе – левосторонний легкий гемипарез до 4 баллов.

По данным МСКТ головного мозга без внутривенного контрастного усиления, в лобных, теменных и височных долях определяются множественные образования гетерогенной плотности. Крупные образования правых височной и теменной долей имеют неровные бугристые контуры, более плотные по периферии, с зоной перифокального отека. Некоторые образования с обызвествлением. В фазе накопления определяется накопление контраста в виде неравномерного тонкого ободка по периферии образования с наличием перегородок и отсутствием его накопления в центре (рис. 1). Заподозрено паразитарное поражение головного мозга. По МСКТ легких и печени также выявлены очаги паразитарного поражения (рис. 2).

Учитывая анамнез и данные дополнительных методов обследования, выставлен диагноз: «альвеококкоз с множественным поражением головного мозга, легких и печени». Пациентка направлена на лечение к инфекционисту под динамическим наблюдением нейрохирурга.

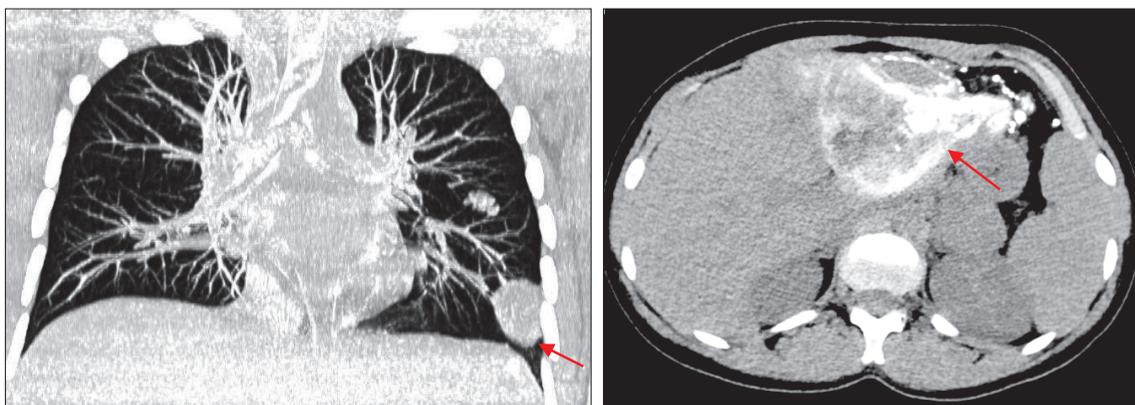
### Клинический случай № 2

Пациент С. 51 года, в 2018 г. оперирован по поводу альвеококкоза печени и легкого (рис. 3). В 2019 г. развился судорожный приступ, по поводу чего с подозрением на острое нарушение мозгового кровообращения пациент доставлен в приемный покой Краевой клинической больницы г. Красноярск. По данным МСКТ определяется объемное образование правой теменной доли с выраженным перифокальным отеком, интенсивно накапливающее контрастное вещество. Несколько кпереди от него определяется еще один небольшой очаг, накапливающий контрастное вещество (рис. 4).



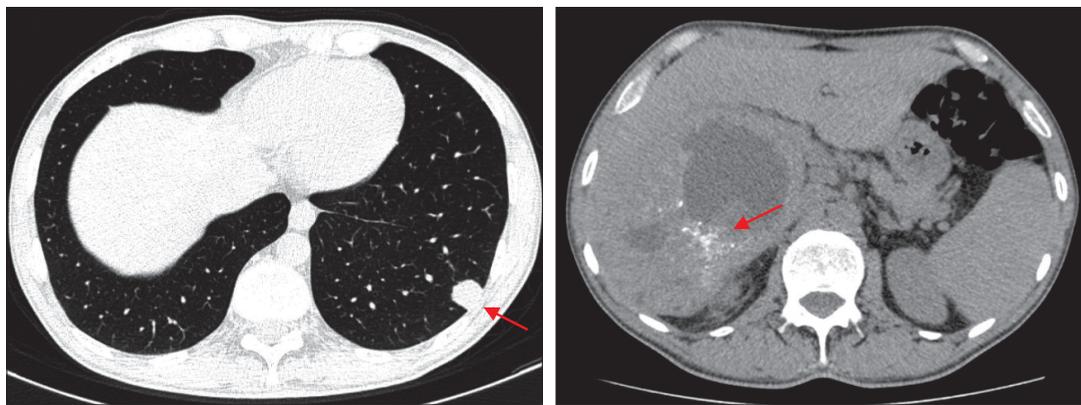
**Рис. 1.** МСКТ головного мозга с контрастным усилением. Множественные объемные образования в обеих гемисферах с перифокальным отеком, кольцевидно накапливающие контрастное вещество (красные стрелки). Обызвестленный очаг в правой лобной доле (синяя стрелка)

**Fig. 1.** MSCT of the brain with contrast enhancement. Multiple volumetric formations in both hemispheres with perifocal edema, annular accumulation of contrast agent (red arrows). Calcified focus in the right frontal lobe (blue arrow)



**Рис. 2.** МСКТ легких и печени. Стрелками указаны паразитарные очаги

**Fig. 2.** MSCT of the lungs and liver. Arrows indicate parasitic foci



**Рис. 3.** МСКТ легких и печени. Стрелками указаны паразитарные очаги  
**Fig. 3.** MSCT of the lungs and liver. Arrows indicate parasitic foci



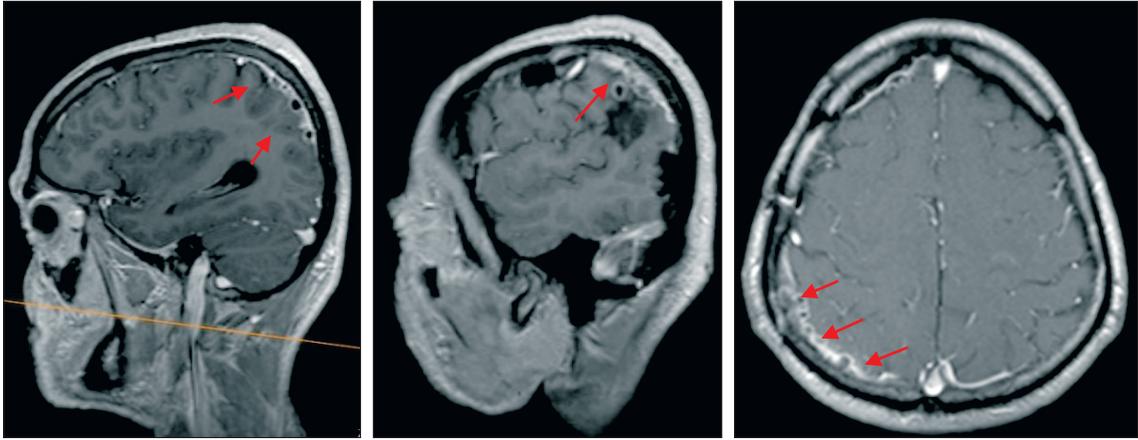
**Рис. 4.** МСКТ головного мозга с контрастным усилением. Объемное образование правой теменной доли (красная стрелка) с выраженным перифокальным отеком, кольцевидно накапливающее контрастное вещество (с наличием внутренних перегородок). Кпереди от него еще один небольшой очаг, интенсивно накапливающий контрастное вещество (синяя стрелка)  
**Fig. 4.** MSCT of the brain with contrast enhancement. Volumetric formation of the right parietal lobe (red arrow) with pronounced perifocal edema, annularly accumulating contrast agent (with the presence of internal partitions). Anterior to it is another small focus, intensively accumulating a contrast agent (blue arrow)

Учитывая анамнез, не исключается паразитарный характер образования. Выполнена операция: костно-пластическая трепанация черепа, удаление объемного образования. Через год при контрольном МРТ в области удаленного очага описаны кистозно-атрофические изменения, при этом в области трепанации – диссеминация альвеококка по конвексимальной поверхности (рис. 5). Появление дочерних цист, вероятно, связано с повреждением капсулы паразита в ходе операции и диссеминацией процесса по субарахноидально-

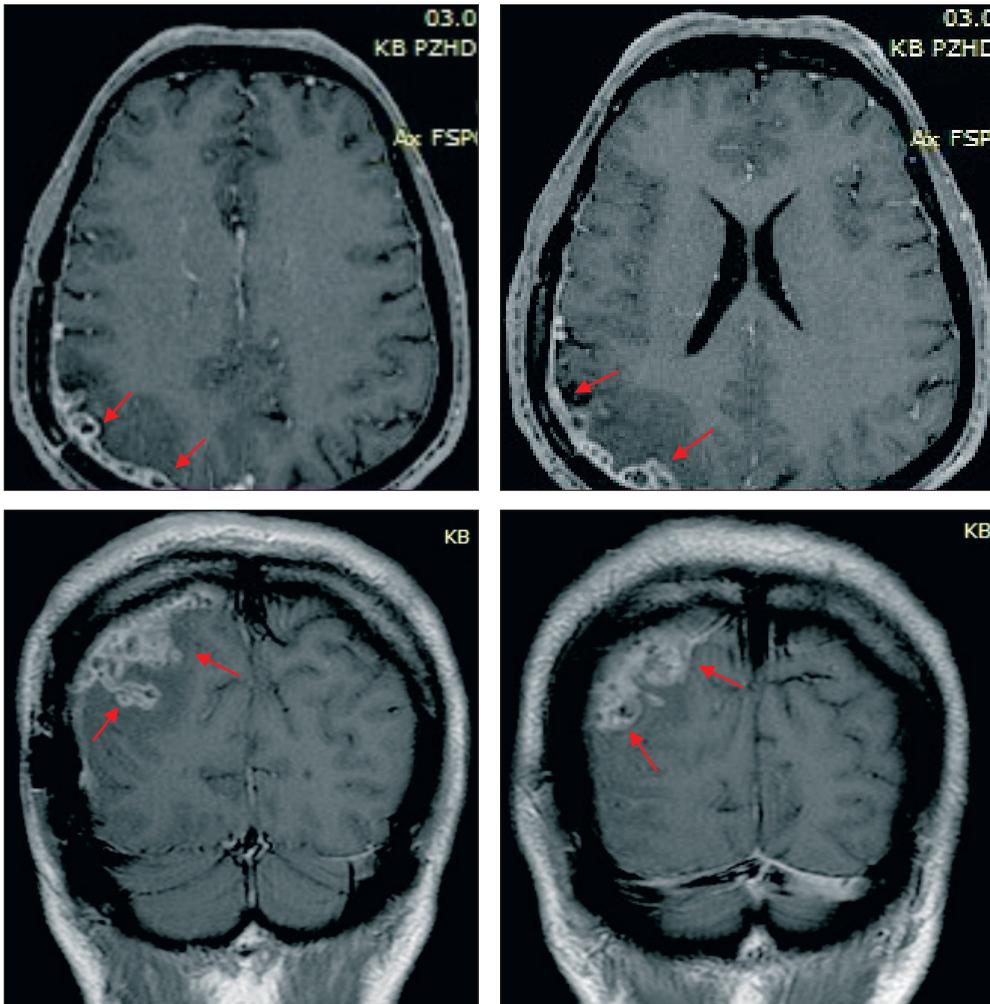
му пространству. Еще через 6 месяцев выполнено МРТ в динамике, отмечается увеличение количества очагов паразитарного поражения в зоне операции (рис. 6). Пациент направлен к инфекционисту для продолжения лечения.

### Заключение

Относительно нечастая встречаемость эхинококкоза и альвеококкоза головного мозга обуславливают трудность их дифференциальной



**Рис. 5.** МРТ головного мозга в режиме T1-ВИ с парамагнетиком. Множественные кисты альвеококка по конвексальной поверхности правой теменной доли  
**Fig. 5.** MRI of the brain in T1-WI mode with a paramagnet. Multiple cysts of alveococcus on the convexital surface of the right parietal lobe



**Рис. 6.** МРТ головного мозга в режиме T1-ВИ с парамагнетиком. Отмечается увеличение количества кист альвеококка по конвексальной поверхности правой теменной доли  
**Fig. 6.** MRI of the brain in T1-WI mode with a paramagnet. There is an increase in the number of alveococcus cysts along the convexital surface of the right parietal lobe

диагностики с другими заболеваниями, прежде всего с кистозными опухолями и абсцессами. Медленный рост паразитарной кисты, особенно при эхинококкозе, определяет то, что пациенты длительно находятся в состоянии клинической компенсации и обычно поступают в медицинские учреждения уже с большим размером кисты и суб- или декомпенсацией внутричерепной гипертензии.

МРТ является основным методом диагностики данных паразитозов, на томограммах эхинококки выглядят как преимущественно одиночные кисты ликворной плотности без перифокального отека, не накапливающие парамагнетик, а альвеококк наиболее часто представлен множественными кистозно-солидными образованиями с выраженным перифокальным отеком и кольцевидным накоплением парамагнетика. Положительные серологические реакции подтверждают эхинококкоз и альвеококкоз, однако серонегативные случаи не исключают диагноз.

Преимущественным методом лечения эхинококковых и альвеококковых кист головного мозга является их хирургическое удаление с последующей длительной противопаразитарной терапией. При этом рецидивы могут возникать в 25–30 % случаев, особенно при непреднамеренном интраоперационном вскрытии паразитарной кисты. В неоперабельных случаях возможным методом лечения является длительное назначение противопаразитарных препаратов. Прогноз заболевания определяется распространенностью поражения головного мозга, тяжестью состояния при поступлении, а также сочетанным поражением других органов, прежде всего печени и легких. Пациенты с альвеококкозом в целом имеют более неблагоприятный прогноз.

### Список литературы / References

1. Du G., Li Y., Wu P., Wang X., Su R., Fan Y., Gend G. Diagnosis, treatment, and misdiagnosis analysis of 28 cases of central nervous system echinococcosis. *Chin. Neurosurg. J.* 2021;7(1):30. doi: 10.1186/s41016-021-00248-y
2. Wani N.A., Kousar T.L., Gojwari T., Robbani I., Singh M., Ramzan A., Khan Q., Kirmani A., Wani A. Computed tomography findings in cerebral hydatid disease. *Turk. Neurosurg.* 2011;21(3):347–351. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.3922-10.0
3. Трофимова Т.Н., Аманбаева Г.Т. Эхинококковые поражения головного мозга. *Луч. диагност. и терапия.* 2016;2(7):37–46. doi:10.22328/2079-5343-2016-2-37-46
4. Трофимова Т.Н., Аманбаева Г.Т. Cerebral hydatid lesions. *Luhevaya diagnostika i terapiya = Diagnostic*

*Radiology and Radiotherapy.* 2016;(2):37–46. [In Russian]. doi: 10.22328/2079-5343-2016-2-37-46

4. Оморов Т.М. Эхинококкозы головного мозга у детей. *Неврология и нейрохирургия Казахстана.* 2011;(4):18–20.

Omorov T.M. Echinococcosis of the brain in children. *Nevrologiya i neyrokhirurgiya Kazakhstana = Neurology and Neurosurgery of Kazakhstan.* 2011;(4):18–20. [In Russian].

5. Andronikou S., Welman C.J., Kader E. Classic and unusual appearances of hydatid disease in children. *Pediatr. radiol.* 2002; 32(11): 817–828. doi: 10.1007/s00247-002-0785-5

6. Ciurea A.V., Fountas K.N., Coman T.C., Machinis T.G., Kapsalaki E.Z., Fezoulidis N.I., Robinson J.S. Long-term surgical outcome in patients with intracranial hydatid cyst. *Acta Neurochir (Wien).* 2006;148(4):421–426. doi: 10.1007/s00701-005-0679-z

7. Gautam S., Sharma A. Intracranial hydatid cyst: a report of three cases in North-West India. *J. Pediatr. Neurosci.* 2018;13(1):91–95. doi: 10.4103/JPN.JPN\_141\_17

8. Imperato A., Consales A., Ravegnani M., Castagnola E., Bandettini R., Rossi A. Primary hydatid cyst of the brain in a child: a case report. *Pol. J. Radiol.* 2016;1(81):578–582. doi: 10.12659/PJR.898619

9. Kharosekar H., Bhide A., Rathi S., Sawardekar V. Primary multiple intracranial extradural hydatid cysts: a rare entity revisited. *Asian J. Neurosurg.* 2020;15(3):766–768. doi: 10.4103/ajns.AJNS\_262\_20

10. Bougharriou I., Elleuch E., Ben Hmida S., Meddeb A., Boudaouara Z., Kammoun B., Ben Jemaa M. Cystic lesions of the brain: Think of the hydatid cyst. *Tunis Med.* 2022;100(1):56–59.

11. Bükte Y., Kemaloglu S., Nazaroglu H., Ozkan U., Ceviz A., Simsek M. Cerebral hydatid disease: CT and MR imaging findings. *Swiss Medical Weekly.* 2004;134(31-32):459–467. doi: 10.57187/smw.2004.10711

12. Torgerson P.R., Karaeva R.R., Corkeri N., Abdyljaparov T.A., Kuttubaev O.T., Shaikenov B.S. Human cystic echinococcosis in Kyrgyzstan: an epidemiological study. *Acta Tropica.* 2003;85(1):51–61. doi: 10.1016/s0001-706x(02)00257-7

13. Gök H., Baskurt O. Giant primary intracranial hydatid cyst in child with hemiparesis. *World Neurosurg.* 2019;129:404–406. doi: 10.1016/j.wneu.2019.06.129

14. Ait Ben Ali S., Hilmani S., Choukri M., Sami A., El Azhari A., Achouri M., Ouboukhlik A., El Kamar A., Boucetta M. Multiple cerebral hydatid cysts of cardiac origin. A case report. *Neurochirurgie.* 1999;45(5):426–429.

15. Dhingra D., Sethi G.R., Mantan M. Intracranial hydatid cyst. *Indian J. Pediatr.* 2014;81(2):212. doi: 10.1007/s12098-013-1015-x

16. Kandemirli S.G., Cingoz M., Olmaz B., Akdogan E., Cengiz M. Cerebral hydatid cyst with

intraventricular extension: a case report. *J. Trop. Pediatr.* 2019;65(5):514–519. doi: 10.1093/tropej/fmy080

17. Binesh F., Mehrabian M., Navabii H. Primary brain hydatosis. *BMJ Case Rep.* 2011; 2011:bcr0620103099. doi: 10.1136/bcr.06.2010.3099

18. Alok R., Mahmoud J. Successful surgical treatment of a brain stem hydatid cyst in a child. *Case Rep. Surg.* 2020;5645812. doi:10.1155/2020/5645812

19. Сексяев Н.Е., Болотов И.С., Васильева Е.А., Злотникова М.А. Клинический случай диффузного альвеококкоза головного и спинного мозга. *Бюл. мед. интернет-конф.* 2016;6(5):722–723.

Seksyayev N.E., Bolotov I.S., Vasil'eva E.A., Zlotnikova M.A. Clinical case of diffuse alveococcosis of the brain and spinal cord. *Byulleten' meditsinskikh internet-konferentsiy = Bulletin of Medical Internet Conferences.* 2016;6(5):722–723. [In Russian].

20. Beskonakli E., Solaroglu I., Tun K., Albayrak L. Primary intracranial hydatid cyst in the interpeduncular cistern. *Acta Neurochir. (Wien).* 2005;147(7):781–783. doi: 10.1007/s00701-005-0551-1

21. Guzel A., Tatli M., Maciaczyk J., Altinors N. Primary cerebral intraventricular hydatid cyst: a case report and review of the literature. *J. Child. Neurol.* 2008;23(5):585–588. doi: 10.1177/0883073807309791

22. Gazzaz M., Bouyaakoub F. A., Akhaddar A., Derraz S., Elkhamli A. Epidural hydatid cyst of the posterior fossa. *Neurochirurgie* 2000;46(4):387–390.

23. Ghaemi K., Masoudifar M.A., Mehdi M., Solgi R., Kareshk A.T. Giant brain hydatid cyst in an adult: a new case report. *Turkiye Parazitolo. Derg.* 2021;45(1):76–79. doi: 10.4274/tpd.galenos.2020.6921

24. Потапов А.А., Горяйнов С.А., Охлопков В.А., Кравчук А.Д., Захарова Н.Е., Подопригора А.Е., Курносов А.Б., Хитъ М.А., Панина Т.Н., Елисеева Н.М. Множественный эхинококкоз головного мозга, сердца и почек. *Вопр. нейрохирургии.* 2011;75(1):57–65.

Potapov A.A., Goriaïnov S.A., Okhlopkov V.A., Kravchuk A.D., Zakharova N.E., Podoprigora A.E., Kurnosov A.B., Khit' M.A., Panina T.N., Eliseeva N.M. Multiple echinococcosis of brain, heart and kidneys. *Voprosy neyrokhirurgii imeni Nikolaya Nikolaevicha Burdenko = Burdenko's Journal of Neurosurgery.* 2011;75(1):57–65. [In Russian].

25. Yurt A., Avci M., Selçuki M., Ozer F., Camlar M., Uçar K., Taşlı F., Altinörs N. Multiple cerebral hydatid cysts. Report of a case with 24 pieces. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2007;109(9):821–826. doi: 10.1016/j.clineuro.2007.07.011

26. Cavuşoğlu H., Tuncer C., Ozdilmaç A., Aydin Y. Multiple intracranial hydatid cysts in a boy. *Turk. Neurosurg.* 2009;19(2):203–207.

27. Холин А.В., Аманбаева Г.Т. Современные методы нейровизуализации в диагностике альвеококкоза головного мозга. *Вестн. Сев.-Зап. гос. мед. ун-та им. И. И. Мечникова.* 2014;6(4):97–102.

Kholin A.V., Amanbaeva G.T. Modern imaging techniques in the diagnosis of brain alveococcosis (own observation). *Vestnik Severo-Zapadnogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta imeni Il'yi Il'yicha Mechnikova = Newsletter of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov.* 2014;6(4):97–102. [In Russian].

28. Limaiem F., Bellil S., Bellil K., Chelly I., Mekni A., Khaldi M., Haouet S., Zitouna M., Kchir N. Primary hydatidosis of the central nervous system: a retrospective study of 39 Tunisian cases. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2010;112(1):23–28. doi: 10.1016/j.clineuro.2009.09.001

29. Bahloul K., Ouerchefani N., Kammoun B., Boudouara M.Z. Unusual brain edema caused by an intracranial hydatid cyst: a case report and literature review. *Neurochirurgie.* 2009;55(1):53–56. doi: 10.1016/j.neuchi.2008.03.008

30. Abderrahmen K., Aouidj M.L., Kallel J., Khaldi M.M. Calcified cerebral hydatid cyst. *Neurochirurgie.* 2007;53(5):371–374. doi: 10.1016/j.neuchi.2007.07.032

31. Bouaziz M. Calcified cerebral hydatid cyst: a case report. *Sante.* 2005;15(2):129–132.

32. Brahem M., Hlel K., Ayadi A., Bedoui A., Hmila F., Mahjoub B., Boussoffara R., Sfar M.-T. Cerebral hydatid cysts in children: 4 cases. *Med. Mal. Infect.* 2006;36(8):434–437. doi: 10.1016/j.medmal.2006.04.005

33. Reddy D.R. Managing cerebral and cranial hydatid disease. *Neurol. India.* 2009;57(2):116–118. doi: 10.4103/0028-3886.51276

34. Altibi A.M.A., Qarajeh R.A.H., Belsuzarri T.A.B., Maani W., Kanaan T.M.A. Primary cerebral echinococcosis in a child: Case report – Surgical technique, technical pitfalls, and video atlas. *Surg. Neurol. Int.* 2016;7(37):893–898. doi: 10.4103/2152-7806.194512

35. Chen S., Li N., Yang F., Wu J., Hu Y., Yu S., Chen Q., Wang X., Wang X., Liu Y., Zheng J. Medical treatment of an unusual cerebral hydatid disease. *BMC Infect. Dis.* 2018;18(1):12. doi: 10.1186/s12879-017-2935-2

36. Dehkordi A.B., Sanei B., Yousefi M., Sharafi S.M., Safarnezhad F., Jafari R., Darani H.Y. Albendazole and treatment of hydatid cyst: review of the literature. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2019;19(2):101–104. doi: 10.2174/1871526518666180629134511

37. Acha-Sánchez J.L., Yaya-Loo J., Chipana-Sotomayor M.E. Cerebral hydatid cyst: Clinical case and review of the literature. *Neurocirugia (Astur).* 2017;28(4):207–210. doi: 10.1016/j.neucir.2016.11.001

38. Padayachy L.C., Dattatraya M. Hydatid disease (Echinococcus) of the central nervous system. *Childs Nerv. Sys.* 2018;34(10):1967–1971. doi:10.1007/s00381-018-3883-x

39. Onal C., Unal F., Barlas O., Izgi N., Hepgul K., Turantan M.I., Canbolat A., Turker K., Bayindir C.,

Gokay H.K., Kaya U. Long-term follow-up and results of thirty pediatric intracranial hydatid cysts: half a century of experience in the Department of Neurosurgery of the School of Medicine at the University of Istanbul (1952–2001). *Pediatr. Neurosurg.* 2001;35(2):72–81. doi: 10.1159/000050394

40. Brunetti E., Kern P., Angèle Vuitton D., Writing Panel for the WHO-IWGE. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop.* 2010;114(1):1–16. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.11.001

**Сведения об авторах:**

**Павел Геннадьевич Шнякин**, д.м.н., ORCID: 0000-0001-6321-4557, e-mail: shnyakinpavel@mail.ru

**Павел Геннадьевич Руденко**, к.м.н., ORCID: 0000-0001-9390-3134, e-mail: rpg30@rambler.ru

**Антон Витальевич Ботов**, к.м.н., ORCID: 0000-0001-6393-0430, e-mail: doktor\_anton@rambler.ru

**Инна Александровна Казадаева**, ORCID: 0000-0002-1562-6976, e-mail: inna.alex913@gmail.com

**Information about the authors:**

**Pavel G. Shnyakin**, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-6321-4557, e-mail: shnyakinpavel@mail.ru

**Pavel G. Rudenko**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-9390-3134, e-mail: rpg30@rambler.ru

**Anton V. Botov**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-6393-0430, e-mail: doktor\_anton@rambler.ru

**Inna A. Kazadaeva**, ORCID: 0000-0002-1562-6976, e-mail: inna.alex913@gmail.com

*Поступила в редакцию 29.10.2022*

*Принята к публикации 16.01.2023*

*Received 29.10.2022*

*Accepted 16.01.2023*

## Зависит ли толщина стенки левого ушка сердца и его перешейка от их макроскопических характеристик?

А.А. Гапонов<sup>1</sup>, Е.Г. Дмитриева<sup>1,2</sup>, Я.С. Малов<sup>1</sup>, А.А. Якимов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Уральский государственный медицинский университет Минздрава России  
620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3

<sup>2</sup>Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина  
620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19

### Резюме

Информация о возможной зависимости толщины стенок левого ушка сердца (ЛУС) и околоушковых зон левого предсердия важна для прогнозирования операционных рисков при установке окклюдеров в устье ЛУС и выполнении операции «лабиринт» по поводу фибрилляции предсердий. Цель исследования – выявить значимые взаимосвязи между макроскопическими характеристиками ЛУС (размерами, формой, количеством долей) и толщиной стенок ЛУС и его перешейка. **Материал и методы.** Из 50 макропрепаратов сердец пациентов, умерших от причин, не связанных с болезнями сердца, изготовили анатомические срезы ( $n = 60$ ), которые изучили при помощи стереоскопического микроскопа Olympus SZX2-ZB10, а также гистологические препараты. **Результаты и их обсуждение.** Оболочки стенки ЛУС были значительно тоньше, чем аналогичные оболочки в его перешейке. Прямые корреляционные связи между внешними размерами ЛУС и значениями толщины его оболочек не обнаружены. Выявлена обратная корреляция ( $R_s = -0,4$ ,  $p < 0,05$ ) между толщиной миокарда, эндокарда и размерами ЛУС. Толщина стенок ЛУС в форме «куриного крыла», «цветной капусты» и «наконечника стрелы» одинакова, но стенка однодолевых ЛУС по сравнению с двухдолевыми оказалась более тонкой ( $p = 0,036$ ). Стенка перешейка ЛУС была более тонкой ( $p = 0,03$ ) на препаратах с ЛУС в форме «цветной капусты» по сравнению с сердцами, у которых ЛУС имело форму «куриного крыла». Различия толщины стенок у ЛУС разной формы обусловлены степенью развития подэпикардальной жировой клетчатки. Во избежание перфорации стенки при манипуляциях в околоушковой зоне и полости ЛУС следует соблюдать максимальную осторожность у пациентов с однодолевыми ЛУС и ЛУС в форме «цветной капусты». **Заключение.** Выявлены клинически значимые взаимосвязи между толщиной стенки ЛУС и количеством его долей, а также между толщиной стенки перешейка ЛУС и вариантами формы ЛУС.

**Ключевые слова:** анатомия человека, анатомия сердца, предсердия, ушки сердца, миокард, перешеек левого ушка сердца.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Якимов А.А., e-mail: ayakimov07@mail.ru

**Для цитирования:** Гапонов А.А., Дмитриева Е.Г., Малов Я.С., Якимов А.А. Зависит ли толщина стенки левого ушка сердца и его перешейка от их макроскопических характеристик? *Сибирский научный медицинский журнал.* 2023;43(1):40–46. doi: 10.18699/SSMJ20230104

## Does the wall thickness of the left atrial appendage and its isthmus depend on their macroscopic characteristics?

A.A. Gaponov<sup>1</sup>, E.G. Dmitrieva<sup>1,2</sup>, Ya.S. Malov<sup>1</sup>, A.A. Iakimov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>The Ural State Medical University of Minzdrav of Russia  
620028, Yekaterinburg, Repina str., 3

<sup>2</sup>Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin  
620002, Ekaterinburg, Mira str., 19

## Abstract

Knowledge in interrelations between gross anatomy of the left atrial appendage (LAA) and thickness of the walls of LAA and periauricular area enables decreasing operational risks in LAA ostium occluding and “Cox-Maze” surgery for atrial fibrillation. The aim of the study was to identify significant interrelations between the macroscopic characteristics of the LAA (size, shape, number of lobes) and the parameters of the wall thickness of the LAA and its isthmus. **Material and methods.** The study includes 50 heart specimens of patients died from non-cardiac diseases. We examined 60 anatomical sections from 30 hearts by means Olympus SZX2-ZB10 microscope, and histological slices from 20 hearts. **Results.** The layers of the LAA wall were thinner than those in the isthmus. The thickness of LAA walls did not show direct correlation with the external dimensions of LAA. We found inverse correlation ( $R_s = -0.4, p < 0,05$ ) between the thickness of the myocardium, endocardium and some external sizes of LAA. The wall thickness of «chicken wing», «cauliflower» and «arrowhead» was the same. The wall of single-lobe LAA was thinner than that of two-lobed LAA ( $p = 0.036$ ). The LAA isthmus wall was thinner ( $p = 0.03$ ) in hearts with «cauliflower» LAA compared to hearts with LAA resembled a «chicken wing». Differences in wall thickness in LAA of various shapes were due to the degree of subepicardial fatty tissue development. Intracardiac operations should be done with the utmost care in patients with “cauliflower” LAA and single-lobe LAA to avoid damage of the LAA and periauricular area. **Conclusions.** The research found clinically significant interrelations between the LAA wall thickness and the number of its lobes as well as between the LAA isthmus wall thickness and LAA shape variants.

**Key words:** human anatomy, heart anatomy, atria, atrial auricles, atrial appendages, myocardium, left atrial appendage isthmus.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Correspondence author:** Iakimov A.A., e-mail: ayakimov07@mail.ru

**Citation:** Gaponov A.A., Dmitrieva E.G., Malov Ya.S., Iakimov A.A. Does the wall thickness of the left atrial appendage and its isthmus depend on their macroscopic characteristics? *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(1):40–46. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230104

## Введение

Левое ушко сердца (ЛУС) является особым отделом левого предсердия (ЛП), имеющим ряд специфических особенностей строения и положения. В сердце живого человека, находящегося в «анатомически правильном», ортоградном положении (стоя прямо на ногах), ЛУС по отношению к телу предсердия расположено спереди и несколько сверху. ЛУС – единственная часть ЛП, которая находится полностью интраперикардially. В отличие от правого ушка сердца, ЛУС обычно имеет хорошо выраженную шейку и устье, за счет которых оно четко обособлено от тела ЛП. Форма ЛУС отличается выраженной индивидуальной изменчивостью, в литературе представлены по меньшей мере пять ее классификаций [1]. Для российской анатомии традиционным является выделение червеобразного, лопастеобразного ЛУС и ЛУС в форме «петушиного гребня» [2], однако такая классификация не используется в практической медицине. J.P. Veinot et al. классифицировали ЛУС, исходя из количества его долей [3]. Наиболее распространенной является классификация, предложенная Y. Wang et al., согласно которой (в модификации K. Słodowska et al.) выделяют ЛУС в форме «куриного крыла», «цветной капусты» и «наконечника стрелы» [4, 5]. На фоне обилия информации о вариантах фор-

мы ЛУС данные о строении стенок ЛУС, околоушковых участков, в том числе перешейка ЛУС, представлены в единичных публикациях [6–9].

Научно-теоретическая значимость изучения особенностей строения стенки ЛУС состоит в необходимости пополнять и корректировать представления о нормальной (типовой и вариантной) анатомии сердца человека, выявлять типы анатомического соответствия между формой ЛУС и строением его стенок, определять особенности и формулировать закономерности строения. Сведения об особенностях стенки ЛУС важны не только для фундаментальной науки, но и для практической медицины. У пациентов с инсультами, развившимися вследствие тромбоэмболий, ЛУС было местом формирования тромбов не менее чем в 90 % случаев [10, 11]. ЛУС, имевшие три и более доли, встречались чаще у пациентов с тромбозами ЛУС, тогда как для пациентов без этой патологии характерны двухдолевые ЛУС [12]. Из литературы известны и другие анатомические предикторы высокого риска тромбообразования и тромбоэмболии из ЛУС: длинное ЛУС, большая площадь его устья, ЛУС любой формы по Y. Wang et al., кроме «куриного крыла» («non-chicken wing») [12, 13]. С целью предупреждения тромбоэмболий в последние годы развиваются технологии герметизации устья ЛУС с использованием окклюдеров разных моди-

фикаций. Самым частым (от 0,68 до 3,6 %) интраоперационным осложнением таких вмешательств оказался гемоперикард, который возникал из-за перфорации стенки ЛУС усами окклюдера [14]. Возможно, те или иные формы ЛУС ассоциированы с определенными характеристиками их стенок. Насколько нам известно, исследований, в которых сопоставляли бы анатомию стенок ЛУС и околоушковых зон, в том числе области его перешейки, с внешним строением ЛУС, не проводилось.

Цель исследования – выявить наличие значимых взаимосвязей между макроскопическими характеристиками ЛУС (размерами, формой, количеством долей) и параметрами толщины стенок ЛУС и его перешейки.

## Материал и методы

Изучены препараты сердца мужчин и женщин 35–89 лет ( $n = 50$ ), тела которых не были востребованы для захоронения; возможность получения информированного согласия отсутствовала. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России (протокол № 8 от 20.11.2020).

Критерии включения в исследование: 1) обычно сформированное и обычно расположенное сердце, 2) масса сердца 250–400 г, 3) отсутствие в структуре диагноза заболевания сердца как основного, конкурирующего заболевания или осложнения основного заболевания, 4) отсутствие макроскопических признаков осложнений ишемической болезни сердца, кардиомиопатий, заболеваний предсердно-желудочковых клапанов, признаков перенесенных операций на сердце, 5) повреждение или деформация ЛУС, в том числе вскрытие ЛУС при подозрении на тромбоэмболию из него при криптогенном инсульте.

Препараты фиксировали погружением в 10%-й нейтральный формалин не менее чем на 48 часов так, чтобы полости ЛП и ЛУС были максимально расправлены и заполнены фиксатором. Измеряли длину ЛУС (от его основания до наиболее удаленной точки по кровотоку, т.е. до верхушки ЛУС) и ширину ЛУС (наибольшее расстояние между противоположными краями ЛУС, перпендикулярное длине). Под перешейком ЛУС (left atrial appendage isthmus) понимали участок стенки ЛП от устья ЛУС до левого предсердно-желудочкового отверстия [8]. Длиной перешейки считали кратчайшее расстояние от устья ЛУС до левого фиброзного кольца. Ширину перешейки определяли перпендикулярно его длине по проекциям крайних точек нижнего края устья ЛУС.

Для морфометрии макропрепаратов использовали электронный штангенциркуль ШЦЦ-1-125 0,01 (Челябинск, ЧИЗ; погрешность измерения 0,03 мм).

Из одних макропрепаратов ( $n = 30$ ) готовили анатомические срезы толщиной 4–5 мм, по два из каждого макропрепарата: один поперечный срез посередине длинной оси ЛУС и один продольный срез через устье ЛУС и его перешеек. Срезы изучали при помощи стереоскопического микроскопа Olympus SZX2-ZB10 с zoom-системой от 0,63 до 6,3 $\times$ , окулярами 10 $\times$  и объективом DFPL 0,75X-4 (Япония) при общем увеличении от 4,725 до 15,0 $\times$ . Для фотографирования и морфометрии использовали тринокуляр SZX2-TR30, цифровую камеру TourCam U31SPM18000KPA 5.1MP (TourTek, Китай), персональный компьютер и программное обеспечение TourView 3.5. Измеряли общую толщину стенки, т.е. кратчайшее расстояние от наружной поверхности эпикарда до внутренней поверхности эндокарда, а также толщину эндокарда, миокарда и эпикарда с подэпикардальной жировой клетчаткой.

Другая группа препаратов ( $n = 20$ ) была использована для изготовления гистологических препаратов стенок ЛУС и нижнего сектора околоушковой зоны (перешейка ЛУС). Срезы толщиной 3 мкм окрашивали гематоксилином Карazzi и эозином, пикрофуксином по ван Гизону (Лабико, Россия). Для изучения гистологических препаратов использовали микроскоп Olympus CX31RTSF. В программе ADF Image Capture 4.10. (2020) с помощью опции «сшивка» объединяли соседние поля зрения и получали цифровые гистотопограммы, которые фотографировали камерой TourCam U31SPM18000KPA 5.1MP и в программе Image J 1.53e (2020) выполняли измерения.

Оценивали распределение значений по W-критерию Шапиро – Уилка. Для дисперсионного анализа использовали H-критерий Крас-кела – Уоллиса, для парных сравнений – U-критерий Манна – Уитни. Учитывая небольшое количество наблюдений и частое отклонение распределения значений от нормального, результаты представляли в виде медианы, квартилей ( $Me [Q_1; Q_3]$ ) и крайних значений. Определяли коэффициент корреляции Спирмена ( $R_s$ ). Уровень значимости  $\alpha$  принимали равным 0,05.

## Результаты и их обсуждение

### Форма и размеры ЛУС и его перешейки

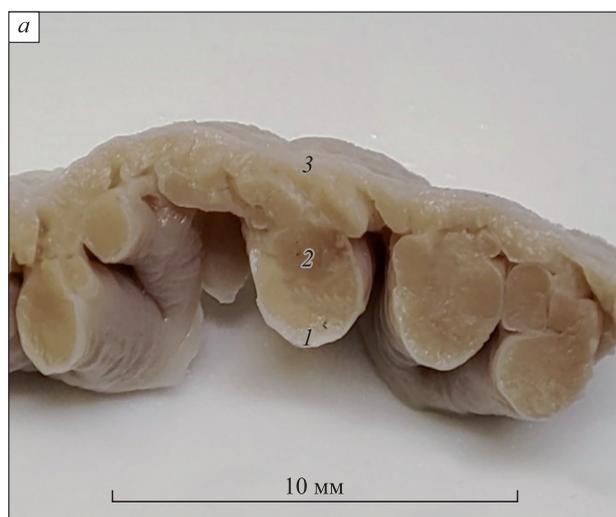
В настоящем исследовании установлено, что двухдолевые ЛУС встречались чаще, чем одно- и трехдолевые (соответственно в 23 и 7 случа-

ях,  $p < 0,000$ ). ЛУС в форме «куриного крыла» и «цветной капусты» отмечены с одинаковой частотой: по 13 случаев из 30 (43,3 %), ЛУС в форме «наконечника стрелы» – в четырех случаях (13,3 %). Длина ЛУС составила 32,9 [27,0; 36,6] мм и варьировала от 16 до 57 мм, ширина – соответственно 25,3 [21,8; 30,3] мм, от 11 до 47 мм. Более узкие диапазоны значений этих параметров представлены в работе А.Р. Stepanchuk et al.: длина ЛУС – от 25 до 42 мм, ширина – от 10,9 до 28,1 мм [9]. Ширина перешейка ЛУС, по нашим данным, равна 8,5 [7,5; 9,7] мм, варьировала от 3,5 до 14 мм, длина перешейка ЛУС – соответственно 11,5 [10,0; 12,8] мм, от 4,3 до 16,6 мм, что хорошо согласуется с результатами, полученными J.R. López-Mínguez et al. [15]. Несколько большие значения ( $14,2 \pm 4,8$  мм) привели D. Dudkiewicz et al. [16].

### Макромикроскопическая анатомия стенки ЛУС

Одним из анатомических маркеров стенок ушек сердца являются гребенчатые мышцы (трабекулы пристеночного типа), за счет которых усложняется внутренний рельеф стенок ЛУС. Мышечные пучки завиваются вокруг оси полости ЛУС как листья вокруг стебля («whorl-like fashion»), напоминая лист пальмы [17, 18]. Как установили А.Р. Stepanchuk et al., количество гребенчатых мышц варьирует от четырех до шести на медиальной стенке и от семи до девяти на латеральной стенке ЛУС, а ширина этих мышц равна 1–1,5 мм [9]. По нашим данным, в ЛУС формируются трехмерные трабекулярные сети,

лучше всего они выражены по краям ЛУС и у его верхушки. Как на анатомических срезах, так и на гистотопограммах ЛУС отмечены гребенчатые мышцы и тонкие участки стенки между ними, которые соответствуют межтрабекулярным пространствам (рисунок). Участки стенки ЛУС между гребенчатыми мышцами (межтрабекулярные участки) значительно истончены и визуализируются как ямки или щели различной глубины. Кардиомиоциты гребенчатых мышц имеют преимущественно поперечное направление, они разделены на пучки тонкими соединительно-ткаными тяжами, содержащими микрососуды. Одна из особенностей гребенчатых мышц – наличие пространств между эндокардом и миокардом, в которых располагается рыхлая соединительная ткань. В межтрабекулярных участках эндокард плотно сращен с миокардом, и пучки коллагеновых волокон переходят из подэндокардиального слоя в эпикард. По данным J.R. López-Mínguez et al., толщина гребенчатых мышц в 95 % случаев превышает 1 мм [15]. В статье [6] отмечено, что толщина стенки в утолщенных участках ЛУС в 4–5 раз больше, чем в тонких, и составляет 1176,4 мкм (от 882,6 до 1470,0 мкм), в истонченных – 292,0 мкм (219,0; 365,0 мкм). Медиана толщины эндокарда ЛУС, измеренной между гребенчатыми мышцами, равна 75,6 мкм, что составило 25,9 % от толщины стенки в этой локализации. Толщина этой же оболочки в области гребенчатых мышц равна 119,6 мкм (10,2 % от толщины всей стенки) [6, 7], что полностью согласуется с результатами настоящей работы.



Стенка левого ушка сердца на макромикрoанатомическом срезе (а) и на гистотопoграмме (б). 1 – эндокард; 2 – миокард; 3 – эпикард; 4 – соединительно-тканый тяж  
The wall of the left atrium appendage. Macromicroanatomic section (a), histotopogram (б). 1 – endocardium; 2 – myocardium; 3 – epicardium; 4 – band of the connective tissue

Толщина стенки ЛУС и его оболочек при разных вариантах формы ЛУС

Wall thickness of the LAA and its shells in different variants of the LAA shape

Классификация	Вариант формы (количество препаратов)	Оболочка стенки, мм			Стенка в целом, мм
		Эндокард	Миокард	Эпикард с подэпикардиальной клетчаткой	
По количеству долей	Однодолевое (n = 5)	0,23 [0,14; 0,25]	0,93 [0,57; 1,17]	0,22 [0,20; 0,42]	1,27 [1,16; 1,96]
	Двухдолевое (n = 23)	0,20 [0,14; 0,25]	1,23 [0,80; 1,73]	0,85 [0,41; 1,03] *	2,09 [1,41; 2,95] *
	Трехдолевое (n = 2) #	0,43	2,15	1,73	4,32
По форме	«Куриное крыло» (n = 13)	0,19 [0,15; 0,24]	1,07 [0,87; 1,38]	0,62 [0,34; 0,88]	1,97 [1,35; 2,55]
	«Цветная капуста» (n = 13)	0,24 [0,20; 0,37]	1,25 [0,80; 2,00]	0,65 [0,41; 0,94]	2,09 [1,69; 3,05]
	«Наконечник стрелы» (n = 4) #	0,13	1,04	0,35	1,47
Объединенная группа (n = 30)		0,21 [0,09; 0,49]	1,2 [0,23; 3,50]	0,6 [0,09; 3,17]	1,93 [0,94; 6,39]

\* Отличие от величины соответствующего показателя однодолевых ЛУС статистически значимо при  $p < 0,05$ ; # – ввиду крайне малого количества наблюдений в этой подгруппе значения представлены только в виде медианы.

Как следует из таблицы, однодолевые ушки по сравнению с двухдолевыми имели более тонкую стенку и менее выраженную подэпикардиальную клетчатку. В среднем 56 % от толщины всей стенки ЛУС составлял миокард, доля эпикарда и подэпикардиальной клетчатки равна 32,5 %, доля эндокарда – 11,5 %. В отличие от стенки ЛУС, в перешейке ЛУС основную часть стенки (в среднем 70 %) составляли подэпикардиальная жировая клетчатка и эпикард, доля миокарда и эндокарда – 26 и 4 % соответственно. При сравнении значений толщины оболочек стенки ЛУС и перешейка ЛУС установлено, что все оболочки стенки ЛУС значительно тоньше ( $p < 0,001$ ), чем аналогичные оболочки в его перешейке.

**Макромикроскопическая анатомия стенки перешейка ЛУС**

Медиана толщины стенки ЛП в области перешейка ЛУС составляла 9,96 мм и варьировала от 3,6 до 16,2 мм, для толщины эпикарда с подэпикардиальной клетчаткой соответствующие величины равнялись 7,7 мм (от 1,2 до 14,9 мм), толщины миокарда – 2,0 мм (от 0,5 до 6,3 мм), толщины эндокарда в области перешейка ЛУС – 0,3 мм (от 0,1 от 0,5 мм). Внутренняя поверхность перешейка ЛУС макроскопически была гладкой. На гистотопограммах в этой области были отмечены как поперечные, так и продольные цепочки кардиомиоцитов. Миокард этой зоны ЛП примерно

на 1 мм перекрывал створки левого предсердно-желудочкового клапана. Между основанием створок и миокардом ЛП залегала рыхлая соединительная ткань, известная как «фиброзно-жировая ткань линии митрального прикрепления (hinge)» [17]. В направлении от устья ЛУС к левому фиброзному кольцу перешеек ЛУС истончался [16]. По нашим данным, уменьшение толщины миокарда макроскопически здесь сложно выявить из-за большого количества подэпикардиальной жировой ткани, тем более что стенка перешейка ЛУС снаружи прикрыта левой венечной артерией. Поэтому толстый, на первый взгляд, перешеек ЛУС может таить в себе риски для кардиохирурга: опасность перфорации стенки ЛП при радиочастотной абляции и риск прорезывания швов в этой зоне при операциях на митральном клапане.

**Взаимосвязи между макро- и микроскопическими характеристиками ЛУС и его перешейка**

Корреляционные связи между внешними размерами ЛУС и значениями толщины его оболочек не обнаружены, за исключением обратной корреляции между длиной ЛУС и толщиной эндокарда ( $R_s = - 0,45$ ;  $p = 0,01$ ). Отрицательная корреляция отмечена между длиной ЛУС и толщиной миокарда в перешейке ЛУС ( $R_s = - 0,4$ ;  $p = 0,04$ ), а также между шириной ЛУС и толщиной эндокарда ( $R_s = - 0,4$ ;  $p = 0,04$ ). В тех слу-

чаях, когда ЛУС имело форму «куриного крыла», толщина перешейка ушка и толщина эпикарда с подэпикардальной клетчаткой в области перешейка были значительно больше ( $p < 0,05$ ), чем аналогичные параметры на препаратах, где ЛУС имело форму «цветной капусты». Толщина эндокарда и миокарда в этих группах не различалась. В настоящей работе мы не определяли зависимость морфометрических параметров ЛУС от пола и возраста умерших – такой анализ проведен другими исследователями. Изучив 500 анатомических препаратов сердца людей всех возрастных групп, J.P. Veinot et al. не нашли какой-либо значимой зависимости длины ушек и количества их долей от пола и возраста [3]. M. Korhonen et al. выполнили мультипланарную реконструкцию по компьютерным томограммам и пришли к такому же заключению. Они установили, что ЛУС у мужчин длиннее, чем у женщин, и имеют большее количество долей, но при пересчете на площадь поверхности тела ЛУС оказались длиннее у женщин. Также эти авторы доказали отсутствие связей между возрастом пациентов, длиной и вариантами формы ушек [11].

### Заключение

Проанализированы взаимосвязи между макроскопическими характеристиками ЛУС (размерами, формой, количеством долей) и параметрами толщины стенок ЛУС и его перешейка. Прямые корреляционные связи между внешними размерами ЛУС и значениями толщины его оболочек не обнаружены. Выявлена обратная зависимость между толщиной миокарда, эндокарда и некоторыми размерами ЛУС, однако мы не считаем эти различия клинически значимыми. Толщина стенок ЛУС в форме «куриного крыла», «цветной капусты» и «наконечника стрелы» одинакова, но стенка однодолевых ЛУС по сравнению с двухдолевыми оказалась более тонкой. Стенка перешейка ЛУС была тоньше на препаратах с ЛУС в форме «цветной капусты» по сравнению с сердцами, у которых ЛУС имело форму «куриного крыла». Различия толщины стенок у ЛУС разной формы обусловлены разной степенью развития подэпикардальной жировой клетчатки. Клиническое значение выявленных особенностей состоит в том, что у пациентов с однодолевыми ЛУС и ЛУС в форме «цветной капусты» риск перфорации стенок ЛУС и стенки ЛПП в области перешейка при прочих равных условиях максимален, следовательно, при внутривидеоскопических вмешательствах на указанной зоне у таких пациентов следует соблюдать максимальную осторожность.

### Список литературы / References

1. Гапонов А.А., Якимов А.А. Варианты формы левого ушка сердца: сравнение классификаций. *Современные проблемы морфологии: сб. тез. докл. конф., посвящ. памяти академика РАН Л.Л. Колесникова*, Москва, 10 декабря 2020. М.: Научная книга, 2020. С. 50–52.
2. Gaponov A.A., Iakimov A.A. Shape variations of the left atrial appendage: comparison of classifications. *Modern problems of morphology: coll. thes. rep. conf., dedicated to the memory of Academician L.L. Kolesnikov*, Moscow, December 10, 2020. Moscow: Nauchnaya kniga, 2020. P. 50–52. [In Russian].
3. Овчаренко Т.А., Круговихин Д.А., Старчик Д.А. Особенности строения левого ушка при различных формах сердца у женщин пожилого возраста. *Ж. анатомии и гистопатологии*. 2018;7(2):58–62. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-2-58-62
4. Ovcharenko T.A., Krugovikhin D.A., Starchik D.A. Features of the left auricle with various heart shape among aged women. *Zhurnal anatomii i gistopatologii = Journal of Anatomy and Histopathology*. 2018;7(2):58–62. [In Russian]. doi: 10.18499/2225-7357-2018-7-2-58-62
5. Veinot J.P., Harrity P.J., Gentile F., Khandheria B.K., Bailey K.R., Eickholt J.T., Seward J.B., Tajik A.J., Edwards W.D. Anatomy of the normal left atrial appendage: A quantitative study of age-related changes in 500 autopsy hearts: Implications for echocardiographic examination. *Circulation*. 1997;96(9):3112–3115. doi: 10.1161/01.CIR.96.9.3112
6. Wang Y., di Biase L., Horton R.P., Nguyen T., Morhanty P., Natale A. Left atrial appendage studied by computed tomography to help planning for appendage closure device placement. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2010;21(9):973–982. doi: 10.1111/j.1540-8167.2010.01814.x
7. Słodowska K., Szczepanek E., Dudkiewicz D., Hołda J., Bolechała F., Strona M., Lis M., Batko J., Koziej M., Hołda M.K. Morphology of the left atrial appendage: Introduction of a new simplified shape-based classification system. *Heart Lung Circ.* 2021;30(7):1014–1022. doi: 10.1016/j.hlc.2020.12.006
8. Бородина Г.Н., Лебединский В.Ю., Высокый Ю.А. Морфологические основы гемодинамики в ушках сердца. *Мед. и образ. в Сибири*. 2014;(2):39–44.
9. Borodina G.N., Lebedinsky V.Yu., Vysotsky Yu.A. Morphological bases of haemodynamics in atrial auricles. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri = Medicine and Education in Siberia*. 2014;(2):39–44. [In Russian].
10. Чаплыгина Е.В., Каплунова О.А., Евтушенко А.В., Каракозова Е.А., Маркевич А.В., Швырев А.А., Санькова И.В. Прикладные аспекты анатомического строения левого предсердия

сердца человека. *Соврем. пробл. науки и образ.* 2015;(5):146–155.

Chaplygina E.V., Kaplunova O.A., Evtushenko A.V., Karakozova E.A., Markevich A.V., Shvyrev A.A., San'kova I.V. Applied aspects of the anatomical structure of the human's heart left atrium. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education.* 2015;(5):146–155. [In Russian].

8. Hořda M.K., Hořda J., Strona M., Koziej M., Klimek-Piotrowska W. Blood vessels and myocardial thickness within the left atrial appendage isthmus line. *Clin. Anat.* 2018;31(7):1024–1030. doi: 10.1002/ca.23242

9. Stepanchuk A.P., Royko N.V., Fylenko B.M., Pryshlyak A.M. Morphofunctional purpose of human atrial auricles. *World of medicine and biology.* 2018;14(3):185–189. doi: 10.26724/2079-8334-2018-3-65-185-189

10. Adukauskaite A., Barbieri F., Senoner T., Plank F., Beyer C., Knoflach M., Boehme C., Hintzinger F., Mueller S., Cartes-Zumelzu F., Dichtl W., Feuchtnner G. Left atrial appendage morphology is associated with cryptogenic stroke: A CTA study. *JACC: Cardiovasc. imaging.* 2019;12(10):2079–2081. doi: 10.1016/j.jcmg.2019.04.015

11. Korhonen M., Parkkonen J., Hedman M., Muuronen A., Onatsu J., Mustonen P., Vanninen R., Taina M. Morphological features of the left atrial appendage in consecutive coronary computed tomography angiography patients with and without atrial fibrillation. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173703. doi: 10.1371/journal.pone.0173703

12. Suwa Y., Miyasaka Y., Taniguchi N., Hara-da S., Nakai E., Shiojima I. Atrial fibrillation and stroke: importance of left atrium as assessed by echocardiography. *J. Echocardiogr.* 2022;20(2):69–76. doi: 10.1007/s12574-021-00561-6

13. Patti G., Pengo V., Marcucci R., Cirillo P., Renda G., Santilli F., Calabrò P., de Caterina A.R., Cavallari I., Ricottini E., ... Working Group of Thrombosis of the Italian Society of Cardiology. The left atrial appendage: From embryology to prevention of thromboembolism. *Eur. Heart. J.* 2017;38(12):877–887. doi: 10.1093/eurheartj/ehw159

14. Khalil F., Arora S., Killu A.M., Tripathi B., DeSimone C.V., Egbe A., Noseworthy P., Kapa S., Mulpuru S., Gersh B., ... Deshmukh A.J. Utilization and procedural adverse outcomes associated with Watchman device implantation. *Europace.* 2021;23(2):247–253. doi: 10.1093/europace/eaab219

15. López-Mínguez J.R., González-Fernández R., Fernández-Vegas C., Millán-Núñez V., Fuentes-Cañamero M.E., Nogales-Asensio J.M., Doncel-Vecino J., Elduayen-Gragera J., Ho S.Y., Sánchez-Quintana D. Anatomical classification of left atrial appendages in specimens applicable to CT imaging techniques for implantation of Amplatzer cardiac plug. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2014;25(9):976–984. doi: 10.1111/jce.12429

16. Dudkiewicz D., Słodowska K., Jasińska K.A., Dobrzynski H., Hořda, M.K. The clinical anatomy of the left atrial structures used as landmarks in ablation of arrhythmogenic substrates and cardiac invasive procedures. *Translational Research in Anatomy.* 2021;23:100102. doi: 10.1016/j.tria.2020.100102

17. Ho S.Y., Cabrera J.A., Sanchez-Quintana D. Left atrial anatomy revisited. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 2012;5(1):220–228. doi:10.1161/CIRCEP.111.962720

18. Whiteman S., Saker E., Courant V., Salandy S., Gielecki J., Zurada A., Loukas M. An anatomical review of the left atrium. *Translational Research in Anatomy.* 2019;17:100052. doi: 10.1016/j.tria.2019.100052

#### Сведения об авторах:

Антон Александрович Гапонов, ORCID: 0000-0002-6681-7537, e-mail: gagaponov@gmail.com

Евгения Германовна Дмитриева, ORCID: 0000-0002-2973-3481, e-mail: anmayak@mail.ru

Ярослав Сергеевич Малов, e-mail: javissdokh@gmail.com

Андрей Аркадьевич Якимов, к.м.н., ORCID: 0000-0001-8267-2895, e-mail: ayakimov07@mail.ru

#### Information about the authors:

Anton A. Gaponov, ORCID: 0000-0002-6681-7537, e-mail: gagaponov@gmail.com

Evgenia G. Dmitrieva, ORCID: 0000-0002-2973-3481, e-mail: anmayak@mail.ru

Yaroslav S. Malov, e-mail: javissdokh@gmail.com

Andrei A. Iakimov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-8267-2895, e-mail: ayakimov07@mail.ru

Поступила в редакцию 23.10.2022

После доработки 29.11.2022

Принята к публикации 18.01.2022

Received 23.10.2022

Revision received 29.11.2022

Accepted 18.01.2022

## Панкреотоксический эффект вируса гриппа А/Н1N1-Калифорния у мышей на фоне гипергликемии, вызванной введением стрептозотоцина

О.П. Молодых, Н.А. Пальчикова, В.Г. Селятицкая, А.В. Глущенко, О.Г. Курская

ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины  
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

### Резюме

Особое внимание в изучении коморбидных состояний уделяется вирусным заболеваниям, в частности, вызванных вирусом пандемического гриппа типа А субтипа Н1N1, как одним из самых патогенных и контагиозных. Изучение влияния этого вируса при развитии сахарного диабета позволит с большей эффективностью осуществлять доклинические исследования по поиску наиболее эффективных методов лечения вирусной инфекции на фоне предрасполагающей соматической патологии. Цель настоящей работы – оценить панкреотоксический эффект воздействия вируса гриппа А/Н1N1-Калифорния при развитии стрептозотоцинового диабета у мышей линий DBA/2 и BALB/c. **Материал и методы.** Формировали группы мышей DBA/2 ( $n = 36$ ) и BALB/c ( $n = 58$ ): инфицированных вирусом гриппа А/Н1N1-Калифорния (в разных дозах); с введением раствора стрептозотоцина в дозе 150 мг/кг; при сочетанном применении агентов. Оценивали продолжительность жизни, содержание в крови глюкозы и инсулина, патоморфологические изменения поджелудочной железы (ПЖ). **Результаты и их обсуждение.** Гибель животных наблюдали только у мышей линии DBA/2: при введении стрептозотоцина – 12,5 %, при интраназальном заражении вирусом (в дозе 5,7 lg TCID<sub>50</sub>) – 80 %, при сочетанном воздействии – 78 %. Сравнительное исследование мышей линий DBA/2 и BALB/c показало возможность использования мышей обеих линий для изучения сочетанного воздействия вируса гриппа А/Н1N1 и экспериментального диабета с учетом дозы инфицирования. Заражение мышей BALB/c вирусом гриппа А/Н1N1-Калифорния обусловило формирование морфологических изменений только в экзокринной части ПЖ. У мышей обеих линий после введения стрептозотоцина сформировалась стойкая гипергликемия, а патоморфологические изменения ПЖ регистрировались преимущественно в эндокринной части. Аналогичные изменения ПЖ, но более тяжелые, с вовлечением экзокринной зоны, были найдены при последующем инфицировании: у мышей линии DBA/2 – в виде очагового нарушения ацинарного строения с дегенерацией ациноцитов и компенсаторной регенераторной реакцией клеток в неповрежденных участках, у мышей линии BALB/c – в виде более значительного, чем у DBA/2, повреждения протоковой системы с формированием мощных перидуктального фиброза и мононуклеарных инфильтратов. **Заключение.** Сравнительное исследование показало, что у мышей DBA/2 наблюдались более выраженные изменения как экзокринного, так и эндокринного аппарата ПЖ при инфицировании вирусом гриппа А/Н1N1-Калифорния и моделировании сахарного диабета.

**Ключевые слова:** экспериментальный диабет, стрептозотоцин, вирус гриппа А/Н1N1-Калифорния, поджелудочная железа, глюкоза, инсулин, морфология, морфометрия.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарности.** Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России по Государственному заданию.

**Автор для переписки:** Молодых О.П., e-mail: opmolodykh@frcftm.ru

**Для цитирования:** Молодых О.П., Пальчикова Н.А., Селятицкая В.Г., Глущенко А.В., Курская О.Г. Панкреотоксический эффект вируса гриппа А/Н1N1-Калифорния у мышей на фоне гипергликемии, вызванной введением стрептозотоцина. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(1):47–58. doi: 10.18699/SSMJ20230105

# Pancreatic toxicity of influenza A/H1N1-California virus infection in mice at the background of hyperglycemia induced by streptozotocin administration

O.P. Molodykh, N.A. Palchikova, V.G. Selyatitskaya, A.V. Glushchenko, O.G. Kurskaya

Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine  
630117, Novosibirsk, Timakova str., 2

## Abstract

Particular attention in the study of comorbid conditions is paid to viral diseases, in particular, those caused by the pandemic influenza virus type A subtype H1N1, as one of the most pathogenic and contagious. Investigation of the effect of this virus in the development of diabetes mellitus will make it possible to more effectively carry out preclinical studies to find the most effective methods of treating a viral infection against the background of a pre-existing somatic pathology. Purpose of the study was to evaluate the pancreatic toxicity effect of exposure to influenza A/H1N1-California virus in the development of streptozotocin diabetes in DBA/2 and BALB/c mice. **Material and methods.** Groups of mice DBA/2 ( $n = 36$ ) and BALB/c ( $n = 58$ ) were formed: infected with influenza A/H1N1-California virus (at different doses); with the introduction of a solution of streptozotocin at a dose of 150 mg / kg; with the combined use of agents. Life expectancy, blood glucose and insulin level, pathomorphological changes in the pancreas were assessed. **Results and discussion.** The death of animals was observed only in mice of the DBA/2 line: with the introduction of streptozotocin – 12.5 %, with intranasal infection with the virus (at a dose of 5.7 lg TCID<sub>50</sub>) – 80 %, with combined exposure – 78 %. A comparative study of mice of the DBA/2 and BALB/c lines showed the possibility of using mice of both lines to study the combined effect of influenza A/H1N1 virus and experimental diabetes, taking into account the dose of infection. Infection of BALB/c mice caused the formation of morphological changes only in the exocrine part of the pancreas. In mice of both lines, after the administration of streptozotocin, persistent hyperglycemia was formed, and pathomorphological changes in the pancreas were recorded mainly in the endocrine part. Similar changes in the pancreas, but more severe, involving the exocrine zone, were found during subsequent infection: in mice of the DBA/2 line in the form of a focal disorder of the acinar structure with degeneration of acinocytes and a compensatory regenerative reaction of cells in intact areas; in mice of the BALB/c line in the form of more significant damage to the ductal system than in DBA/2 with the formation of powerful periductal fibrosis and mononuclear infiltrates. **Conclusions.** A comparative study showed that DBA/2 mice had more pronounced changes in both the exocrine and endocrine apparatus of the pancreas when infected with influenza A/H1N1-California virus and experimental diabetes mellitus.

**Key words:** experimental diabetes, streptozotocin, influenza A/H1N1-California virus, pancreas, glucose, insulin, morphology, morphometry.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** The work was performed using the equipment of the Center for Collective Use «Proteomic Analysis», supported by funding from the Ministry of Education and Science of the Russian Federation under the State Assignment.

**Correspondence author:** Molodykh O.P., e-mail: opmolodykh@frcftm.ru

**Citation:** Molodykh O.P., Palchikova N.A., Selyatitskaya V.G., Glushchenko A.V., Kurskaya O.G. Pancreatic toxicity of influenza A/H1N1-California virus infection in mice at the background of hyperglycemia induced by streptozotocin administration. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(1):47–58. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230105

## Введение

Проблема коморбидных заболеваний смешанного этиопатогенеза особенно обострилась в связи с эпидемией COVID-19, когда было установлено, что сахарный диабет (СД) является фактором риска развития тяжелой пневмонии и септического течения этой инфекции, развития полиорганной недостаточности и повышения риска ос-

ложнений и смерти [1]. Имеются клинические и экспериментальные данные о взаимоухудшающем влиянии вирусных инфекций и СД на состояние организма. Так, острые респираторные вирусные инфекции усугубляют артериальную эндотелиальную дисфункцию у детей с СД 1 типа [2]; у пациентов с инфекционными заболеваниями СД ассоциирован с повышенным риском отдаленного летального исхода [3]; выживаемость мышей при

инфицировании вирусом гриппа Н5N1 на фоне индуцированного стрептозотоцином диабета 1 типа снижена по сравнению с мышами без диабета [4]. Несомненно, что ряд вирусных инфекций может оказывать прямое влияние на морфофункциональную организацию поджелудочной железы (ПЖ): стойкая гипергликемия, повреждение  $\beta$ -клеток островков Лангерганса, уменьшение их численности вдвое обнаружены при различных формах герпетической инфекции человека [5]; у мышей изучен возможный механизм подавления вирусом Коксаки экспрессии гена белка PDX1, критичного для работы  $\beta$ -клеток ПЖ и развития диабета [6].

Особое внимание в исследованиях коморбидных состояний занимает вирус пандемического гриппа типа А субтипа Н1N1 (А/Н1N1) (свиного гриппа) как один из самых распространенных, с выраженной патогенностью и контагиозностью, активно поражающий легкие, печень и сердце. Однако данные о прямом влиянии этого вируса на ПЖ разноплановы. Его антиген выявлен у мышей в клетках органов через 30 сут после инфицирования, что свидетельствовало об успешной репликации и пролонгированной персистенции вируса в организме; в то же время доказательств активной репликации в ПЖ, в частности, у хорьков, интраназально привитых вирусом гриппа Н1N1 1918, не найдено; при ретроспективном анализе (пандемия 2009 г.) выявлено, что повышенный уровень глюкозы в плазме является независимым предиктором тяжести индуцированной Н1N1 пневмонии, а не результатом прямого повреждения  $\beta$ -клеток ПЖ [7–9]. Тем не менее при создании 84 клонов мышинных моноклональных антител против Н1N1 показано, что два клона специфически перекрестно реагировали с  $\alpha$ -клетками панкреатических островков человека [10]; также обнаружено, что линия клеток ПЖ (инсулиномы) мыши может поддерживать репликацию вируса гриппа А/Н1N1/PR8 [11]. Ранее установлено, что штамм Н1N1 А/California/2009 способен инфицировать клетки ПЖ млекопитающих и размножаться в них как *in vitro*, так и *in vivo*, не вызывая функциональных нарушений, характерных для диабета [12], однако другие исследователи выявили прямое патологическое действие этого вируса на ПЖ: коагуляционные инфаркты (ишемические) и выраженные поражения сосудов, приводившие к кровоизлияниям и тромбозам с последующей смертью пациентов [13]. Заражение вирусом А/Н1N1 увеличивало летальность при наличии предрасполагающих вирусных заболеваний, включая диабет [14, 15].

Изучение эффекта вируса гриппа Н1N1 на состояние организма при СД у млекопитающих по-

зволяет с большей эффективностью осуществлять доклинические исследования по поиску наиболее эффективных методов лечения вирусной инфекции на фоне предрасполагающей соматической патологии [16]. Цель настоящей работы – оценка панкреотоксического эффекта воздействия вируса гриппа А/Н1N1-Калифорния при развитии стрептозотоцинового диабета у широко используемых в экспериментах линий мышей DBA/2 и BALB/c, отличающихся как по показателям углеводно-жирового обмена [17], так и по чувствительности к инфекционным агентам [18].

## Материал и методы

Исследование выполнено на половозрелых мышах-самцах линий DBA/2 ( $n = 36$ ) и BALB/c ( $n = 58$ ), полученных из питомника ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к воде. Эксперименты проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

В первом эксперименте мышей DBA/2 делили на 4 группы: животным группы 1 (контроль,  $n = 5$ ) внутрибрюшинно однократно вводили 0,4 мл 0,01 М цитратного буфера; мышей группы 2 (ИНФ,  $n = 5$ ) однократно интраназально инфицировали вирусом гриппа А/Н1N1-Калифорния в дозе 5,7 Ig TCID<sub>50</sub>, в объеме 50 мкл; животным группы 3 (стрептозотоциновый диабет – СтД,  $n = 8$ ) однократно внутрибрюшинно вводили раствор стрептозотоцина (Sigma-Aldrich, США) в 0,4 мл 0,01 М цитратного буфера в дозе 150 мг/кг массы тела после 18-часового голодания; мышей группы 4 (СтД+ИНФ,  $n = 18$ ) инфицировали интраназально вирусом Н1N1-Калифорния аналогично группе 2 через 6 дней после введения стрептозотоцина. Животных групп 1 и 3 выводили из эксперимента декапитацией на 17-е сутки после введения им стрептозотоцина или буферного раствора, групп 2 и 4 – на 13-е сутки после инфицирования.

Во втором эксперименте использовали мышей линии BALB/c. Аналогично первому эксперименту, были сформированы 4 группы. Группу 1 составили контрольные животные ( $n = 11$ ), группу 2 (ИНФ) – мыши, инфицированные вирусом Н1N1-Калифорния ( $n = 11$ ) в дозе 4,7 Ig TCID<sub>50</sub> интраназально в объеме 50 мкл; группу 3 (СтД) – мыши со стрептозотоциновым диабетом ( $n = 18$ ); группу 4 (СтД+ИНФ) – мыши с сочетанием стрептозотоцинового диабета и вирусной инфекции ( $n = 18$ ). Мышей групп 1 и 3 выводили

из эксперимента декапитацией на 7-, 13-, 20- и 27-е сутки после введения им стрептозотоцина или буфера, групп 2 и 4 – на 13-е и 20-е сутки после инфицирования.

Оценивали продолжительность жизни животных, измеряли в крови, взятой из хвоста, содержание глюкозы с помощью глюкометра One Touch Select Simple (Johnson & Johnson, США), в сыворотке крови – содержание инсулина с использованием набора реагентов для иммуноферментного анализа Rat/Mouse insulin ELISA KIT (Millipore, Германия).

Для светооптического исследования образцы ПЖ обрабатывали по стандартной методике для получения парафиновых срезов. Полученные препараты окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали с помощью микроскопа Axio-Imager A1 (Carl Zeiss, Германия), документировали с использованием фотокамеры AxioCam MRc и компьютерной программы AxioVision (rel. 4.8) (Carl Zeiss, Германия). Морфометрический анализ образцов ПЖ проводили для разрешения камеры 2584×1936 pixel при увеличении 400 и 1000 раз с помощью компьютерной программы для обработки цифровых изображений ImageJ: измеряли максимальный и минимальный диаметр, площадь ацинусов, площадь ациноцита, в том числе ядра, в не менее чем 10 цифровых снимках случайно выбранных полей зрения; среднюю площадь островков Лангерганса (ОЛ), концентрацию эндокриноцитов в ОЛ (ед./100 мкм<sup>2</sup>), среднюю площадь ядер эндокриноцитов для всех ОЛ на срезах.

Для множественных сравнений применяли критерий Краскела – Уоллиса, при парных

сравнениях – критерий Манна – Уитни. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – выборочное среднее,  $m$  – стандартная ошибка. Уровень статистической значимости принимали соответствующим  $p < 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

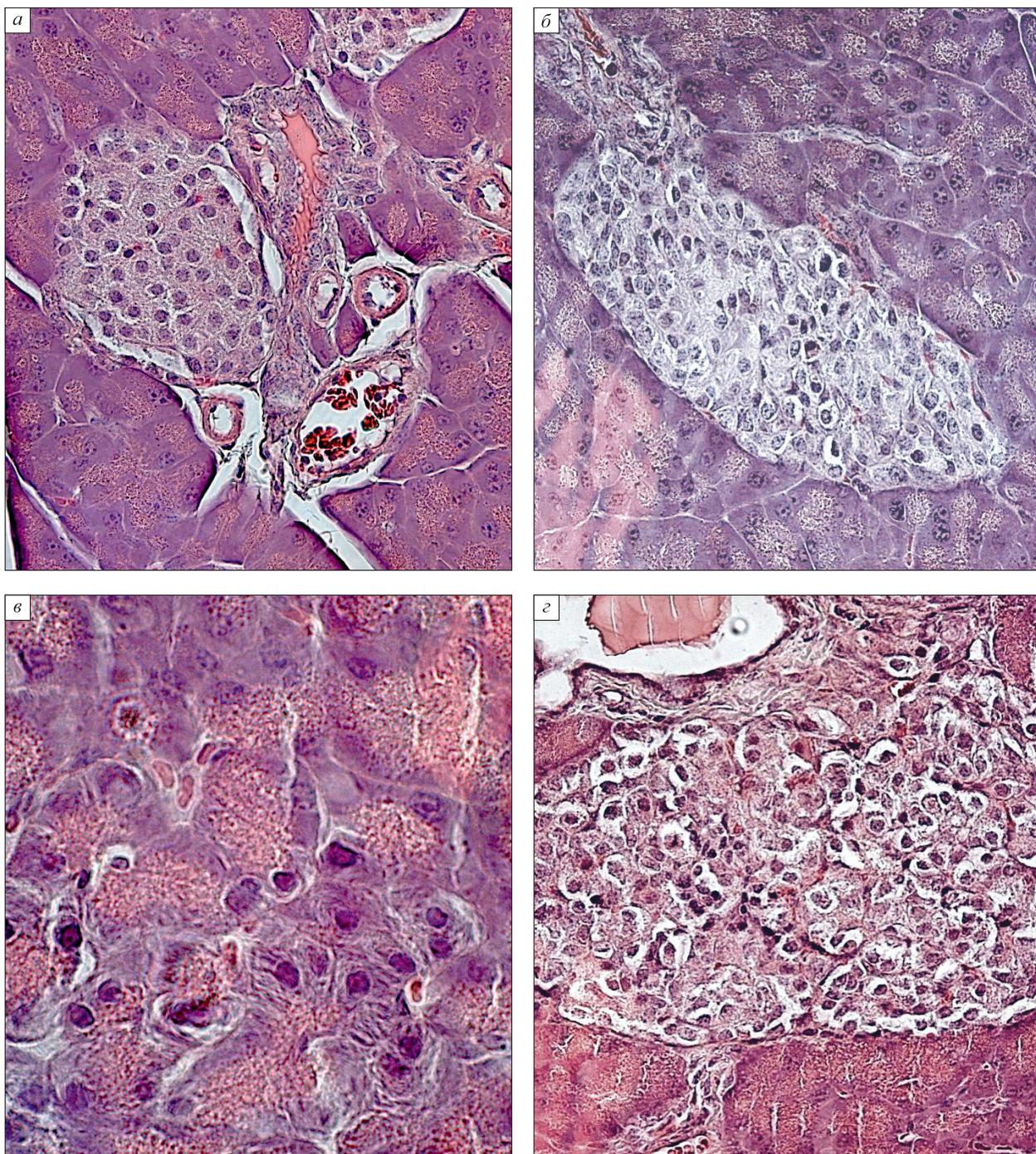
Строение ПЖ мышей DBA/2 контрольной группы (группа 1) соответствовало норме: экзокринная зона имела типичное ацинарное строение; ацинусы были сформированы округлыми клетками с округлыми светлыми ядрами с 1–3 крупными ядрышками, соотношение гомогенной и зернистой частей цитоплазмы составляло 1,7:1 (рис. 1, а; табл. 1). В просвете выводных протоков содержалось оксифильное вещество в незначительном количестве; венозные сосуды и капилляры были умеренно полнокровны. ОЛ были представлены компактными округлыми скоплениями светлых эндокринных клеток с округлыми/овальными ядрами и равномерно окрашенной зернистой цитоплазмой, отделенными от ацинусов тонкой соединительно-тканной прослойкой, визуализировались кровеносные капилляры с единичными эритроцитами; размеры ОЛ варьировали от 3277 до 37610 мкм<sup>2</sup>. Концентрация глюкозы в крови у животных составила  $8,4 \pm 0,3$  ммоль/л.

Инфицирование вирусом гриппа А/Н1N1-Калифорния (группа 2, ИНФ) привело к гибели на 10–12-е сутки 80 % животных (4 из 5). Концентрация глюкозы в крови у выжившей мыши была снижена в 3,5 раза по сравнению с контрольными (2,4 ммоль/л). В ее ПЖ выявлен ряд патоморфологических изменений: умеренная дистрофия

Таблица 1. Структурные изменения ПЖ мышей линии DBA/2 из разных экспериментальных групп

Table 1. Structural changes in the pancreas of DBA/2 mice from different experimental groups

Параметр	Группа 1, контроль	Группа 3, СтД	Группа 4, СтД+ИНФ
		17 сут	19 сут+13 сут
Экзокринная зона			
Диаметр ацинуса, мкм:			
максимальный	47,69 ± 1,17	46,88 ± 2,65	51,22 ± 3,33
минимальный	35,16 ± 1,38	32,18 ± 2,24	29,96 ± 0,69
Площадь ацинуса, мкм <sup>2</sup>	1365,12 ± 117,77	1286,53 ± 134,42	1240,32 ± 17,37
Площадь ациноцита, мкм <sup>2</sup> ,	338,18 ± 72,21	363,76 ± 33,39	272,38 ± 14,13
в том числе площадь ядра	36,18 ± 5,95	29,93 ± 2,06	26,22 ± 0,84
Отношение гомогенной и зимогенной зон ациноцита	1,73 ± 0,54	2,05 ± 0,35	1,93 ± 0,41
ОЛ (эндокринная зона)			
Площадь ОЛ, мкм <sup>2</sup>	9067,56 ± 2413,30	9773,20 ± 2017,84	16042,07 ± 3193,57
Концентрация эндокриноцитов в ОЛ, ед./100 мкм <sup>2</sup>	0,64 ± 0,10	0,78 ± 0,09	0,62 ± 0,08
Площадь ядра эндокриноцита, мкм <sup>2</sup>	27,79 ± 2,81	23,97 ± 2,62	32,43 ± 3,72



**Рис. 1.** Мыши линии DBA/2. ПЖ. Окраска гематоксилином и эозином. а, б, з –  $\times 400$ ; в –  $\times 1000$ .

а – контроль; б – СтД. Дистрофические изменения эндокриноцитов ОЛ – пикноз ядер, опустошенность цитоплазмы; в, з – СтД+ИИФ: в – дегенеративные изменения экзокриноцитов – пикноз ядер, исчезновение гранул, формирование псевдолокнистой структуры цитоплазмы; з – гипертрофированный ОЛ с дегенеративно измененными эндокриноцитами. Выводной проток с плотным эозинофильным секретом в просвете

**Fig. 1.** DBA/2 mice. Pancreas. Stained with hematoxylin and eosin. а, б, з –  $\times 400$ ; в –  $\times 1000$ .

а – control; б – streptozotocin diabetes. Dystrophic changes in endocrinocytes of islets of Langerhans – pyknosis of the nuclei, emptiness of the cytoplasm; в, з – streptozotocin diabetes + infection: в – degenerative changes in exocrinocytes – pyknosis of nuclei, disappearance of granules, formation of a pseudofibrous structure of the cytoplasm; з – hypertrophied islets of Langerhans with degenerative endocrinocytes. Excretory duct with dense eosinophilic secretion in the lumen

экзокриноцитов; атрофия эпителия выводных протоков, накопление плотного эозинофильного содержимого в их просвете; умеренная диффузная мононуклеарная инфильтрация по периферии ОЛ и периваскулярно.

После введения стрептозотоцина мышам DBA/2 (группа 3, СтД) летальность составила 12,5 % (на 9-е сутки погибло одно животное из 8). Через 17 сут после введения стрептозотоцина у выживших мышей концентрация глюкозы в крови увеличилась в 2,3 раза по сравнению с контрольными ( $19,4 \pm 4,1$  ммоль/л,  $p < 0,05$ ). Морфологическое исследование ПЖ показало, что как в экзокринной, так и в эндокринной части регистрировались выраженные изменения: появление зон с нарушением ацинарного строения и обширными дегенеративными повреждениями ациноцитов (пикноз ядер, исчезновение зернистой/гомогенной зон, образование «волокнуистой» перинуклеарной структуры). В зонах с ацинарным строением фиксировались крупные экзокриноциты с гигантскими ядрами и усилением ядрышко-вой активности; умеренная дилатация выводных протоков с образованием плотных оксифильных «пробок» и незначительной атрофией эпителия; выраженные дегенеративные изменения (опустошение и деградация цитоплазмы, пикноз ядер) клеток ОЛ (рис. 1, б). Максимальный размер ОЛ ( $21759$  мкм<sup>2</sup>) был в 1,7 раза меньше, чем в контроле, хотя средний размер достоверно не отличался (см. табл. 1).

Летальность животных в группе 4 (СтД+ИНФ) составила 78 % – на 8–12-е сутки после инфицирования погибло 14 животных из 18; из них с уровнем глюкозы 8–10 ммоль/л – 8 особей, 20–30 ммоль/л – 6 особей. Содержание глюкозы в крови выживших мышей было в 1,8 раза больше, чем в контроле ( $15,0 \pm 2,4$  ммоль/л,  $p < 0,05$ ). При морфологическом исследовании ПЖ мышей группы 4 обнаружены аналогичные, но более выраженные повреждения, чем в группе 3: в экзокринной зоне – в виде формирования более обширных зон с нарушением ацинарного строения и дегенеративными изменениями экзокриноцитов (пикнозом ядер, исчезновением зернистой/гомогенной зон, формированием «волокнуистой» перинуклеарной структуры) (рис. 1, в); выраженной дилатацией выводных протоков с образованием в просвете крупных плотных эозинофильных «пробок» и значительной атрофией эпителия многих средних и крупных протоков; выраженным полнокровием капиллярного и венозного звена, часто со стазом и сладжем эритроцитов, обилием лимфоцитов в просвете сосудов. Регистрировалась интенсивная гипертрофия ОЛ – их средняя площадь была увеличена по сравнению с контролем и введени-

ем стрептозотоцина на 77 и 64 % соответственно; максимальный размер ОЛ был наибольшим из всех групп и составил  $45330$  мкм<sup>2</sup>, что на 20 и 108 % больше, чем в контроле и группе 3 соответственно. Дегенеративные изменения в ОЛ были более выраженными по сравнению с группой 3: клетки с пикнозом ядер и опустошенностью цитоплазмы наблюдались массово (рис. 1, з), часто в сопровождении с умеренной диффузной мононуклеарной инфильтрацией стромы.

Морфологическое исследование ПЖ мышей BALB/c контрольной группы показало соответствие экзокринной и эндокринной частей структуры норме, соотношение гомогенной и зернистой частей цитоплазмы ациноцитов составило 2,76:1; размеры ОЛ в среднем были в 1,5 раза больше, чем у животных линии DBA/2 (см. табл. 1, табл. 2), максимальный размер равнялся  $53277$  мкм<sup>2</sup>.

Гибели мышей BALB/c в группе 2 (ИНФ) отмечено не было. При морфологическом исследовании ПЖ выявлены выраженный полиморфизм ядер ациноцитов с появлением крупных форм с активным ядрышковым аппаратом (рис. 2, а), дилатация крупных протоков с атрофией их эпителия и накопление в просвете гомогенной оксифильной массы (рис. 2, б), формирование выраженного перидуктального фиброза, умеренная дилатация вен. Характерной особенностью, по сравнению с контрольными животными, было присутствие многочисленных мелких базофильных включений в эпителии выводных протоков. ОЛ, как и в контроле, были представлены в основном округлыми, сходных с контролем размеров (до  $54583$  мкм<sup>2</sup>) скоплениями клеток.

В группе 3 (СтД) выжили все мыши BALB/c, сформировалась стойкая гипергликемия. Максимальные по сравнению с контролем увеличение концентрации глюкозы в крови в 4,3 раза и снижение содержания инсулина в сыворотке крови в 4,7 раза отмечены на 13-е сутки после введения диабетогенного агента (табл. 3). Ацинарное строение ПЖ сохранено, но с начала эксперимента стали выявляться небольшие участки экзокриноцитов с пикнотичными ядрами; к 27-м суткам нарушения нарастали – формировались выраженная дилатация выводных протоков с атрофическими изменениями эпителия и скоплениями в просвете протоков плотного оксифильного продукта; значительное полнокровие капиллярного и венозного русла с увеличением числа лимфоцитов в крови, иногда с формированием тромботических масс. Начиная с 7-х суток формировался выраженный перидуктальный фиброз крупных выводных протоков (рис. 2, в). ОЛ были сформированы в основном клетками с умеренными

Таблица 2. Структурные изменения ПЖ мышей линии BALB/c из разных экспериментальных групп

Table 2. Structural changes in the pancreas of BALB/c mice from different experimental groups

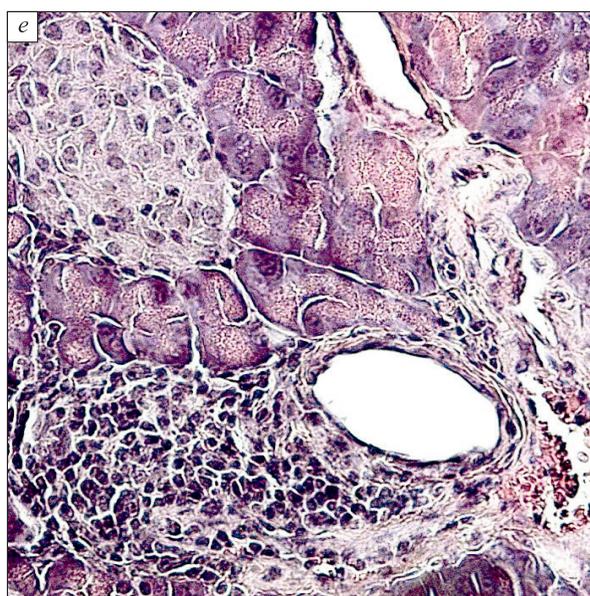
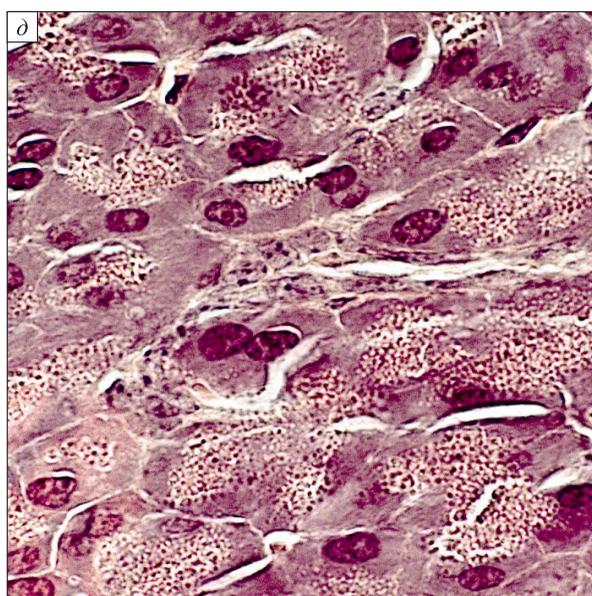
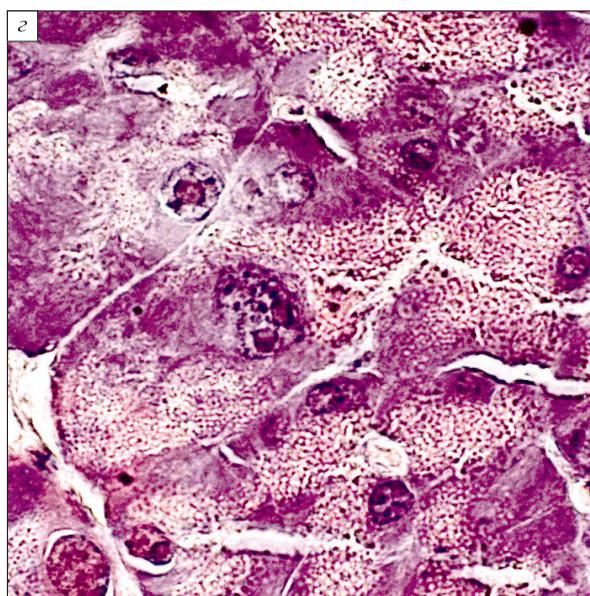
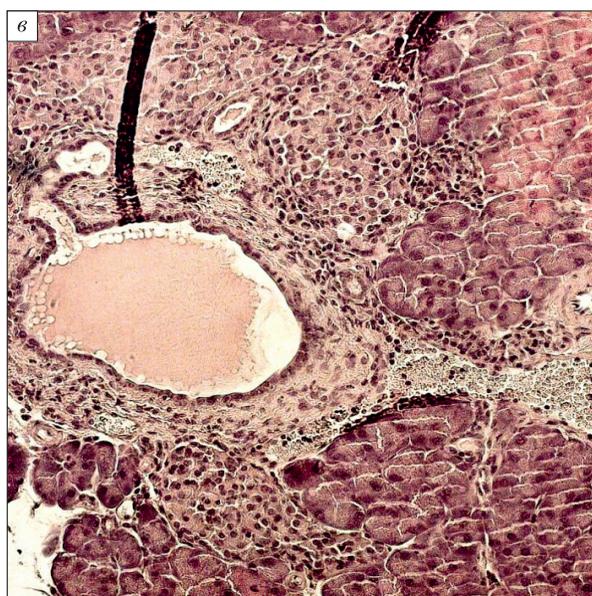
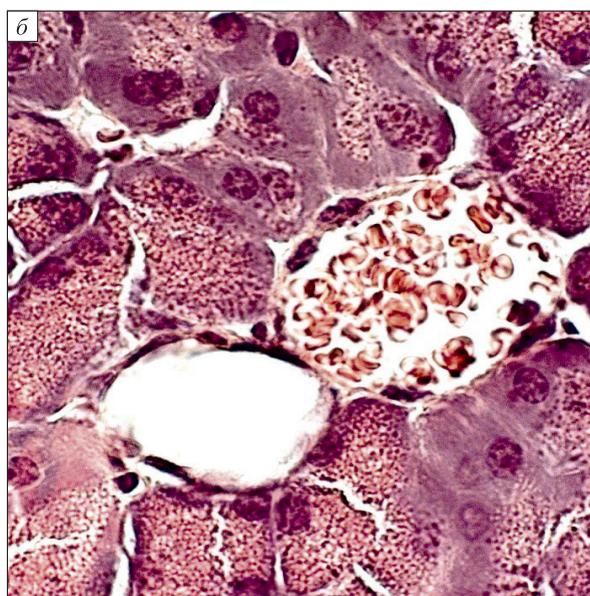
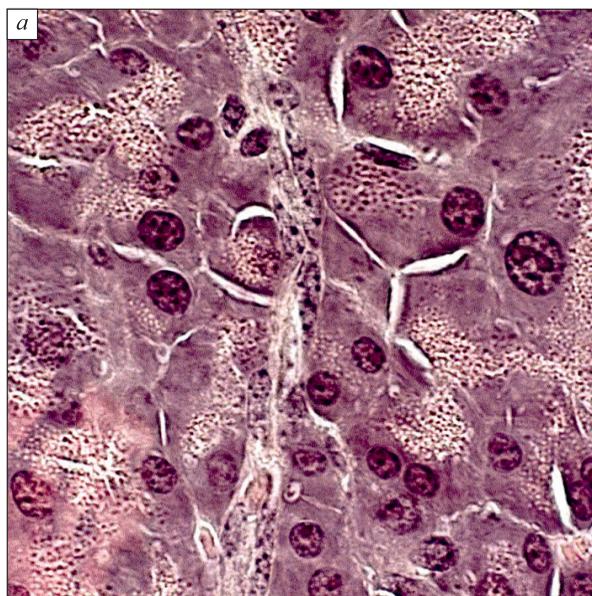
Параметр	Группа 1, контроль	Группа 2, ИНФ	Группа 3, СтД			Группа 4, СтД+ИНФ
		13 сут	7 сут	20 сут	27 сут	21 сут + 13 сут
Экзокринная зона						
Диаметр ацинуса, мкм:						
максимальный	61,33 ± 0,22	54,79 ± 2,40	48,93 ± 2,98	54,17 ± 1,85	63,62 ± 2,31	59,94 ± 3,31
минимальный	38,21 ± 2,00	39,75 ± 2,86	36,60 ± 1,75	37,73 ± 1,48	41,12 ± 4,18	39,76 ± 2,56
Площадь ацинуса, мкм <sup>2</sup>	1870,1 ± 87,2	1774,4 ± 159,7	1300,9 ± 157,0	1664,3 ± 92,0	2259,9 ± 307,8	1938,1 ± 168,0
Площадь ациноцита, мкм <sup>2</sup>	312,73 ± 57,18	303,23 ± 8,52	262,71 ± 2,13	280,3 ± 2,97	365,10 ± 25,84	291,05 ± 41,21
в том числе площадь ядра	30,83 ± 2,11	34,14 ± 1,80	36,63 ± 6,16	26,35 ± 2,38	39,89 ± 5,31	32,17 ± 3,03
Отношение гомогенной и зимогенной зон ациноцита	2,76 ± 0,91	1,79 ± 0,11	2,08 ± 0,21	2,09 ± 0,23	1,88 ± 0,43	2,61 ± 0,89
ОЛ (эндокринная зона)						
Площадь ОЛ, мкм <sup>2</sup>	13889,8 ± 1297,5	12229,1 ± 4027,9	8273,7 ± 1358,6	7277,3 ± 2416,2	12564,5 ± 3447,8	13489,2 ± 2167,6
Концентрация эндокриноцитов в ОЛ, ед./100 мкм <sup>2</sup>	0,82 ± 0,03	0,61 ± 0,11	0,82 ± 0,04	0,94 ± 0,12	0,83 ± 0,04	0,92 ± 0,05
Площадь ядра эндокриноцита, мкм <sup>2</sup>	27,37 ± 1,14	28,53 ± 1,31	26,24 ± 0,73	26,35 ± 1,13	29,19 ± 0,99	28,18 ± 1,07

дегенеративными изменениями, варьировали по форме и размерам, максимальный размер был на 13 % меньше, чем в контроле (46105 мкм<sup>2</sup>). Средняя площадь ОЛ на 7-е и 20-е сутки была значительно снижена по сравнению с контролем (на 40 и 48 % соответственно).

Гибели мышей BALB/c в группе 4 (СтД+ИНФ) не было, уровень глюкозы в крови через 28 суток после введения стрептозотоцина был в 2 раза выше, чем у контрольных животных (см. табл. 2). При морфологическом исследовании ПЖ мышей из группы 4 по сравнению с животными из групп 2 и 3 обнаружен более выраженный полиморфизм ядер экзокриноцитов вплоть до появления гигантских ядерных структур (рис. 2, *г*) с множественными базофильными включениями, которые регистрировались и в эпителии выводных протоков (как при инфицировании) (рис. 2, *д*). Только в этой группе у некоторых особей выявлены не только дилатация, но и кистозные изменения крупных протоков, часто с атрофией эпителия, с накоплением в просвете некоторых протоков зернистого эозинофильного субстрата, формированием мощного перидуктального фиброза и обширных мононуклеарных перидуктальных инфильтратов (рис. 2, *е*). В просвете дилатированных кровеносных сосудов увеличива-

лось содержание сегментоядерных нейтрофилов. ОЛ были представлены более разнообразными, чем в группах 2 и 3, по форме и размерам скоплениями клеток, часто узкими и протяженными, с умеренными дегенеративными изменениями и обильной лимфоцитарной инфильтрацией в основном по периферии ОЛ; максимальный и средний размер ОЛ не отличался от контроля и группы 2 (до 53277 мкм<sup>2</sup>).

Таким образом, установлено, что доза вируса, использованная в первом эксперименте для инфицирования мышей DBA/2, вызвала высокую летальность среди животных, поэтому она была снижена при заражении мышей линии BALB/c. Данные литературы о поражении ПЖ мышей при инфицировании вирусами гриппа неоднозначны: так, интраназальное введение вируса Н1N1 самкам мышей BALB/c хотя и приводило к потере более 20 % массы тела через 5 дней и снижению концентрации глюкозы в крови более чем в 2 раза, но не сопровождалось повреждениями ПЖ [19], в другой же работе отмечены повреждения ПЖ у мышей BALB/c после инфицирования их тремя подтипами вируса гриппа [20]. В наших экспериментах у мышей BALB/c после инфицирования изменений в эндокринной зоне не выявлялось, а в экзокринной части регистрировалось усиление



**Рис. 2.** Мыши линии BALB/c. ПЖ. Окраска гематоксилином и эозином.

а, б – ИНФ: а – выраженный полиморфизм ядер экзокриноцитов, множественные базофильные включения в эпителии протоков; б – дилатация протока, атрофия эпителия, дилатация вены,  $\times 1000$ .

в – СтД, 27 сут. Перидуктуальный фиброз, дилатация выводного протока, массивные скопления клеток, формирующих неоформленный ОЛ,  $\times 200$ .

г, д, е – СтД+ИНФ: г – формирование гигантских ядер в экзокриноцитах,  $\times 1000$ ; д – множественные включения в эпителии выводных протоков,  $\times 1000$ ; е – массивные перидуктуальные инфильтраты. Дилатация протока,  $\times 200$

**Fig. 2.** BALB/c mice. Pancreas. Stained with hematoxylin and eosin.

а, б – infected mice: а – pronounced polymorphism of exocrinocyte nuclei; multiple basophilic inclusions in the epithelium of the ducts; б – dilatation of the duct, atrophy of the epithelium, dilatation of the vein,  $\times 1000$ .

в – streptozotocin diabetes, 27 days. Periductual fibrosis, dilatation of the excretory duct; massive accumulations of cells forming an unformed OL,  $\times 200$ .

г, д, е – streptozotocin diabetes + infection: г – formation of giant nuclei in exocrinocytes,  $\times 1000$ ; д – multiple inclusions in the epithelium of the excretory ducts,  $\times 1000$ ; е – massive periductal infiltrates. Duct dilatation,  $\times 200$

белоксинтезирующей функции некоторых ациноцитов (гипертрофия ядер, ядрышек), нарушение системы выводных протоков (дилатация крупных протоков с атрофией их эпителия, накопление в просвете гомогенной оксифильной массы, формирование выраженного перидуктуального фиброза), обилие мелких базофильных включений в эпителии выводных протоков как характерная особенность этой группы.

Введение стрептозотоцина вызвало 12,5%-ю летальность особей линии DBA/2, гибели мышей BALB/c не было. У обеих линий сформировалась стойкая гипергликемия: у выживших мышей DBA/2 концентрация глюкозы в крови увеличилась в 2,3 раза, у BALB/c – в 4,3 раза по сравнению с контролем. Динамика показателей уровня глюкозы в крови и инсулина в сыворотке крови мышей BALB/c свидетельствует о том, что через 7 дней после введения стрептозотоцина у животных сформировалась стойкая гипергликемия: содержание глюкозы увеличилось в 1,5 раза, а концентрация инсулина снизилась в 1,5 раза по сравнению с контролем.

Стрептозотоцин – цитотоксический аналог глюкозы, обладающий избирательной токсич-

ностью для  $\beta$ -клеток ПЖ. Обладая высоким сродством к  $\beta$ -клеткам ПЖ, он накапливается и вызывает их необратимые некрозы, что, в свою очередь, приводит к снижению синтеза и секреции инсулина, и у лабораторных животных развивается сахарный диабет [21]. Действительно, концентрация глюкозы в крови у мышей обеих линий после введения стрептозотоцина оставалась высокой до конца экспериментов. Морфологическое исследование показало, что как в экзокринной, так и в эндокринной части ПЖ у мышей обеих линий регистрировались выраженные изменения по сравнению с контролем, однако были очевидные различия: у мышей DBA/2 – очаговое нарушение ацинарного строения с выявлением в этих зонах массивных скоплений дегенеративно измененных ациноцитов с псевдоволокнистой цитоплазмой; в зонах с нормальным ацинарным строением – компенсаторная гипертрофия ядер экзокриноцитов и усилением ядрышковой активности; у мышей BALB/c ацинарное строение ПЖ сохранено полностью, но выявлены небольшие участки экзокриноцитов с пикнотичными ядрами. У мышей BALB/c также выявлены более серьезные нарушения протоковой системы в

**Таблица 3.** Содержание глюкозы в крови и инсулина в сыворотке крови мышей линии BALB/c из разных экспериментальных групп

**Table 3.** Blood glucose and insulin levels in blood serum of BALB/c mice from different experimental groups

Показатель	Группа 1, контроль	Группа 2, ИНФ		Группа 3, СтД				Группа 4, СтД+ИНФ	
		13 сут	20 сут	7 сут	13 сут	20 сут	27 сут	21 сут + 13 сут	28 сут + 20 сут
Содержание глюкозы, ммоль/л	7,6 $\pm$ 0,6	8,3 $\pm$ 0,5	8,4 $\pm$ 0,4	11,7 $\pm$ 1,5*	33,0 $\pm$ 0,01*	15,2 $\pm$ 2,5*	21,9 $\pm$ 3,9*	13,1 $\pm$ 2,6	15,3 $\pm$ 2,8*
Содержание инсулина, нг/мл	4,35 $\pm$ 1,32	1,57 $\pm$ 0,35	3,01 $\pm$ 0,64	2,77 $\pm$ 0,51	0,64 $\pm$ 0,34*	3,89 $\pm$ 0,75	3,56 $\pm$ 0,90	3,44 $\pm$ 0,92	3,12 $\pm$ 1,03

\* Отличие от величины соответствующего показателя группы контроля статистически значимо при  $p < 0,05$ .

виде выраженной дилатации выводных протоков с атрофическими изменениями эпителия и скоплениями в просвете протоков плотного оксифильного продукта; значительное полнокровие капиллярного и венозного русла с увеличением числа лимфоцитов в крови, иногда с формированием тромботических масс; выраженный перидуктальный фиброз крупных выводных протоков. Повреждения ОЛ наблюдались у мышей обеих линий: выраженные дегенеративные изменения эндокриноцитов, снижение максимального размера ОЛ (более значительно у DBA/2).

Сочетанное воздействие стрептозотоцина с последующим инфицированием обусловило высокую летальность особей DBA/2 (78 %, с уровнем глюкозы от 8 до 30 ммоль/л), гибели мышей BALB/c не было. У обеих линий формировалась стойкая гипергликемия: содержание глюкозы в крови мышей BALB/c и выживших мышей DBA/2 было сходно повышено (в 1,8–2 раза по сравнению с контролем). Меньшая выживаемость, более тяжелые патологические повреждения ПЖ, чем у мышей без предсуществующего диабета, показаны ранее на модели сочетанного воздействия стрептозотоцина с последующим инфицированием вирусом гриппа А [20]. В нашем исследовании у мышей DBA/2 выявлены более тяжелые повреждения по сравнению с изолированным введением стрептозотоцина: в экзокринной зоне – формирование более обширных зон с нарушением ацинарного строения и дегенеративными изменениями эндокриноцитов, повреждениями протоковой системы, выраженным полнокровием капиллярного и венозного звена. Строение ПЖ у мышей BALB/c, как и у особей с только изолированным стрептозотоцином, было сохранено, однако наблюдалась более выраженная активация ядерного и ядрышкового аппарата ряда эндокриноцитов с появлением гигантских клеток с множественными базофильными включениями, которые регистрировались и в эпителии выводных протоков (как при инфицировании); прогрессирование повреждения протоковой системы в виде дилатации, кистозных изменений, формирования мощного перидуктального фиброза и обширных мононуклеарных перидуктальных инфильтратов. Повреждения ОЛ были более значительными у мышей линии DBA/2 – выраженная гипертрофия ОЛ при множественных дегенеративных изменениях эндокриноцитов.

## Заключение

Сравнительное исследование мышей линий DBA/2 и BALB/c показало возможность использования животных обеих линий для изучения со-

четанного воздействия вируса гриппа А/H1N1 и экспериментального диабета с учетом дозы инфицирования.

Инфицирование мышей линии BALB/c вирусом гриппа А/H1N1 в меньшей дозе, чем животных линии DBA/2, позволило избежать их гибели и обусловило формирование морфологических изменений только в экзокринной части ПЖ (усиление синтетической активности в виде гипертрофии ядер и ядрышек отдельных ациноцитов), нарушений в протоковой системе в виде дилатации и перидуктального фиброза. У мышей обеих линий после введения стрептозотоцина формировалась стойкая гипергликемия, но у BALB/c не было летальности. При введении стрептозотоцина у мышей обеих линий патоморфологические изменения ПЖ формировались преимущественно в эндокринной части в виде значительных повреждений клеток ОЛ. Аналогичные изменения, но более тяжелые, с вовлечением экзокринной зоны, были найдены при последующем инфицировании. В экзокринной части ПЖ особенностью мышей линии DBA/2 являлось очаговое нарушение ацинарного строения с дегенерацией ациноцитов и компенсаторным усилением белоксинтетической активности в неповрежденных участках экзокринной зоны; мышей линии BALB/c – более значительное, чем у DBA/2, повреждение протоковой системы с формированием мощных перидуктальных фиброза и мононуклеарных инфильтратов.

## Список литературы / References

1. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 16. М.: Минобрнауки России, 2022. 249 с. Режим доступа: [https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/060/193/original/BMP\\_COVID-19\\_V16.pdf](https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/060/193/original/BMP_COVID-19_V16.pdf)
2. Temporary guidelines. Prevention, diagnosis and treatment of novel coronavirus infection (COVID-19). Version 16. Moscow: Ministry of Education and Science of Russia, 2022. 249 p. [In Russian]. Available at: [https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/060/193/original/BMP\\_COVID-19\\_V16.pdf](https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/060/193/original/BMP_COVID-19_V16.pdf)
3. Aburawi E., Liuba P., Pesonen E., Ylä-Herttua S., Sjöblad S. Acute respiratory viral infections aggravate arterial endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(11):2733–2735. doi: 10.2337/diacare.27.11.2733
4. Akirov A., Diker-Cohen T., Masri-Iraqi H., Duskin-Bitan H., Shimon I., Gorshtein A. Outcomes of hyperglycemia in patients with and without diabetes hospitalized for infectious diseases. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2018;34(7):e3027. doi: 10.1002/dmrr.3027

4. Wu J., Zhang F., Fang F., Chang H., Wang F., Yang Z., Sun B., Chen Z. Efficacy of inactivated vaccine against H5N1 influenza virus infection in mice with type 1 diabetes. *Vaccine*. 2010;28:2775–2781. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.01.037
5. Зубрицкий М.Г., Недзведь М.К. Морфологические изменения в поджелудочной железе при герпетической инфекции. *Здравоохранение (Минск)*. 2014;(2):15–20.
- Zubritsky M.G., Nedzved M.K. Morphological changes in the pancreas in herpetic infection. *Zdravooohranenie (Minsk) = Healthcare (Minsk)*. 2014;(2):15–20. [In Russian].
6. Bernard H., Teijeiro A., Chaves-Pérez A., Perna C., Satish B., Novials A., Wang J.P., Djouder N. Cocksackievirus B type 4 infection in  $\beta$  cells downregulates the chaperone prefoldin URI to induce a MODY4-like diabetes via Pdx1 silencing. *Cell Rep. Med*. 2020;1(7):100125. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100125
7. Potapova O.V., Kovner A.V., Anikina A.G., Cherdantseva L.A., Sharkova T.V., Shkurupy V.A., Vasil'eva E.V., Shestopalov A.M. Studies of Influenza A/H1N1 A/Tomsk/13/2010 Virus Topology during Development of Infectious Process in Mammals. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2016;160:683–686. doi: 10.1007/s10517-016-3249-x
8. Wang W., Chen H., Li Q., Qiu B., Wang J., Sun X., Xiang Y., Zhang J. Fasting plasma glucose is an independent predictor for severity of H1N1 pneumonia. *BMC Infect. Dis*. 2011;11:104. doi: 10.1186/1471-2334-11-104
9. de Wit E., Siegers J.Y., Cronin J.M., Weatherman S., van den Brand J.M., Leijten L.M., van Run P., Begeman L., van den Ham H.J., Andeweg A.C., ... van Riel D. 1918 H1N1 influenza virus replicates and induces proinflammatory cytokine responses in extrarespiratory tissues of ferrets. *J. Infect. Dis*. 2018;217(8):1237–1246. doi: 10.1093/infdis/jiy003
10. Qi Z., Hu H., Wang Z., Wang G., Li Y., Zhao X., Feng Y., Huo X., Sun J., Feng Q., ... Hu J. Antibodies against H1N1 influenza virus cross-react with  $\alpha$ -cells of pancreatic islets. *J Diabetes Investig*. 2018;9(2):265–269. doi: 10.1111/jdi.12690
11. Sadeghi K., Salimi V., Rezaei F., Jalilian F.A., Ghavami N., Azad T.M. Potential of H1N1 influenza A virus as an air borne pathogen to induce infectivity in pancreas: a mouse model study. *J. Environ. Health Sci. Eng*. 2020;18(1):303–310. doi: 10.1007/s40201-020-00468-x
12. Capua I., Mercalli A., Romero-Tejeda A., Pizzuto M.S., Kasloff S., Sordi V., Marzinotto I., Lampaona V., Vicenzi E., de Battisti C., ... Piemonti L. Study of 2009 H1N1 pandemic influenza virus as a possible causative agent of diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2018;103(12):4343–4356. doi: 10.1210/je.2018-00862
13. Calore E.E., Uip D.E., Perez N.M. Pathology of the swine-origin influenza A (H1N1) flu. *Pathol. Res. Pract*. 2011;207(2):86–90. doi: 10.1016/j.prp.2010.11.003
14. Малышев Н.А., Базарова М.В., Кареткина Г.Н., Кардонова Е.В., Келли Е.И., Пашенин М.А. Особенности пандемического гриппа А (H1N1) PDM09. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2013;2(3):12–18.
- Malyshev N.A., Bazarova M.V., Karetkina G.N., Kardonova E.V., Kelly E.I., Pashenin M.A. Features of pandemic influenza A (H1N1) PDM09. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye = Infectious Diseases: News, Opinion, Education*. 2013;2(3):12–18. [In Russian].
15. Аникина А.Г., Потапова О.В., Ковнер А.В., Черданцева Л.А., Шаркова Т.В., Шкурупий В.А., Иванов Г.Я. Иммуноморфологические особенности постинфекционного пневмофиброза у человека при гриппе А/Н1N1. *Фундам. исслед*. 2014;(10-1):18–23.
- Anikina A.G., Potapova O.V., Kovner A.V., Cherdantseva L.A., Sharkova T.V., Shkurupiy V.A., Ivanov G.Ya. Immunomorphological features of postinfectious pulmonary fibrosis in humans infected with influenza A/H1N1 virus. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*. 2014;(10-1):18–23. [In Russian].
16. Гуцин Я.И., Шедько В.В., Мужикян А.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Сравнительная морфология поджелудочной железы экспериментальных животных и человека. *Лаб. живот. для науч. исслед*. 2018;(3):33–48. doi: 10.29296/2618723X-2018-03-04
- Gushchin Ya.I., Shedko V.V., Muzhikyan A.A., Makarova M.N., Makarov V.G. Comparative morphology of the pancreas of experimental animals and humans. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy = Laboratory Animals for Science*. 2018;(3):33–48. [In Russian]. doi:10.29296/2618723X-2018-03-04
17. Ковшик Г.Г., Храпова М.В., Душкин М.И. Метаболические особенности мышей инбредных линий: поиск предрасположенности к метаболическому синдрому. *Вестн. НГУ. Сер. Биол., клин. мед*. 2012;10(1):27–32.
- Kovshik G.G., Khrapova M.V., Dushkin M.I. Metabolic phenotypes of inbred mouse strains: searching for metabolic syndrome susceptibility. *Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya, klinicheskaya meditsina = Journal of the Novosibirsk State University. Series: Biology, Clinical Medicine*. 2012;10(1):27–32. [In Russian].
18. Каркищенко В.Н., Брайцева Е.В. Новые биомодели для оценки высоковирулентных штаммов чумы *Yersinia pestis*. *Биомедицина*. 2005;1(1):67–75.
- Karkishchenko V.N., Braitseva E.V. New biomodels for the evaluation of highly virulent *Yersinia pestis* plague strains. *Biomeditsina = Biomedicine*. 2005;1(1):67–75. [In Russian].

19. Xiang L., Hu X., Zhang J., She J., Li M., Zhou T. Immunodepression induced by influenza A virus (H1N1) in lymphoid organs functions as a pathogenic mechanism. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2020; 47(10):1664–1673. doi: 10.1111/1440-1681.13358
20. Huo C., Zhang S., Zhang S., Wang M., Qi P., Xiao J., Hu Y., Dong H. Mice with type 1 diabetes exhibit increased susceptibility to influenza A virus. *Microb. Pathog.* 2017;113:233–241. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.026
21. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat. *Physiol. Res.* 2001;50(6):537–546.

#### **Сведения об авторах:**

**Ольга Павловна Молодых**, д.б.н., проф., ORCID: 0000-0002-1001-3310, e-mail: opmolodykh@frcftm.ru  
**Наталья Александровна Пальчикова**, д.б.н., e-mail: labend@centercem.ru  
**Вера Георгиевна Селятицкая**, д.б.н., проф., ORCID: 0000-0003-4534-7289, e-mail: ccem@centercem.ru  
**Александра Владимировна Глушенко**, e-mail: rimmaaltai2017@gmail.com  
**Ольга Григорьевна Курская**, к.м.н., ORCID: 0000-0002-1931-2026, e-mail: kurskaya\_og@mail.ru

#### **Information about the authors:**

**Olga P. Molodykh**, doctor of biological sciences, professor, ORCID: 0000-0002-1001-3310, e-mail: opmolodykh@frcftm.ru  
**Natalya A. Palchikova**, doctor of biological sciences, e-mail: labend@centercem.ru  
**Vera G. Selyatitskaya**, doctor of biological sciences, professor, ORCID: 0000-0003-4534-7289, e-mail: ccem@centercem.ru  
**Alexandra V. Glushchenko**, e-mail: rimmaaltai2017@gmail.com  
**Olga G. Kurskaya**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-1931-2026, e-mail: kurskaya\_og@mail.ru

*Поступила в редакцию 24.11.2022*  
*Принята к публикации 11.01.2023*

*Received 24.11.2022*  
*Accepted 11.01.2023*

## Влияние иммобилизованных ферментов гиалуронидазы и субтилизина на ультраструктуру эпителиоцитов конъюнктивы человека

В.Е. Забанова<sup>1</sup>, А.Ж. Фурсова<sup>1,2</sup>, Н.А. Бондаренко<sup>3</sup>, Н.П. Бгатова<sup>3</sup>, А.В. Затеев<sup>1,3</sup>, П.Г. Мадонов<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России  
630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52

<sup>2</sup> ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

<sup>3</sup> НИИ клинической и экспериментальной лимфологии –  
филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН  
630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

### Резюме

Применение ферментных препаратов является традиционным направлением в самых различных областях медицины. Использование иммобилизованной гиалуронидазы (ИГ) и субтилизина (ИС) представляется весьма перспективным для лечения повреждений глазной поверхности. Жидкие формы субтилизина и гиалуронидазы были предварительно иммобилизованы на полиэтиленоксиде импульсным линейным ускорителем ИЛУ-10. **Цель исследования** – установить характер изменений ультраструктурной организации эпителиоцитов конъюнктивы человека при воздействии ИГ и ИС *in vitro*. **Материал и методы.** В эксперименте культуру нормальных клеток конъюнктивы человека Changconjunctiva, клон 1–5 С-4, высевали в 96-луночные планшеты в количестве  $2 \times 10^4$  клеток/лунку, через 24 ч среду удаляли, добавляли среду Игла MEM и с эмбриональной телячьей сывороткой и культивировали еще 48 ч. Сформировано пять экспериментальных групп: группа 1 – без добавления препаратов (кроме состава схемы инкубирования), группы 2 и 3 – с добавлением ИС в концентрации 37 и 150 Ед/мл соответственно, группы 4 и 5 – с добавлением ИГ в концентрации 37 и 150 Ед/мл соответственно. После приготовления препаратов клеток под электронным микроскопом JEM 1400 (Япония) изучены ультратонкие срезы 70–100 нм на увеличении  $\times 1000$ . **Результаты.** В статье приведены результаты электронной микроскопии культуры нормальных клеток конъюнктивы человека в 5 экспериментальных группах клеток с описанием изменений цитоархитектоники под воздействием ИГ и ИС. **Заключение.** Введение иммобилизованных ферментов в культуру клеток конъюнктивы человека в небольшой дозе (37 Ед/мл) оказывает влияние на организацию клеток без цитотоксического воздействия, в то время как повышение дозы прямо коррелирует с возникновением цитотоксического эффекта.

**Ключевые слова:** иммобилизованный субтилизин, иммобилизованная гиалуронидаза, цитоархитектоника.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Затеев А.В., e-mail: zateev1997@mail.ru

**Для цитирования:** Забанова В.Е., Фурсова А.Ж., Бондаренко Н.А., Бгатова Н.П., Затеев А.В., Мадонов П.Г. Влияние иммобилизованных ферментов гиалуронидазы и субтилизина на ультраструктуру эпителиоцитов конъюнктивы человека. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(1):59–70. doi: 10.18699/SSMJ20230106

## Effect of immobilized hyaluronidase and subtilisin enzymes on the ultrastructure of human conjunctival epithelial cells

V.E. Zabanova<sup>1</sup>, A.Zh. Fursova<sup>1,2</sup>, N.A. Bondarenko<sup>3</sup>, N.P. Bgatova<sup>3</sup>, A.V. Zateev<sup>1,3</sup>, P.G. Madonov<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia

630117, Novosibirsk, Krasny ave., 52

<sup>2</sup> Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS

630090, Novosibirsk, Akademika Lavrentyeva ave., 10

<sup>3</sup> Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology –

Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS

630060, Novosibirsk, Timakova str., 2

### Abstract

The use of enzyme preparations is a traditional trend in various fields of medicine. The usage of immobilized enzymes hyaluronidase (IG) and subtilisin (IS) seems to be very promising for the treatment of damage to the ocular surface. **The aim** of the study was to establish the nature of changes in the ultrastructural organization of human conjunctival epithelium under the influence of immobilized hyaluronidase and subtilisin *in vitro*. **Material and methods.** In the experiment, a culture of normal cells of the human conjunctiva Chanqconjunctiva, clone 1–5 C-4, was seeded in 96-well plates in the amount of  $2 \times 10^4$  cells/well, after 24 h the medium was removed, Eagle's medium MEM and fetal calf serum were added and cells were cultured for another 48 h. 5 experimental groups were formed: group 1 – without drugs (except for the composition of the incubation scheme), groups 2 and 3 – with IS at a concentration of 37 and 150 U/ml, respectively, groups 4 and 5 – with IG at a concentration of 37 and 150 U/ml, respectively. After preparation of cell preparations under a JEM 1400 electron microscope (Japan), ultrathin sections of 70–100 nm were studied at  $\times 1000$  magnification. **Results.** The article presents the results of electron microscopy of a culture of normal cells of the human conjunctiva in 5 experimental groups of cells with a description of changes in cytoarchitectonics under the influence of IG and IS. **Conclusions.** The introduction of immobilized enzymes into human conjunctival cell culture at a low dose (37 U/ml) affects the organization of cells without cytotoxic effects, while increasing the dose directly correlates with the occurrence of a cytotoxic effect.

**Key words:** immobilized subtilisin, immobilized hyaluronidase, cytoarchitectonics.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Correspondence author:** Zateev A.V., e-mail: zateev1997@mail.ru

**Citation:** Zabanova V.E., Fursova A.Zh., Bondarenko N.A., Bgatova N.P., Zateev A.V., Madonov P.G. Effect of immobilized hyaluronidase and subtilisin enzymes on the ultrastructure of human conjunctival epithelial cells. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(1):59–70. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230106

### Введение

В настоящее время применение ферментов считается перспективным направлением для лечения воспалительных и дегенеративных заболеваний в различных областях медицины. Лекарственные препараты на их основе способны преобразовывать широкий спектр молекул-мишеней для нормализации метаболизма и имеют ряд преимуществ по сравнению с установленными терапевтическими подходами благодаря их свойствам сродства и специфичности [1]. Фармакологические технологии с применением ферментов благодаря биоразнообразию последних обладают

широким спектром количества и терапевтической эффективности. Хотя ферменты – одни из первых биологических препаратов, используемых в клинической практике, скорость создания новых лекарств на их основе была сравнительно низкой [2]. Разработка безопасных и эффективных методов лечения человека с применением энзимов значительно активизировалась за последние десятилетия благодаря прогрессу в понимании молекулярных механизмов, ответственных за различные заболевания, а также детальному изучению каталитической активности соответствующих экзогенных ферментов. Несколько

биотерапевтических препаратов на их основе одобрены FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) и ЕМА (Европейское агентство по лекарственным средствам), многие проходят клинические испытания. Большинство терапевтических ферментов получают из микроорганизмов – наиболее удобного источника благодаря быстрому, простому и экономичному производству и последующей технологической обработке [1]. В настоящее время взят курс на фармакологическое совершенствование терапевтических ферментов. Они подразделяются на четыре основные группы: для заместительной терапии, для лечения рака, для фибринолиза и для регенеративной медицины. Также разрабатывается ферментная генная терапия [3].

Среди ферментных препаратов широко применяется гиалуронидаза, расщепляющая гиалуроновую кислоту и оказывающая множественное влияние на метаболизм гиалуроновой кислоты; она увеличивает проницаемость сосудов и временно разрушает внеклеточный матрикс, способствуя диффузии веществ через ткани. Наряду с применением в офтальмологии, акушерстве и гинекологии, скелетно-мышечной медицине, радиологии, а также при введении лекарств и жидкостей, гиалуронидаза используется в области пластической хирургии [4]. Показано, что гиалуронидаза способствует заживлению ран и оказывает дозозависимую индукцию синтеза гиалуроновой кислоты в структурных клетках кожи. Значительное усиление репарации наблюдалось даже при низкой концентрации фермента [5]. У человека идентифицировано шесть различных гиалуронидаз: HYAL-1–4, HYAL-P1 и PH-20. PH-20 проявляет наиболее выраженную биологическую активность, обнаруживается в высоких концентрациях в яйцах и может быть локализована на головке и акросоме сперматозоидов человека. Сегодня гиалуронидазы бычьего или овечьего яйца животного происхождения, а также синтетические гиалуронидазы применяются в клинической практике для повышения биодоступности лекарств, для терапии экстравазаций, для лечения осложнений в эстетической хирургии. Расширения области применения фермента в хирургии, эстетической медицине, иммунологии, онкологии и многих других сферах можно ожидать в ближайшие годы [6].

Субтилизины представляют собой микробные экзогенные ферменты, которые производит *Bacillus subtilis*. Их отличительной особенностью является выраженная протеолитическая активность

в отношении денатурированных или полимеризованных белков. На нативные гликозированные белки субтилизины оказывают минимальное гидролитическое действие. В настоящее время субтилизины используются преимущественно как антитромботические и вазопротекторные лекарственные средства [7–13]. В России зарегистрированы две формы лекарственного препарата «Тромбовазим®» (АО «СЦФБ») на основе субтилизинов: инъекционная (в качестве тромболитика для лечения острого инфаркта миокарда) и энтеральная (для лечения тяжелой венозной патологии, включая тромбозы).

Наряду с перспективами высокой клинической эффективности, применение ферментов сопряжено с некоторыми проблемами. Основные из них – это низкая биодоступность, короткий период полувыведения, потенциальный риск патологической реакции иммунной системы пациента на фермент [14]. Совершенствование энзимотерапии идет по пути поиска альтернативных источников ферментов с уменьшенными побочными эффектами и повышенной активностью, а также генетической модификации ферментов и новых систем доставки. Стратегии химической модификации, таргетная и/или опосредованная наночастицей доставка, направленная эволюция и сайт-специфический мутагенез, слитые белки, полученные с помощью генетических манипуляций, являются наиболее изученными инструментами для снижения токсичности и улучшения биодоступности и клеточного нацеливания. В этом отношении весьма успешная технология модификации ферментов – электронно-лучевое пегилирование, благодаря которому они утрачивают агрессивные свойства по отношению к организму человека и приобретают улучшенные фармакокинетические свойства [15].

Энзимотерапия при заболеваниях глаза описана в литературе, однако большого количества исследований и публикаций не наблюдается [16]. Применение иммобилизованных форм гиалуронидазы (ИГ) и субтилизины (ИС) для офтальмологической практики представляются весьма перспективным, поскольку их фармакологическое действие отслеживает многие патогенетические механизмы заболеваний глаза [17–20].

Нами проводятся исследования по изучению возможности применения данных ферментов для лечения повреждения глазной поверхности. Переднюю поверхность глаза составляют конъюнктивы и роговица, а также слезная пленка. Конъюнктивы – это слизистая оболочка, покрывающая переднюю поверхность глазного яблока

и заднюю поверхность век. Гистологически она включает в себя поверхностный и базальный эпителий, аденоидный и волокнистый слои [21]. Аденоидный и волокнистый слой представляют собой собственную субстанцию, которая отделена от базального эпителия базальной мембраной. Средняя толщина здорового бульбарного эпителия конъюнктивы имеет глубину  $42,4 \pm 7,4$  мкм, средняя толщина собственного вещества составляет  $197,7 \pm 32,5$  мкм [22]. В настоящей работе выполнено исследование влияния ИГ и ИС на состояние клеточного аппарата эпителия конъюнктивы для понимания их возможных повреждающих эффектов.

Цель исследования – установить характер изменений ультраструктурной организации эпителиоцитов конъюнктивы человека при воздействии ИГ и ИС *in vitro*.

### Материал и методы

ИС и ИГ представляют собой лиофилизированные порошки светло-желтого и светло-серого цвета с ферментативной активностью 5400 и 2800 ЕД в грамме сухого вещества соответственно, легко растворяющиеся в кристаллоидных и коллоидных растворах (производитель АО «СЦФБ», г. Новосибирск). В экспериментах исследованы по две дозы жидких форм препарата с активностью фермента 37 и 150 ЕД/мл. Иммуобилизация ферментов проведена на полиэтиленоксиде (Макрогол 1500) под пучком ускоренных электронов в дозе 1,5 МРад, создаваемым импульсным линейным ускорителем ИЛУ-10 (Институт ядерной физики имени Г.И. Будкера СО РАН, г. Новосибирск) на площадке ООО «СФМ-Фарм», г. Новосибирск.

В эксперименте использовали перевиваемую культуру нормальных клеток конъюнктивы человека Chanqconjunctiva, клон 1–5 С-4 из коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных (НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи). Клетки культивировали в питательной среде Игла MEM (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, США), 40 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Россия) и 2 мМ L-глутамина (ICN, США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> до образования конфлюэнтного монослоя. Клетки Chanqconjunctiva высевали в 96-луночные планшеты в количестве  $2 \times 10^4$  клеток/луночку, через 24 ч среду удаляли, добавляли среду Игла MEM с 1 % ЭТС и исследуемое вещество, далее культивировали клетки в течение 48 ч. Было сформировано пять эксперимен-

тальных групп: контрольная, в которой к клеткам не добавляли препаратов, не входящих в состав технологической схемы инкубации, две группы – с добавлением ИС в дозе 37 и 150 ЕД/мл и две группы – с добавлением ИГ в дозе 37 и 150 ЕД/мл.

Для исследования в электронном микроскопе клетки фиксировали в 1%-м растворе OsO<sub>4</sub> на фосфатном буфере (рН 7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон (Serva, Германия). Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм на ультратоме Leica UC7/FC7 (Германия/Швейцария), окрашивали толудиновым синим, изучали под световым микроскопом LEICA DME и выбирали клетки для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 70–100 нм, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (Япония) Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Увеличение  $\times 1000$ .

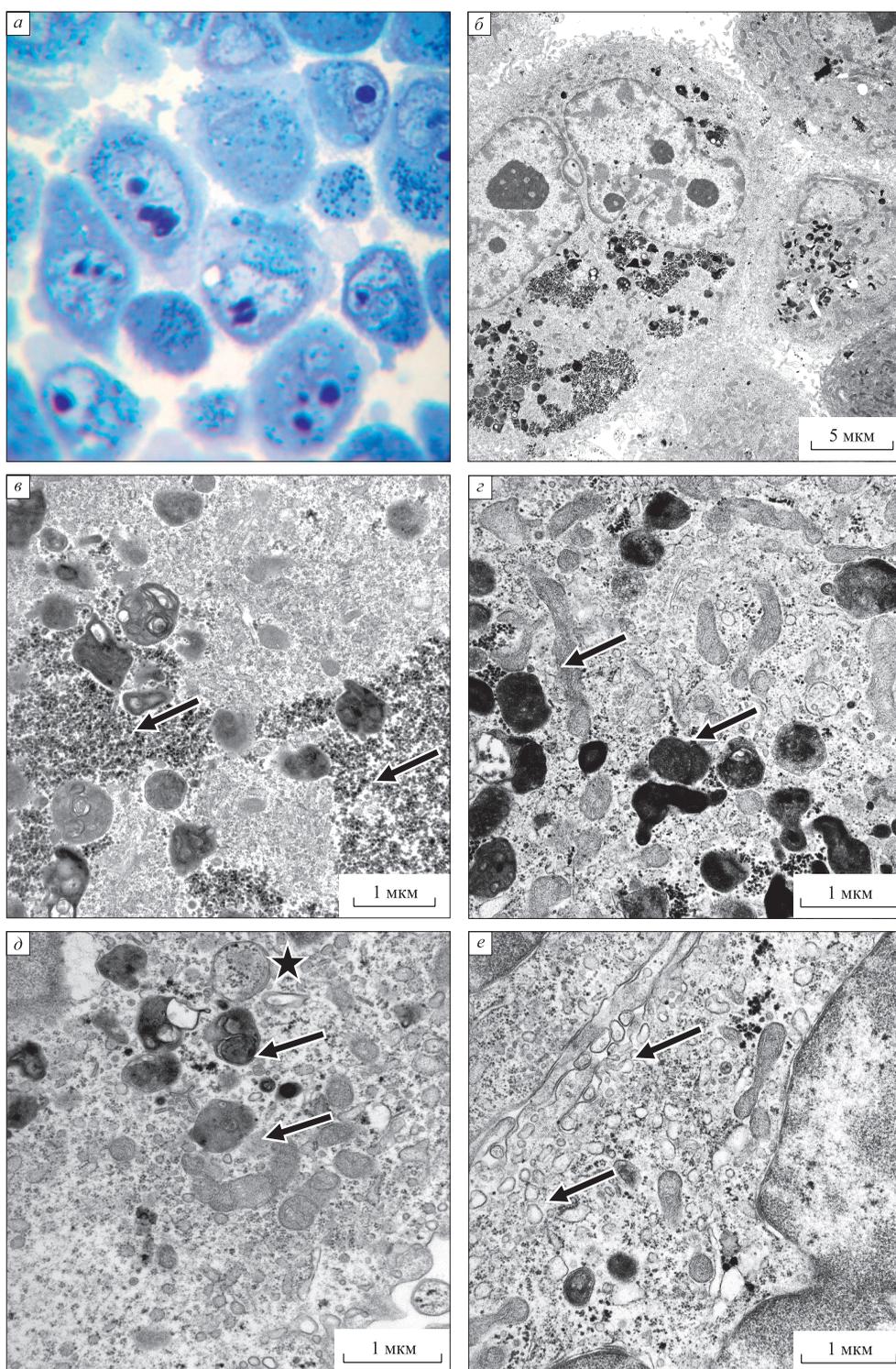
### Результаты

#### *Структура эпителиоцитов конъюнктивы в контрольной группе*

Эпителиоциты конъюнктивы контрольной группы отличались наличием многочисленных микроворсинок и выростов клеточной мембраны (рис. 1, а, б). В цитоплазме клеток наблюдали скопления гликогена (рис. 1, в). В околоядерной зоне клеток отмечали лизосомы, аутолизосомы, редко встречались аутофагосомы (рис. 1, г, д). Митохондрии имели различную форму – округлую, извилистую, удлинённую, и содержались в большом количестве. Отмечали хорошо развитую сеть гранулярного эндоплазматического ретикулаума и большое количество полисомальных комплексов рибосом. В цитоплазме хорошо выявлялись мультивезикулярные тельца и везикулы (рис. 1, е). Эти морфологические признаки являются достаточно характерными для клеток эпителиальных барьеров.

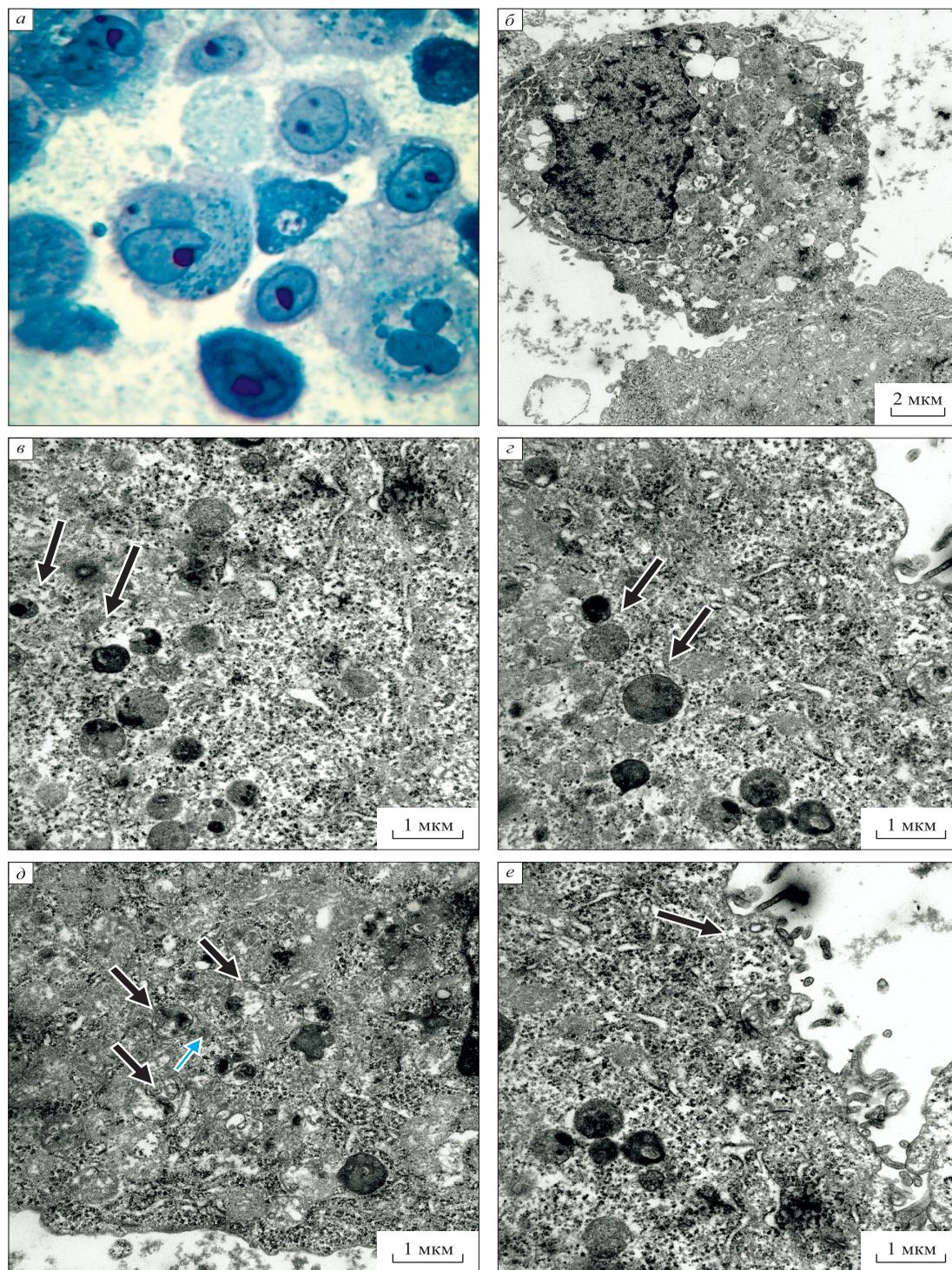
#### *Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИГ в дозе 37 ЕД/мл*

При анализе структуры эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИГ в дозе 37 ЕД/мл выявлено снижение содержания микроворсинок и наличие выростов цитоплазматической мембраны (рис. 2, а, б). Отмечали размытость кон-



**Рис. 1.** Структура эпителиоцитов конъюнктивы в контроле: а – эпителиоциты конъюнктивы; б – ультраструктура эпителиоцитов конъюнктивы; в – скопления гликогена в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы (стрелки); г – лизосомы в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы (стрелки); д – аутофагосома (звездочка) и аутолизосомы (стрелки) в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы; е – многочисленные везикулярные структуры в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы (стрелки)

**Fig. 1.** The structure of conjunctival epithelial cells in the control: а – epithelial cells of the conjunctiva; б – ultrastructure of conjunctival epithelial cells; в – accumulations of glycogen in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells (arrows); г – lysosomes in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells (arrows); д – autophagosome (asterisk) and autolysosomes (arrows) in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells; е – numerous vesicular structures in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells (arrows)



**Рис. 2.** Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИГ в дозе 37 ЕД/мл: а – эпителиоциты конъюнктивы; б – ультраструктура эпителиоцитов конъюнктивы; в – небольшое содержание вторичных лизосом (стрелки); г – первичные лизосомы в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы (стрелки); д – аутолизосомы (стрелки) в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы; е – небольшое содержание везикулярных структур в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы (стрелки)

**Fig. 2.** The structure of conjunctival epithelial cells after the administration of IG at a dose of 37 U/ml: а – epithelial cells of the conjunctiva; б – ultrastructure of conjunctival epitheliocytes; в – a small amount of secondary lysosomes (arrows); г – primary lysosomes in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells (arrows); д – autolysosomes (arrows) in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells; е – a small amount of vesicular structures in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells (arrows)

туров мембран цитоплазматических органелл, расширение цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулаума, уменьшение содержания митохондрий и гликогена. Уменьшалось количество вторичных лизосом с электронно-плотным содержимым и возрастало число электронно-светлых первичных лизосом (рис. 2, в, з). Отмечали различные по размерам аутолизосомы (рис. 2, д). Практически не выявлялись везикулярные структуры около клеточной поверхности (рис. 2, е). Данные изменения можно трактовать как некоторое снижение биохимической активности, направленное, вероятнее всего, на ограничение энергетического бюджета клетки ввиду отсутствия провоспалительных стимулов.

#### ***Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИГ в дозе 150 ЕД/мл***

При анализе структуры эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИГ в дозе 150 ЕД/мл отмечали сглаживание клеточной поверхности, отсутствие микроворсинок и наличие отдельных выростов плазматической мембраны (рис. 3, а, б). В цитоплазме наблюдали уменьшение содержания гликогена и наличие зон деструкции в области локализации лизосом. Встречались крупные аутолизосомы с накоплением гликогена и более мелкие по размерам с неопределяемым содержимым (рис. 3, в, з). Имели место лизосомы с признаками повреждения (рис. 3, д). Отмечали возрастание электронной плотности участков, расположенных вдоль плазматической мембраны, и практически отсутствовали везикулярные структуры (рис. 3, е). ИГ в дозе 150 ЕД/мл не вызывает грубых нарушений цитоархитектоники клеток эпителия конъюнктивы, но при этом очевидно, что с высокой долей вероятности ИГ проникает внутрь цитоплазмы.

#### ***Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИС в дозе 37 ЕД/мл***

При анализе структуры эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИС в дозе 37 ЕД/мл выявлено наличие микроворсинок и выростов клеточной поверхности и значительное накопление лизосомальных структур в цитоплазме клеток (рис. 4, а, б). Цистерны комплекса Гольджи были расширены (рис. 4, в). Среди лизосомальных структур преобладали аутолизосомы, размеры которых значительно различались, наблюдали мелкие, средние и крупные аутолизосомы (рис. 4, г, д). Имели место структурные признаки стресса эндоплазматического ретикулаума – цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулаума

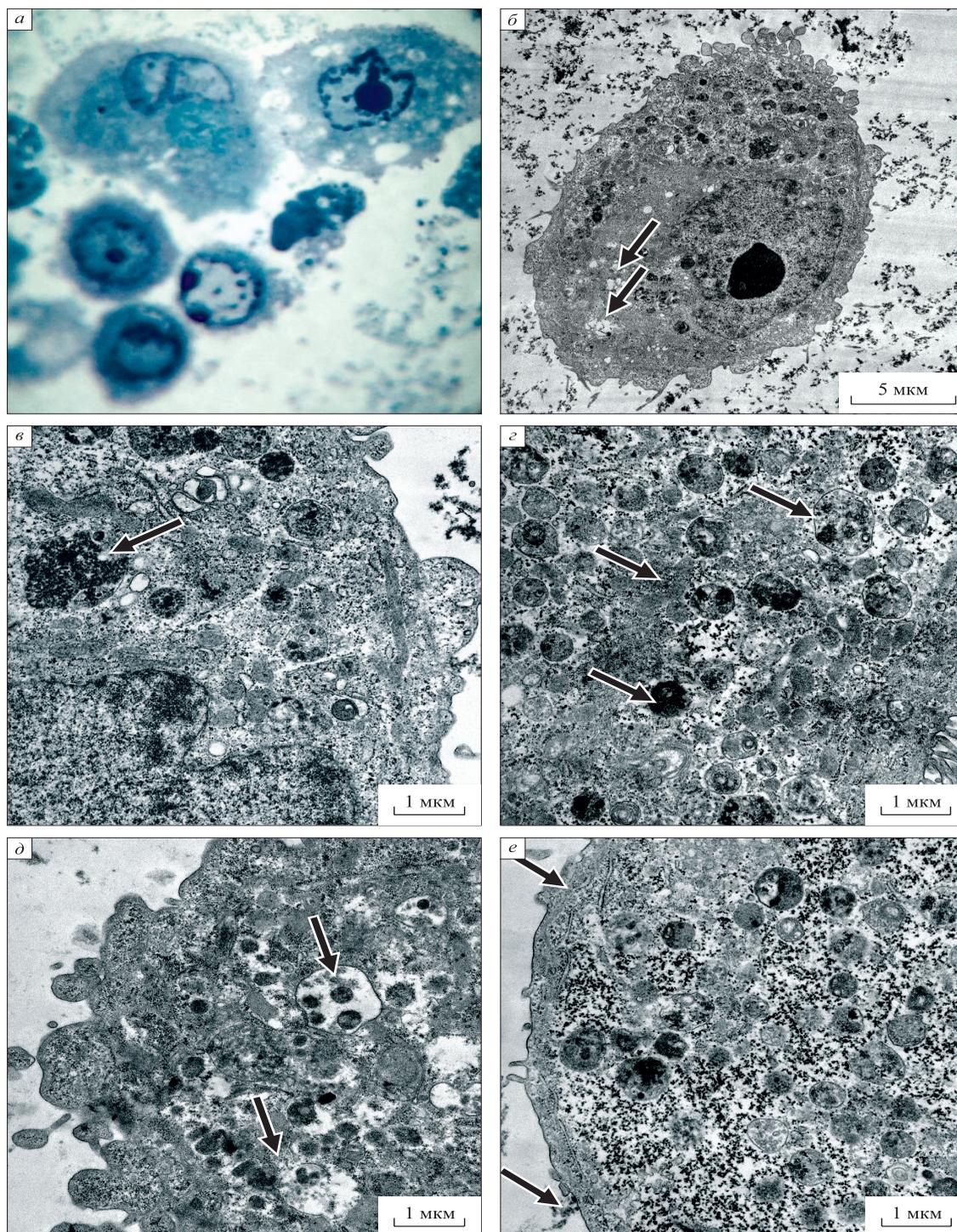
были значительно расширены и в их просветах определялся электронно-плотный материал (рис. 4, е). Принимая во внимание то обстоятельство, что субтилизины обладают не только протеолитическим, но и выраженным противовоспалительным действием, морфологические изменения эпителиоцитов конъюнктивы можно трактовать как увеличение метаболической активности для обеспечения антиинфламаторного потенциала клетки.

#### ***Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИС в дозе 150 ЕД/мл***

При анализе эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИС в дозе 150 ЕД/мл не было отмечено клеток с неповрежденной структурой (рис. 5, а, б). Ядро и органеллы в клетках не визуализировались. Цитоплазма была заполнена аутофагическими структурами (рис. 5, в, з). Отмеченные структурные изменения свидетельствуют о развитии аутофагической гибели эпителиоцитов конъюнктивы после воздействия большой дозы субтилизинов. Подобного рода изменения цитоархитектоники, по нашему убеждению, следует расценивать как цитотоксическое действие, которое обусловлено накоплением высокоактивного протеолитического фермента в цитоплазме клеток. Цитоплазма была заполнена аутофагическими структурами, что является отражением аутофагической гибели клетки. По-видимому, ИС оказывал эффекты на уровне цитоплазмы клеток, вызывая стресс эндоплазматического ретикулаума, нарушение структуры органелл и активацию процессов аутофагии. Воздействие имело дозозависимый эффект и способствовало запуску процессов непрекращающегося аутофагического потока, приводящего клетки к аутофагической гибели. Данные изменения также можно расценивать, как подтверждение факта облегченного пиноцитоза иммобилизованного субтилизина внутрь клетки.

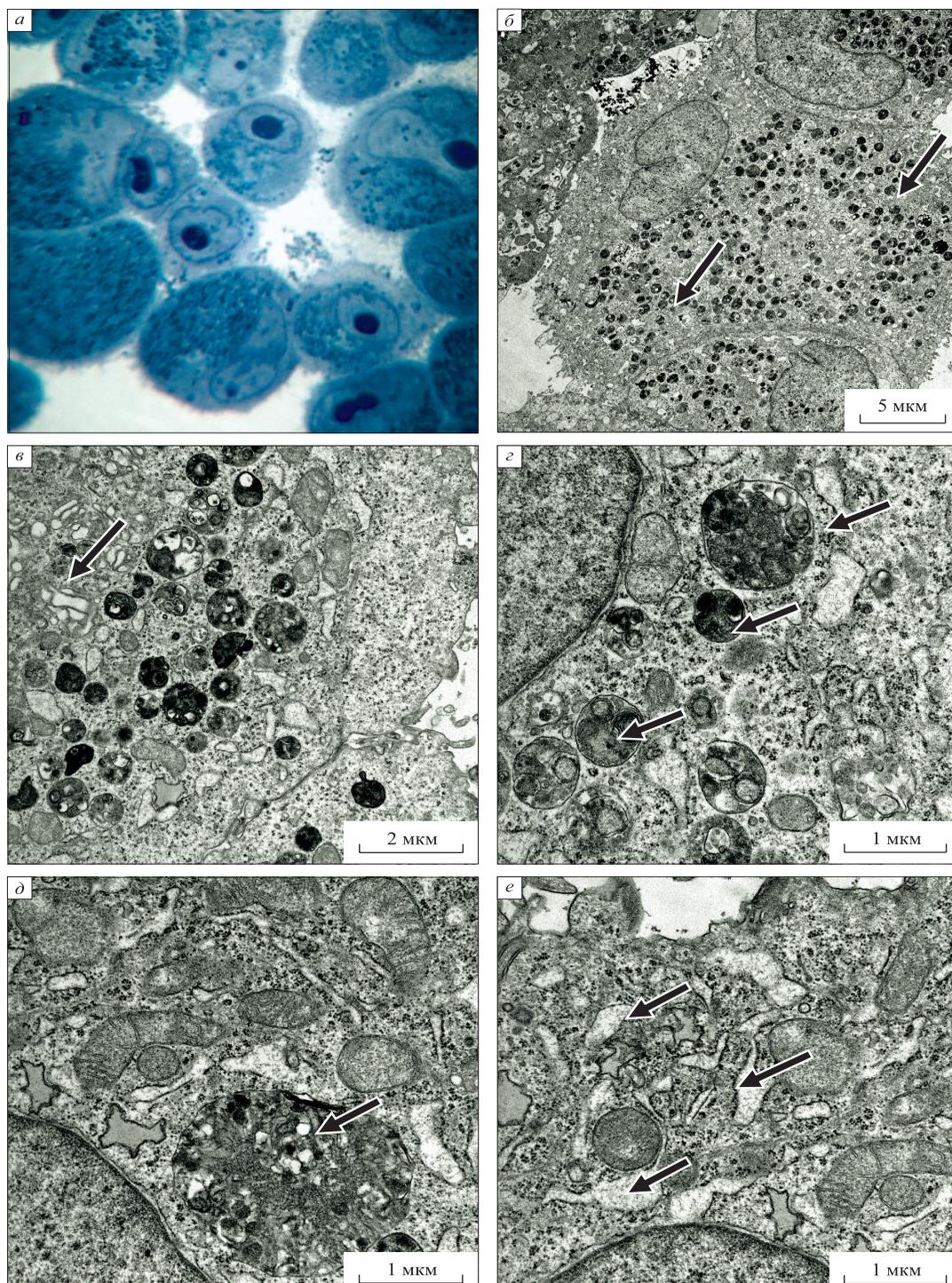
#### **Заключение**

Полученные данные свидетельствуют, что введение ИГ в дозе 37 ЕД/мл в культуру клеток конъюнктивы оказывает влияние на ультраструктурную организацию клеток без цитотоксического воздействия. Увеличение концентрации ИГ увеличивает проницаемость клеточной мембраны, что способствует изменению структуры клеточной поверхности, и проницаемость мембран лизосом. При этом также имеет место отсутствие выраженных цитотоксических признаков. При введении ИС в дозе 37 ЕД/мл структура клеточной поверхности не изменялась, но при этом



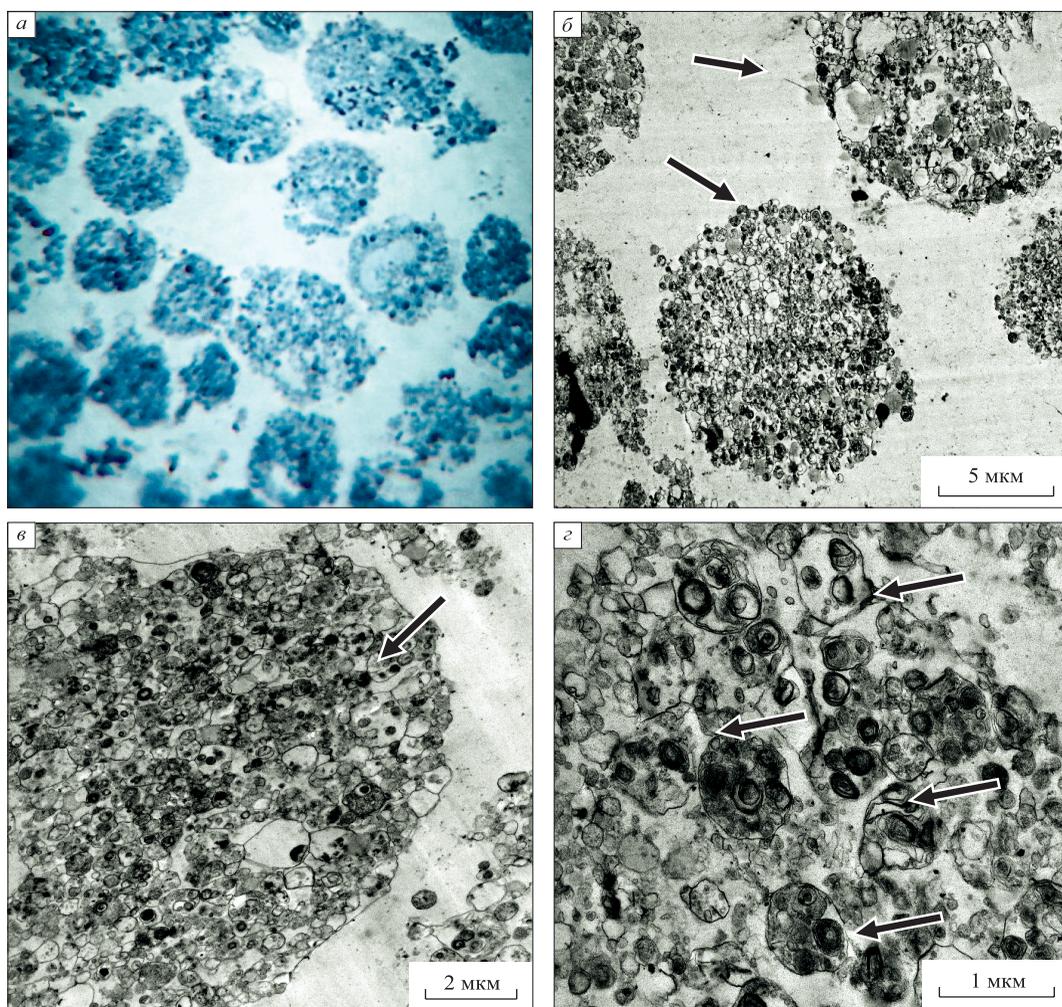
**Рис. 3.** Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИГ в дозе 150 ЕД/мл: а – эпителиоциты конъюнктивы; б – ультраструктура эпителиоцита конъюнктивы; увеличенные размеры цистерн комплекса Гольджи (стрелки); в – крупная аутолизосома в цитоплазме эпителиоцита (стрелка); г – аутолизосомы в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы (стрелки); д – деструктивные лизосомы (стрелки) в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы; е – сглаженная поверхность плазматической мембраны и отсутствие везикулярных структур в цитоплазме эпителиоцита конъюнктивы (стрелки)

**Fig. 3.** The structure of conjunctival epithelial cells after the administration of IG at a dose of 150 units/ml: a – epithelial cells of the conjunctiva; б – ultrastructure of the epitheliocyte of the conjunctiva, enlarged dimensions of the cisterns of the Golgi complex (arrows); в – large autolysosome in the cytoplasm of the epithelial cell (arrow); г – autolysosomes in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells (arrows); д – destructive lysosomes (arrows) in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells; е – smoothed surface of the plasma membrane and the absence of vesicular structures in the cytoplasm of the conjunctival epithelial cell (arrows)



**Рис. 4.** Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения ИС в дозе 37 ЕД/мл: а – эпителиоциты конъюнктивы; б – ультраструктура эпителиоцитов конъюнктивы, большое содержание лизосомальных структур (стрелки); в – увеличенные размеры цистерн комплекса Гольджи (стрелки); г – аутолизосомы в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы (стрелки); д – крупная аутолизосома в цитоплазме эпителиоцита (стрелка); е – расширенные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума (стрелки) в цитоплазме эпителиоцитов конъюнктивы

**Fig. 4.** The structure of conjunctival epithelial cells after IS administration at a dose of 37 U/ml: a – epithelial cells of the conjunctiva; б – ultrastructure of conjunctival epithelial cells, high content of lysosomal structures (arrows); в – enlarged dimensions of the cisterns of the Golgi complex (arrows); г – autolysosomes in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells (arrows); д – large autolysosome in the cytoplasm of the epithelial cell (arrow); е – expanded cisterns of the granular endoplasmic reticulum (arrows) in the cytoplasm of conjunctival epithelial cells



**Рис. 5.** Структура эпителиоцитов конъюнктивы после введения большой дозы субтилизинов: а – эпителиоциты конъюнктивы; б – ультраструктура эпителиоцитов конъюнктивы, деструктивные изменения клеток (стрелки); в – аутофагическая гибель эпителиоцита конъюнктивы (стрелка); г – аутолизосомы (стрелки) в цитоплазме эпителиоцита конъюнктивы

**Fig. 5.** The structure of conjunctival epithelial cells after a large dose of subtilisins: а – epithelial cells of the conjunctiva; б – ultrastructure of conjunctival epitheliocytes, destructive cell changes (arrows); в – autophagic death of conjunctival epithelial cells (arrow); г – autolysosomes (arrows) in the cytoplasm of the conjunctival epithelial cell

в цитоплазме отмечали структурные признаки стресса эндоплазматического ретикулума, что характеризует противовоспалительный потенциал эпителиальной клетки. Воздействие на эпителиоциты конъюнктивы ИС в дозе 150 ЕД/мл сопровождается выраженным цитотоксическим действием.

### Список литературы / References

1. Cioni P., Gabellieri E., Campanini B., Bettati S., Raboni S. Use of exogenous enzymes in human therapy: approved drugs and potential applications. *Curr. Med. Chem.* 2022;29(3):411–452. doi: 10.2174/0929867328666210713094722

2. Hennigan J.N., Lynch M.D. The past, present, and future of enzyme-based therapies. *Drug Discov. Today.* 2022;27(1):117–133. doi: 10.1016/j.drudis.2021.09.004

3. Yari M., Ghoshoon M.B., Vakili B., Ghasemi Y. Therapeutic enzymes: applications and approaches to pharmacological improvement. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2017;18(7):531–540. doi: 10.2174/1389201018666170808150742

4. Sharma D.S.C., Lahiri M.A. Use of hyaluronidase in plastic surgery: A review. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2021;74(7):1610–1614. doi: 10.1016/j.bjps.2021.03.125

5. Buhren B.A., Schrupf H., Gorges K., Reiners O., Bölke E., Fischer J.W., Homey B., Gerber P.A.

- Dose- and time-dependent effects of hyaluronidase on structural cells and the extracellular matrix of the skin. *Eur. J. Med. Res.* 2020;25(1):60. doi: 10.1186/s40001-020-00460-z
6. Weber G.C., Buhren B.A., Schrupf H., Wohlrab J., Gerber P.A. Clinical applications of hyaluronidase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019;1148:255–277. doi: 10.1007/978-981-13-7709-9\_12
7. Мишенина С.В., Байкалов Г.И., Байкалова Н.Е., Макаров В.К., Мадонов П.Г. Обоснование применения иммобилизованных субтилизинов для таргетной терапии венозных тромбозов. *J. Sib. Med. Sci.* 2020;(1):76–88. doi: 10.31549/2542-1174-2020-1-76-88
- Mishenina S.V., Baikalov G.I., Baikalova N.E., Makarov V.K., Madonov P.G. A rationale for application of immobilized subtilisines for target therapy of venous thrombosis. *J. Sib. Med. Sci.* 2020;(1):76–88. [In Russian]. doi: 10.31549/2542-1174-2020-1-76-88
8. Мадонов П.Г., Момот А.П., Мамаев А.Н., Ройтман Е.В., Мишенина С.В. Неплазминовый фибринолиз субтилизинами. *Тромбоз, гемостаз и реол.* 2019;79(3): 24–31. doi: 10.25555/THR.2019.3.0886
- Madonov P.G., Momot A.P., Mamaev A.N., Roitman E.V., Mishenina S.V. Non-plasmin fibrinolysis with immobilized subtilisins. *Tromboz, gemostaz i reologiya = Thrombosis, Hemostasis and Rheology.* 2019;3(79):24–32. [In Russian]. doi.org/10.25555/THR.2019.3.0886
9. Эмедова Т.А., Макаров К.Ю., Мадонов П.Г., Соколова Т.М., Айдагулова С.В., Маринкин И.О. Позитивный эффект иммобилизованных субтилизинов при лечении хронической эстроген-индуцированной венозной недостаточности. *Сиб. науч. мед. ж.* 2017;37(4): 47–52.
- Emedova T.A., Makarov K.Yu., Madonov P.G., Sokolova T.M., Aidagulova S.V., Marinkin I.O. Positive effect of immobilized subtilisins at the treatment of estrogen-induced chronic venous insufficiency. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2017;37(4): 47–52. [In Russian].
10. Azrin N.A.M., Ali M.S.M., Rahman R.N.Z.R.A., Oslan S.N., Noor N.D.M. Versatility of subtilisin: A review on structure, characteristics, and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2022. doi: 10.1002/bab.2309
11. Weng Y., Yao J., Sparks S., Wang K.Y. Nattokinase: an oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(3):523. doi: 10.3390/ijms18030523
12. Yuan L., Liangqi C., Xiyu T., Jinyao L. Biotechnology, bioengineering and applications of bacillus natto kinase. *Biomolecules.* 2022;12(7):980. doi: 10.3390/biom12070980
13. Hodis H.N., Mack W.J., Meiselman H.J., Kalra V., Liebman H., Hwang-Levine J., Dustin L., Kono N., Mert M., Wenby R.B., ... Whitfield L. Nattokinase atherothrombotic prevention study: A randomized controlled trial. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2021;78(4):339–353. doi: 10.3233/CH-211147
14. de la Fuente M., Lombardero L., Gómez-González A., Solari C., Angulo-Barturen I., Acera A., Vecino E., Astigarraga E., Barreda-Gómez G. Enzyme therapy: current challenges and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(17):9181. doi: 10.3390/ijms22179181
15. Мадонов П.Г., Ершов К.И., Дубровин А.В., Заполоцкий Е.Н., Мирошников П.Н., Шилова М.А., Киншт Д.Н. Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств. *Мед. и образ. в Сибири.* 2013;(4):40–52.
- Madonov P.G., Ershov K.I., Dubrovin A.V., Zapolsky E.N., Miroshnikov P.N., Shilova M.A., Kinsht D.N. Electron-beam modification of preparations of the albuminous nature for improvement of their pharmacological properties. *Meditina i obrazovanie v Sibiri = Medicine and Education in Siberia.* 2013;(4):40–52. [In Russian].
16. Назаренко К.А., Хороших Ю.И., Запускалов И.В. Энзимотерапия в офтальмологии. *Вестн. офтальмол.* 2006;122(3):36–42.
- Nazarenko K.A., Khoroshikh Yu.I., Zapuscalov I.V. Enzyme therapy in ophthalmology. *Vestnik oftal'mologii = The Russian Annals of Ophthalmology.* 2006;122(3):36–42. [In Russian].
17. Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Киншт Д.Н., Кихтенко Н.В. Химические и фармакологические свойства субтилизинов. *Сиб. науч. мед. ж.* 2016;36(3):13–22.
- Madonov P.G., Mishenina S.V., Kinsht D.N., Kikhtenko N.V. Chemical and pharmacological properties of subtilisins. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2016;36(3):13–22. [In Russian].
18. Мадонов П.Г., Мишенина С.В., Киншт Д.Н., Кихтенко Н.В. Таргетная фармакодинамика субтилизинов. *Сиб. науч. мед. ж.* 2016;36(4):15–24.
- Madonov P.G., Mishenina S.V., Kinsht D.N., Kikhtenko N.V. Targeted pharmacodynamics of subtilisins. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2016;36(4):15–24. [In Russian].
19. Дыгай А.М., Першина О.В., Крупин В.А., Ермолаева Л.А., Ермакова Н.Н., Шилова М.А., Мадонов П.Г., Киншт Д.Н., Скурихин Е.Г. Изучение антифибротической активности модифицированной и нативной гиалуронидазы при пневмофиброзе. *Сиб. науч. мед. ж.* 2017;37(4):5–10.
- Dygai A.M., Pershina O.V., Krupin V.A., Ermolaeva L.A., Ermakova N.N., Shilova M.A., Madonov P.G., Kinsht D.N., Skurikhin E.G. Study of the antifibrotic activity of modified and native hyaluronidase at pulmonary fibrosis. *Sibirskij nauchnyj medicinskij*

zhurnal= *Siberian Scientific Medical Journal*. 2017;37(4):5–10. [In Russian].

20. Skurikhin E., Madonov P., Pershina O., Ermakova N., Pakhomova A., Widera D., Pan E., Zhukova M., Sandrikina L., Artamonov A., Dygai A. Micellar hyaluronidase and spiperone as a potential treatment for pulmonary fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22:5599. doi: 10.3390/ijms22115599

21. Şapte E., Costea C.F., Cărauleanu A., Dancă C., Dumitrescu G.F., Dimitriu G., Chihaiia M.A.,

Buzdugă C.M., Cucu A., Turliucet M.D. Histological, immunohistochemical and clinical considerations on amniotic membrane transplant for ocular surface reconstruction. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2017;58:363–369.

22. Dua H.S., Faraj L.A., Said D.G., Gray T., Lowe J. Human corneal anatomy redefined: A novel pre-Descemet's layer (Dua's Layer). *Ophthalmology.* 2013;120(9):1778–1785. doi: 10.1016/j.ophtha.2013.01.018

#### Сведения об авторах:

**Виктория Евгеньевна Забанова**, ORCID: 0000-0001-9879-8986, e-mail: vikazabanova@gmail.com,

**Анжелла Жановна Фурсова**, д.м.н., ORCID: 0000-0001-6311-5452, e-mail: anzhellafursova@yandex.ru

**Наталья Анатольевна Бондаренко**, к.б.н., e-mail: bond802888@yandex.ru

**Наталья Петровна Бгатова**, д.б.н., проф., ORCID: 0000-0002-4507-093X, e-mail: nataliya.bgatova@yandex.ru

**Антон Владимирович Затеев**, ORCID: 0000-0002-8863-2672, e-mail: zateev1997@mail.ru

**Павел Геннадьевич Мадонов**, д.м.н., ORCID: 0000-0002-1093-8938, e-mail: pmadonov@yandex.ru

#### Information about the authors:

**Victoria E. Zabanova**, ORCID: 0000-0001-9879-8986, e-mail: vikazabanova@gmail.com

**Anzhella Z. Fursova**, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-6311-5452, e-mail: anzhellafursova@yandex.ru

**Natalya A. Bondarenko**, candidate of biological sciences, e-mail: bond802888@yandex.ru

**Nataliya P. Bgatova**, doctor of biological sciences, professor, ORCID: 0000-0002-4507-093X,  
e-mail: nataliya.bgatova@yandex.ru

**Anton V. Zateev**, ORCID: 0000-0002-8863-2672, e-mail: zateev1997@mail.ru

**Pavel G. Madonov**, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-1093-8938, e-mail: pmadonov@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.10.2022

Принята к публикации 15.12.2022

Received 04.10.2022

Accepted 15.12.2022

## Уменьшение гепатотоксичности нимесулида в составе композиции с глицирризинатом натрия, полученной механохимическим способом

Е.С. Петрова<sup>1</sup>, Н.А. Жукова<sup>2</sup>, В.И. Евсеенко<sup>1</sup>, М.В. Хвостов<sup>1,2</sup>, Ю.В. Мешкова<sup>2</sup>, Т.Г. Толстикова<sup>2</sup>, А.В. Душкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН  
630090, г. Новосибирск, ул. Кутателадзе, 18

<sup>2</sup> Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН  
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 9

### Резюме

Нимесулид (NIM) – это нестероидное противовоспалительное средство, действующее специфически в качестве ингибитора циклооксигеназы-2 и широко используемое для лечения острой боли. В медицинской практике собран большой массив данных, описывающих влияние NIM на организм, при этом обнаружен побочный гепатотоксический эффект препарата. Механизм гепатотоксичности NIM неизвестен, но, вероятно, обусловлен своеобразной реакцией на промежуточное звено его метаболизма. Снижение побочного гепатотоксического действия NIM – актуальная задача современной фармакологии. Цель исследования заключалась в изучении гепатотоксичности механохимической композиции NIM с глицирризинатом натрия ( $\text{Na}_2\text{GA}$ ) в сравнении с чистым NIM и физической смесью NIM/ $\text{Na}_2\text{GA}$ . **Материал и методы.** Мышам линии CD-1 в течение 14 дней перорально вводили: 1-й группе животных – механохимическую композицию NIM/ $\text{Na}_2\text{GA}$  (1:10, м/м) в дозе 1650 мг/кг, 2-й группе – физическую смесь NIM/ $\text{Na}_2\text{GA}$  (1:10, м/м) в дозе 1650 мг/кг, 3-й группе – чистый NIM в дозе 600 мг/кг (фармакокинетически эквивалентно 1650 мг/кг композиции NIM/ $\text{Na}_2\text{GA}$ ), 4-й группе – воду. Поражение печени оценивали с помощью гистологических исследований, а также по активности печеночных трансаминаз в сыворотке крови животных. **Результаты и их обсуждение.** Гистопатологических изменений в печени у мышей, получавших механохимическую композицию NIM/ $\text{Na}_2\text{GA}$ , не обнаружено, морфологическая картина органа соответствовала таковой в контрольной группе животных, получавших воду. При этом наблюдалось токсическое поражение печени у мышей, получавших NIM как в чистом виде в дозе 600 мг/кг, так и в виде физической смеси с  $\text{Na}_2\text{GA}$  в дозе, аналогичной NIM/ $\text{Na}_2\text{GA}$ . Биохимический анализ сыворотки крови показал, что механохимическая композиция NIM/ $\text{Na}_2\text{GA}$  статистически значимо снижает активность АлАТ (более чем в 1,5 раза) и АсАТ (в 1,3 раза) по сравнению с чистым NIM. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале практического применения механохимической композиции NIM/ $\text{Na}_2\text{GA}$ .

**Ключевые слова:** нимесулид, гепатотоксичность, твердые фармацевтические дисперсии, глицирризинат натрия.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Источник финансирования.** Работа выполнена в рамках государственного задания № 121032500061-7 (ИХТТМ СО РАН) и № 1021051402785-4-1.4.1 (НИОХ СО РАН).

**Автор для переписки:** Душкин А.В., e-mail: avd@ngs.ru

**Для цитирования:** Петрова Е.С., Жукова Н.А., Евсеенко В.И., Хвостов М.В., Мешкова Ю.В., Толстикова Т.Г., Душкин А.В. Уменьшение гепатотоксичности нимесулида в составе композиции с глицирризинатом натрия, полученной механохимическим способом. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2023;43(1):71–78. doi: 10.18699/SSMJ20230107

## Reduction of hepatotoxicity of nimesulide in mechanochemically obtained composition with disodium salt of glycyrrhizic acid

E.S. Petrova<sup>1</sup>, N.A. Zhukova<sup>2</sup>, V.I. Evseenko<sup>1</sup>, M.V. Khvostov<sup>1,2</sup>, I.V. Meshkova<sup>2</sup>, T.G. Tolstikova<sup>2</sup>, A.V. Dushkin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS  
630090, Novosibirsk, Kutateladze str., 18

<sup>2</sup> N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS  
630090, Novosibirsk, Akademika Lavrentyeva ave, 9

### Abstract

Nimesulide (NIM) is a nonsteroid anti-inflammatory drug which acts as a selective cyclooxygenase 2 inhibitor and is widely used for acute pain treatment. In medical practice, a large amount of data has been collected describing the effect of NIM on the body, while a hepatotoxic side effect of the drug has been found. The exact mechanisms of such NIM-induced hepatotoxicity largely remain unknown but likely involve the intermediate reaction of its metabolism. Reduction of the hepatotoxic side effect of NIM is an actual problem for pharmacology. The aim of the present research was to evaluate the hepatotoxicity of the mechanochemically obtained composition of NIM with glycyrrhizic acid disodium salt (Na<sub>2</sub>GA) compared to pure NIM and a physical mixture of NIM with Na<sub>2</sub>GA. **Material and methods.** CD-1 mice were orally administered for 14 days: 1 group – mechanochemical composition NIM/Na<sub>2</sub>GA (1:10, m/m) at a dose of 1650 mg/kg; 2 group – physical mixture of NIM with Na<sub>2</sub>GA (1:10, m/m) at a dose of 1650 mg/kg; 3 group – pure NIM at a dose of 600 mg/kg (which pharmacokinetically corresponds to 1650 mg/kg of NIM/Na<sub>2</sub>GA); 4 group – vehicle (distilled water). The liver damage was assessed using histological studies and enzymatic activity of the alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in blood serum. **Results.** Histological analysis did not detect any changes in the liver of NIM/Na<sub>2</sub>GA-treated animals in comparison with a water-treated group. On the opposite, NIM given alone or as a physical mixture with Na<sub>2</sub>GA induced severe hepatotoxicity in experimental mice. Biochemical analysis of the blood serum revealed that mechanochemical NIM/Na<sub>2</sub>GA composition significantly reduced activity of the alanine aminotransferase (about 1.5 times) and aspartate aminotransferase (1.3 times) as compared with the pure NIM. **Conclusions.** The results obtained indicate a high potential for the practical application of the NIM/Na<sub>2</sub>GA mechanochemical composition.

**Key words:** nimesulide, hepatotoxicity, solid pharmaceutical dispersions, disodium salt of glycyrrhizic acid.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

**Financing:** The research has been carried out within the framework of the state task No. 121032500061-7 (Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS) and No. 1021051402785-4-1.4.1 (Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS)

**Correspondence author:** Dushkin A.V., e-mail: avd@ngs.ru

**Citation:** Petrova E.S., Zhukova N.A., Evseenko V.I., Khvostov M.V., Meshkova I.V., Tolstikova T.G., Dushkin A.V. Reduction of hepatotoxicity of nimesulide in mechanochemically obtained composition with disodium salt of glycyrrhizic acid. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(1):71–78. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230107

### Введение

Нимесулид (NIM) – нестероидное противовоспалительное средство (НПВС), впервые выпущенное на европейский фармацевтический рынок в 1985 г. швейцарской компанией Helsinn [1]. Известно, что NIM является ингибитором циклооксигеназы-2, и механизм его действия связан с обратимым подавлением синтеза простагландина E<sub>2</sub>, что в свою очередь приводит к снижению отека, воспаления и боли [2].

С момента начала использования NIM в медицинской практике собран большой массив данных, описывающих его влияние на организм, при этом была показана гепатотоксичность препарата, в том числе с летальным исходом [3], в связи с чем применение NIM не разрешено американским агентством по надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA). Однако результаты сравнения частоты возникновения побочных эффектов в результате применения NIM и других НПВС (в том числе диклофенака, ибупро-

фена, кетопрофена, пироксикама, мелоксикама, рофекоксиба) показывают сравнительно низкую токсичность NIM [4, 5]. Так, частота гепатотоксических эффектов NIM оценивается как «очень редко» ( $< 1/10000$ ) для нозологических единиц «гепатит», «молниеносный гепатит», «желтуха», «холестаз» и «часто» – для повышения уровня печеночных трансаминаз [6]. Результаты метаанализа, проведенного в 2010 г., не подтвердили причинно-следственной связи между приемом NIM и поражением печени [7], но в 2019 г. опубликована работа группы исследователей из Сеула (Республика Корея), посвященная гепатотоксическим побочным эффектам NIM, и результаты проведенного авторами метаанализа указывают на повышенный риск развития поражения печени у пациентов женского пола и пожилого возраста, принимающих NIM [8]. В 2021 г. эти данные подтвердили южноамериканские исследователи, подчеркнув, что соотношение «риск/польза» в случае применения NIM следует оценивать как «неблагоприятное» [9].

Неоднозначность клинических данных требует проведения исследований токсичности NIM, в частности его гепатотоксичности, на животных. Результаты таких исследований также неоднозначны. С одной стороны, показаны эффективность NIM как противоопухолевого агента у крыс линии Wistar [10], а также снижение выраженности жирового гепатоза при метаболическом синдроме у мышей линии C57BL/6J [11]. С другой стороны, гистоморфологическое исследование продемонстрировало, что применение NIM приводит к образованию очагов некроза в печени крыс Wistar [12]. Также обнаружено, что NIM провоцирует у крыс линии Wistar холестаз [13], а у крыс линии Sprague-Dowley и мышей линии Swiss повышает уровень печеночных трансаминаз в крови, вызывает гиперплазию печеночных протоков и дегенерацию гепатоцитов [14, 15].

Иными словами, отрицать гепатотоксичность NIM нельзя, и снижение побочного гепатотоксического эффекта этого препарата – актуальная задача современной фармакологии. Одним из подходов к снижению токсичности фармпрепаратов является создание супрамолекулярных комплексов известных лекарств с водорастворимыми растительными метаболитами твердофазным механохимическим методом, что позволяет снизить минимальную эффективную дозу препарата, увеличив его биодоступность [16]. Ранее нами показано, что твердая дисперсия NIM/Na<sub>2</sub>GA, полученная механохимическим способом, за счет увеличения биодоступности снижает минимальную эффективную дозу NIM, сохраняя при этом

его высокую противовоспалительную активность [17].

Целью настоящего исследования является изучение гепатотоксичности механохимической композиции NIM/Na<sub>2</sub>GA в сравнении с чистым NIM и физической смесью NIM с Na<sub>2</sub>GA.

## **Материал и методы**

NIM приобретен в Well Green Technology Co. Ltd. (Китай), Na<sub>2</sub>GA (с чистотой 98 %) – в Shaanxi Sciphar Biotechnology Co. Ltd. (Китай). Для определения активностей печеночных трансаминаз в сыворотке крови мышей использовали набор реагентов от компании АО «Вектор-Бест». Синтез композиции NIM/Na<sub>2</sub>GA осуществляли с помощью твердофазной механохимической технологии. Для проведения механохимической обработки использовали шаровую мельницу VM-1 с барабаном, имеющим фторопластовую футеровку. Режим обработки: ускорение мелющих тел – 1 г, скорость вращения барабана – 156 об/мин, масса обрабатываемого материала – 20 г, объем барабана – 300 мл, мелющие тела – стальные шары (диаметр 23 мм, загрузка 675 г). Время механической обработки составляло 16 ч, массовое соотношение NIM/Na<sub>2</sub>GA – 1:10 [17].

Исследование проводили на мышах линии CD-1 в возрасте 6 недель, массой 25–30 г, полученных из Института цитологии и генетики СО РАН. Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к корму и воде. Мышей случайным образом разделили на 4 группы по 8 особей в каждой. Первой (контрольной) группе внутрижелудочно вводили по 0,5 мл воды. Мышам второй группы перорально вводили чистый NIM в дозе 600 мг/кг. Для этого препарат предварительно растирали в ступке с 2–3 каплями эмульгатора твин-80 с последующим добавлением дистиллированной воды. Полученную суспензию вводили в объеме 0,2 мл на 10 г веса животного. Мыши третьей и четвертой групп получали по 1650 мг/кг композиции NIM/Na<sub>2</sub>GA и физической смеси NIM/Na<sub>2</sub>GA соответственно, растворенных в дистиллированной воде. Растворы тестируемых образцов вводили внутрижелудочно в объеме, аналогичном для чистого NIM. Эксперимент продолжался 14 дней. На 15-е сутки животных декапитировали, кровь собирали для получения сыворотки (центрифугирование 3000 g, 15 мин). Печень фиксировали в 10%-м формалине для последующего гистологического анализа.

Дозировка тестируемых образцов была выбрана исходя из результатов предварительных экспериментов. Гепатотоксический эффект NIM

наблюдали при дозе 600 мг/кг. Дозировка композиции NIM/Na<sub>2</sub>GA подобрана на основании данных фармакокинетики: пероральное введение чистого NIM в дозе 600 мг/кг фармакокинетически соответствует 1650 мг/кг композиции NIM/Na<sub>2</sub>GA (150 мг NIM/1500 мг Na<sub>2</sub>GA).

Печень после фиксирования в 10%-м нейтральном забуференном формалине в течение 7 суток проводили через стандартную дегидратацию в возрастающих концентрациях этанола и ксилола. Все образцы заливали в парафин на рабочей станции AP 280 с использованием Histoplast (Thermo Fisher Scientific, США) с температурой плавления 58 °С. Ткани нарезают толщиной 4,5 мкм на ротационном микротоме NM 335E с одноразовыми сменными лезвиями. Срезы окрашивали периодической кислотой Шиффа, гематоксилином и эозином, оранжевым G и исследовали под световым микроскопом при увеличении в 100–200 раз.

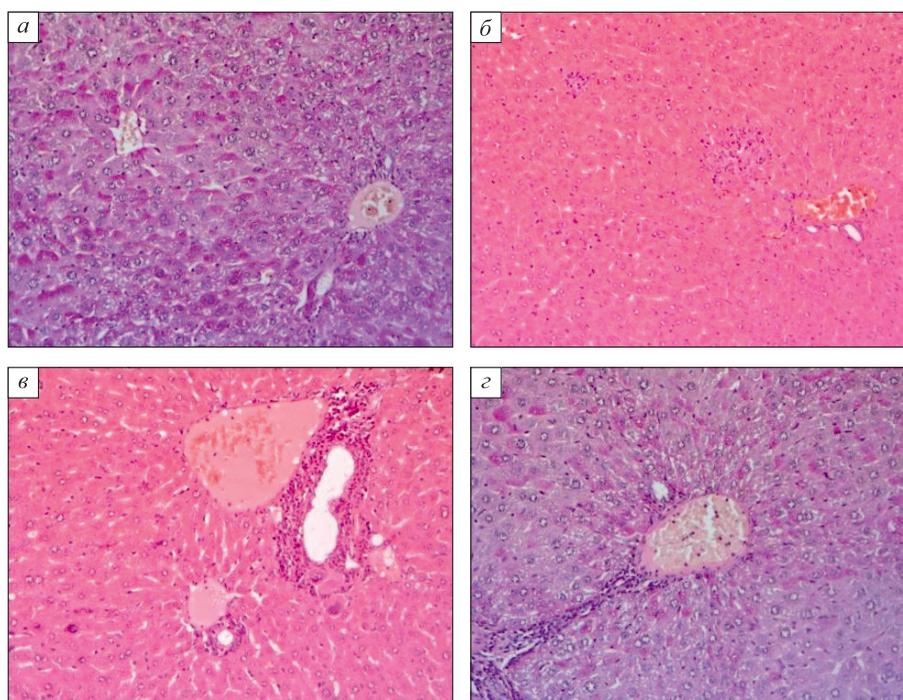
Данные представлены как среднее арифметическое ± ошибка среднего. Различия между группами оценивали с помощью U-критерия Манна –

Уитни, достоверными считались результаты при  $p < 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

### Гистология печени

Гистологическая картина токсического поражения печени мышей при введении NIM в чистом виде в дозе 600 мг/кг (рис. 1) соответствует описанной для клинических случаев [9, 18–21]. У всех животных наблюдались дистрофические и выраженные некротические поражения гепатоцитов перипортальных зон, венозное полнокровие. В гепатоцитах отмечалось перинуклеарное опустошение цитоплазмы и появление в ней вакуолей неправильной формы (рис. 1, а). Некрозы гепатоцитов мелкоочаговые и более крупные подкапсульные, инфильтрированы мононуклеарными лимфоцитами (рис. 1, б). На фоне полнокровия в синусоидах отмечалось большое количество клеточных форм: от полинуклеарных лейкоцитов до крупных мононуклеарных округлой формы клеток. Наблюдалась выраженная лейко-

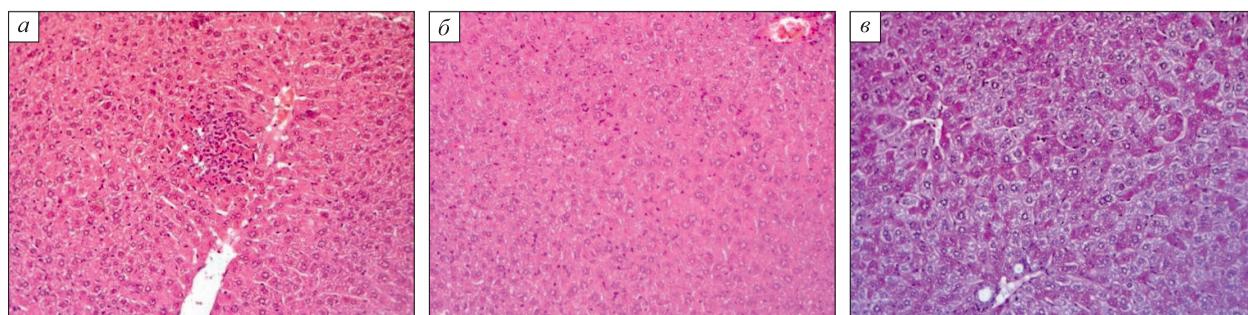


**Рис. 1.** Печень мыши, получавшей чистый NIM в дозе 600 мг/кг.

а – дистрофические изменения гепатоцитов перипортальных зон, окраска ШИК – гематоксилин – оранжевый G, ув.  $\times 200$ ; б – очаги некрозов гепатоцитов, инфильтрированные мононуклеарными клетками, окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 200$ ; в – лейкоцитарная инфильтрация портального тракта, окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 200$ ; г – портопортальный фиброз, окраска ШИК – гематоксилин – оранжевый G, ув.  $\times 200$

**Fig. 1.** Liver of mice treated with pure NIM at a dose of 600 mg/kg.

а – dystrophic changes in hepatocytes of periportal zones, staining PAS – hematoxylin – orange G, magnification  $\times 200$ ; б – foci of necrosis of hepatocytes, infiltrated by mononuclear cells, staining with hematoxylin and eosin, magnification  $\times 200$ ; в – leukocyte infiltration of the portal tract, staining with hematoxylin and eosin, magnification  $\times 200$ ; г – portoportal fibrosis, staining PAS – hematoxylin – orange G, magnification  $\times 200$



**Рис. 2.** Печень мыши, получавшей физическую смесь NIM/Na2GA в дозе 1650 мг/кг (а – очаг некроза гепатоцитов, инфильтрированный мононуклеарными клетками, окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 200$ ) и механохимическую композицию NIM/Na2GA в дозе 1650 мг/кг (б – незначительное венозное полнокровие, окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 200$ ; в – гликоген в гепатоцитах, окраска ШИК – гематоксин – оранжевый G, ув.  $\times 200$ )

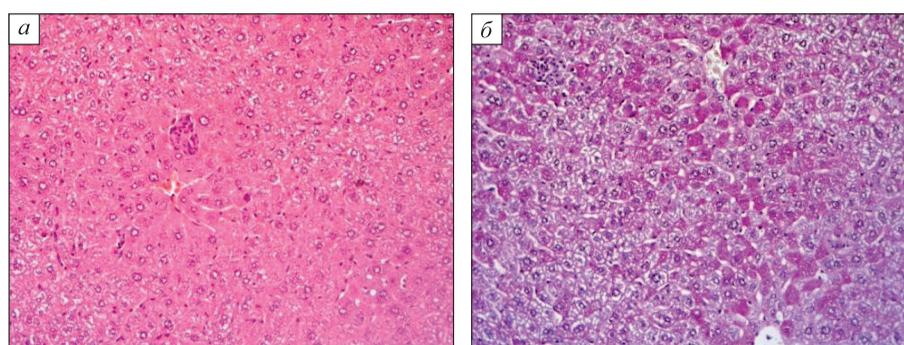
**Fig. 2.** Liver of mouse treated with NIM/Na2GA physical mixture at 1650 mg/kg (a – a focus of hepatocyte necrosis infiltrated with mononuclear cells tract, staining with hematoxylin and eosin, magnification  $\times 200$ ) and with NIM/Na2GA mechanochemical composition at a dose of 1650 mg/kg (б – slight venous congestion, staining with hematoxylin and eosin, magnification  $\times 200$ ; в – glycogen in hepatocytes, staining PAS – hematoxylin – orange G, magnification  $\times 200$ )

цитарная инфильтрация портальных трактов, а также начальные признаки фиброзных изменений перипортальных зон (рис. 1, в, г).

У мышей, получавших физическую смесь NIM/Na<sub>2</sub>GA в дозе 1650 мг/кг, выявлены патологические изменения в печени, идентичные обнаруживаемым у животных, получавших чистый NIM (рис. 2, а). В то же время после двухнедельного введения механохимической композиции NIM/Na<sub>2</sub>GA в дозе 1650 мг/кг у животных не наблюдалось токсического поражения печени (рис. 2, б, в).

Морфологическая картина соответствовала таковой в контрольной группе животных, получавших воду (рис. 3). Архитектоника печени со-

хранена, дистрофических и некротических изменений не обнаружено. В синусоидах выявлялись купферовские клетки с признаками повышенной активности и большое количество моноцитоподобных клеток. Признаков венозного полнокровия не наблюдалось. У контрольных мышей архитектура печени сохранена, желчные капилляры, вены и артерии имели типичное строение. У всех животных выявлялись в паренхиме единичные мелкие очаги некрозов гепатоцитов (2–3 клетки), инфильтрированные мононуклеарными клетками (моноцитами и макрофагами) (рис. 3, а). Выраженных дистрофических изменений в гепатоцитах не обнаружено, отмечалась мозаичная картина распределения гликогена в

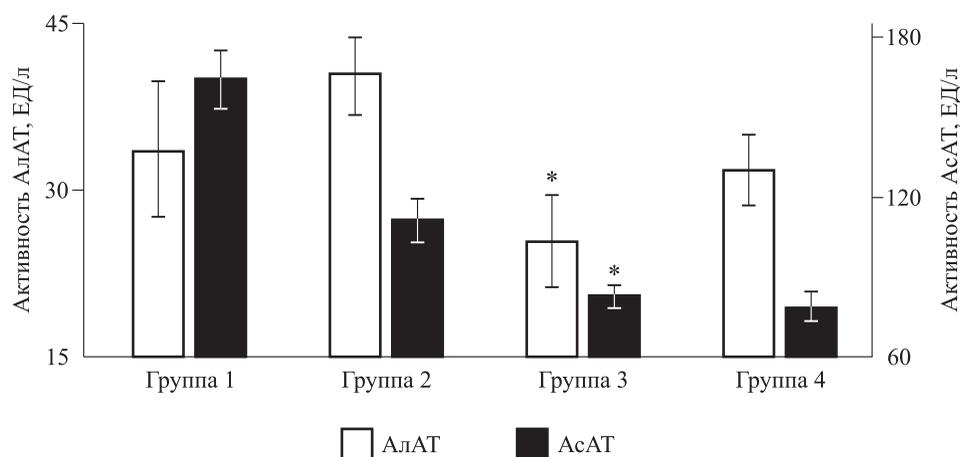


**Рис. 3.** Печень контрольной мыши, получавшей воду.

а – мелкий очаг некроза гепатоцитов (2–3 клетки), инфильтрированный мононуклеарными клетками, окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 200$ ; б – мелкий очаг некроза гепатоцитов, инфильтрированный мононуклеарными клетками, окраска ШИК – гематоксин – оранжевый G, ув.  $\times 200$

**Fig. 3.** Liver of a water-fed control mouse.

а – a small focus of necrosis of hepatocytes (2–3 cells), infiltrated by mononuclear cells, staining with hematoxylin and eosin, magnification  $\times 200$ ; б – a small focus of hepatocyte necrosis, infiltrated by mononuclear cells, a mosaic picture of the location of glycogen, staining PAS – hematoxylin – orange G, magnification  $\times 200$ )



**Рис. 4.** Активность печеночных трансаминаз в сыворотке крови мышей исследуемых групп.

\* – отличие от величины соответствующего показателя животных, получавших чистый NIM, статистически значимо при  $p < 0,05$ .

**Fig. 4.** Activity of liver transaminases in the blood serum of mice of the studied groups.

\* – the difference from the value of the corresponding indicator of animals treated with pure NIM is statistically significant at  $p < 0.05$

клетках по зонам. Гликоген выявлялся в этих гепатоцитах в виде пылевидной зернистости (рис. 3, б). В синусоидах определялись купферовские клетки без признаков повышенной активности и единичные мононуклеарные лейкоциты.

### Печеночные трансаминазы

Установлено, что механохимическая композиция NIM/Na<sub>2</sub>GA статистически значимо снижает активность АлАТ (более чем в 1,5 раза) и АсАТ (в 1,3 раза) по сравнению с чистым NIM (рис. 4), что свидетельствует об уменьшении гепатотоксического действия NIM. При этом необходимо отметить, что контрольные животные демонстрируют высокий уровень АсАТ в сыворотке крови (см. рис. 4). Можно предположить, что это является проявлением феномена «макроэнзимов», в частности – макро-АсАТ, описанного в ряде клинических случаев [22–26]. В настоящее время не существует адекватного объяснения данного феномена, однако авторы отмечают, что он не связан ни с заболеваниями печени, ни с заболеваниями сердца.

Таким образом, результаты настоящей работы продемонстрировали гепатотоксическое действие NIM в чистом виде в дозе 600 мг/кг, при этом механохимическая композиция NIM/Na<sub>2</sub>GA в фармакокинетически эквивалентной дозе 1650 мг/кг (150 мг NIM/1500 мг Na<sub>2</sub>GA) не проявила подобного эффекта: наблюдали отсутствие морфологических признаков поражения печени и снижение активности печеночных трансаминаз в сыворотке крови мышей. Можно предположить, что уменьшение дозы NIM в твердой дисперсии в 4 раза нивелирует его побочное гепатотоксиче-

ское действие в отличие от NIM в чистом виде, а также от физической смеси, при этом композиция сохраняет высокую противовоспалительную активность, которая описана нами ранее [17].

### Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале практического применения механохимической композиции NIM/Na<sub>2</sub>GA с целью снижения побочных гепатотоксических эффектов NIM при сохранении композицией прямой фармакологической активности как НПВС.

### Список литературы / References

- Mattia C., Ciarcia S., Muhindo A., Coluzzi F. Nimesulide 25 anni dopo. *Minerva Med.* 2010;101(4):285–293.
- Famaey J.P. *In vitro* and *in vivo* pharmacological evidence of selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide: an overview. *Inflamm. Res.* 1997;46:437–446. doi: 10.1007/s000110050221
- Nimesulid. In: *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547948/>
- Mattia C., Ciarcia S., Muhindo A., Coluzzi F. Нимесулид: 25 лет спустя. *PMЖ.* 2012;30:1527  
Mattia C., Ciarcia S., Muhindo A., Coluzzi F. Nimesulide 25 years later. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal.* 2012;30:1527. [In Russian].
- Каратеев А.Е. Нимесулид: мифы и реальность. *Справочник поликлинического врача.* 2013;5:40–45.  
Karateev A.E. Nimesulid: myths and reality. *Spravochnik poliklinicheskogo vracha = Guide of Polyclinic Doctor.* 2013;5:40–45. [In Russian].

6. Регистр лекарственных средств России. Нимесулид (Nimesulidum). Режим доступа: <https://www.rlsnet.ru/active-substance/nimesulid-1749>
- Register of Medicines of Russia. Nimesulide (Nimesulidum). Available at: <https://www.rlsnet.ru/active-substance/nimesulid-1749> [In Russian].
7. Bessone F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: What is the actual risk of liver damage? *World J. Gastroenterol.* 2010;16(45):5651–5661. doi: 10.3748/wjg.v16.i45.5651
8. Kwon J., Kim S., Yoo H., Lee E. Nimesulide-induced hepatotoxicity: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2019;14(1):e0209264. doi: 10.1371/journal.pone.0209264
9. Bessone F., Hernandez N., Mendizabal M., Ridruejo E., Gualano G., Fassio E., Peralta M., Fainboim H., Anders M., Tanno H., ... Andrade R.J. Serious liver injury induced by nimesulide: an international collaborative study. *Arch. Toxicol.* 2021;95:1475–1487. doi: 10.1007/s00204-021-03000-8
10. Afzal M., Bhardwaj D.P., Khan R., Kazmi I., Saleem S., Al-Abbasi F.A., Anwar F. Antineoplastic influence of nimesulide in chemically induced hepatocellular carcinoma by inhibition of DNA synthesis. *Inflammopharmacology.* 2019;27:89–98. doi: 10.1007/s10787-018-0481-1
11. Tsujimoto S., Kishina M., Koda M., Yamamoto Y., Tanaka K., Harada Y., Yoshida A., Hisatome I. Nimesulide, a cyclooxygenase-2 selective inhibitor, suppresses obesity-related non-alcoholic fatty liver disease and hepatic insulin resistance through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *Int. J. Mol. Med.* 2016;38:721–728. doi: 10.3892/ijmm.2016.2674
12. Manocha S., Lal D., Venkataraman S. Administration of H<sub>2</sub> blockers in NSAID induced gastropathy in rats: effect on histopathological changes in gastric, hepatic and renal tissues. *Arg. Gastroenterol.* 2016;53(1):36–43. doi: 10.1590/S0004-28032016000100008
13. Zhou L., Pang X., Jiang J., Zhong D., Chen X. Nimesulide and 49-hydroxynimesulide as bile acid transporters inhibitors are contributory factors for drug-induced cholestasis. *Drug Metab. Dispos.* 2017;45:441–448. doi: 10.1124/dmd.116.074104
14. Singh B.K., Tripathi M., Chaudhari B.P., Pandey P.K., Kakkar P. Natural terpenes prevent mitochondrial dysfunction, oxidative stress and release of apoptotic proteins during nimesulide-hepatotoxicity in rats. *PLoS One.* 2012;7(4):e34200. doi: 10.1371/journal.pone.0034200
15. Pereira C.M.C., Dias G.J. Jr, Lima J.V.N., Lemos S.I.A., Rodrigues L.R., Ferreira J.S., Araújo A.S.M.L., Oliveira J.C., Monteiro C.E., Franco Á.X., ... Barbosa A.L.R. Phosphatidylinositol 3-kinase gamma participates in nimesulide-induced hepatic damage. *J. Pharm. Pharmacol.* 2021;73(4):496–504. doi: 10.1093/jpp/rgaa049
16. Душкин А.В., Метелева Е.С., Толстикова Т.Г., Хвостов М.В., Поляков Н.Э., Ляхов Н.З. Супрамолекулярные системы доставки лекарственных веществ на основе водорастворимых растительных метаболитов. Физико-химические, фармакологические свойства и особенности механохимического получения. *Химия в интересах устойчив. развития.* 2019;3:233–244. doi: 10.15372/KhUR2019129
- Dushkin A.V., Meteleva E.S., Tolstikova T.G., Khvostov M.V., Polyakov N.E., Lyakhov N.Z. Supramolecular systems for the delivery of the molecules of medicinal substances based on water-soluble plant metabolites. Physicochemical, pharmacological properties and the features of mechanochemical preparation. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya = Chemistry for Sustainable Development.* 2019;27(3):206–216. [In Russian]. doi: 10.15372/CSD2019129
17. Wei W., Evseenko V.I., Khvostov M.V., Borisov S.A., Tolstikova T.G., Polyakov N.E., Dushkin A.V., Xu W., Min L., Su W. Solubility, permeability, anti-inflammatory action and in vivo pharmacokinetic properties of several mechanochemically obtained pharmaceutical solid dispersions of nimesulide. *Molecules.* 2021;26(6):1531. doi: 10.3390/molecules26061513
18. van Steenberg W., Peeters P., de Bondt J., Staessen D., Büscher H., Laporta T., Roskams T., Desmet V. Nimesulide-induced acute hepatitis: evidence from six cases. *J. Hepatol.* 1998;29:135–141. doi: 10.1016/s0168-8278(98)80188-8
19. Schattner A., Sokolovskaya N., Cohen J. Fatal hepatitis and renal failure during treatment with nimesulide. *J. Intern. Med.* 2000;247:153–155. doi: 10.1046/j.1365-2796.2000.00612.x
20. Stadlmann S., Zoller H., Vogel W., Offner F.A. COX-2 inhibitor (nimesulide) induced acute liver failure. *Virchows Arch.* 2002;440:553–555. doi: 10.1007/s00428-002-0612-2
21. Tan H.H., Ong W.M.C., Lai S.H., Chow W.C. Nimesulide-induced hepatotoxicity and fatal hepatic failure. *Singapore Med. J.* 2007;48(6):582–585.
22. Маврутенков В.В., Маврутенкова Т.В. Феномен повышения активности аспартаттрансаминазы в плазме крови (макро-AST) у практически здоровых людей. *Клин. лаб. диагност.* 2013;6:54–56.
- Mavrutenkov V.V., Mavrutenkova T.V. The phenomenon of increasing of activity of aspartate transaminase in blood plasma (“macro-AST”) in healthy persons. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2013;6:54–56. [In Russian].
23. Rubin A.S., Sass D.A., Stickle D.F. Distribution of serum concentrations reported for macroenzyme aspartate aminotransferase (macro-AST). *Pract. Lab. Med.* 2017;8:65–69. doi: 10.1016/j.plabm.2017.05.003
24. Lorubbio M., Ognibene A., Salvadori B., Fanelli A., Laffi G. Macro-aspartate aminotransferase in a

healthy woman. *Clin. Mol. Hepatol.* 2020;26:378–381. doi: 10.3350/cmh.2020.0069

25. Mingju H., Minyu W., Xiaoxiao G., Sumei L., Jianping M., Wanshan M. Macro-aspartate aminotransferase syndrome: a case report. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2020;58(4):e96–e99. doi: 10.1515/cclm-2019-0618

26. Силивончик Н.Н., Ледник А.И., Левчук О.П., Плотникова Л.И. Макро-аспартатаминотрансфе-

паза. *Гепатол. и гастроэнтерол.* 2021;5(1):25–29. doi:10.25298/2616-5546-2021-5-1-25-29

Silivonchik N.N., Lednik A.I., Levchuk O.P., Plotnikova L.I. Macro-aspartate aminotransferase. *Gepatologiya i gastroenterologiya = Hepatology and Gastroenterology.* 2021;5(1):25–29. [In Russian]. doi:10.25298/2616-5546-2021-5-1-25-29

#### Сведения об авторах:

**Екатерина Сергеевна Петрова**, к.т.н., ORCID: 0000-0002-7640-4867, e-mail: ekamo9@yandex.ru

**Наталья Анатольевна Жукова**, д.м.н., ORCID: 0000-0002-8496-0230, e-mail: nazhukova.1958@yandex.ru

**Вероника Ивановна Евсеенко**, к.х.н., ORCID: 0000-0002-0686-3099, e-mail: evseenkov@inbox.ru

**Михаил Владимирович Хвостов**, д.б.н., ORCID: 0000-0002-5906-4223, e-mail: khvostov@nioch.nsc.ru

**Юлия Владимировна Мешкова**, ORCID: 0000-0002-5935-2540, e-mail: meshkova\_29@mail.ru

**Татьяна Генриховна Толстикова**, д.б.н., проф., ORCID: 0000-0002-3750-2958, e-mail: tg\_tolstikova@mail.ru

**Александр Валерьевич Душкин**, д.х.н., ORCID: 0000-0003-0269-4651, e-mail: avd@ngs.ru

#### Information about the authors:

**Ekaterina S. Petrova**, candidate of technical sciences, ORCID: 0000-0002-7640-4867, e-mail: ekamo9@yandex.ru

**Natalya A. Zhukova**, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-8496-0230, e-mail: nazhukova.1958@yandex.ru

**Veronika I. Evseenko**, candidate of chemical sciences, ORCID: 0000-0002-0686-3099, e-mail: evseenkov@inbox.ru

**Mikhail V. Khvostov**, doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0002-5906-4223, e-mail: khvostov@nioch.nsc.ru

**Iuliya V. Meshkova**, ORCID: 0000-0002-5935-2540, e-mail: meshkova\_29@mail.ru

**Tatyana G. Tolstikova**, doctor of biological sciences, professor, ORCID: 0000-0002-3750-2958,

e-mail: tg\_tolstikova@mail.ru

**Alexandr V. Dushkin**, doctor of chemical sciences, ORCID: 0000-0003-0269-4651, e-mail: avd@ngs.ru

Поступила в редакцию 21.10.2022

Принята к публикации 02.12.2022

Received 21.10.2022

Accepted 02.12.2022

## Унифицированный дизайн валидации методик контроля качества компонентов крови

Е.Н. Калинина, Е.С. Кормщикова, Н.С. Вильданова, Ф.С. Шерстнев

*Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России  
610027, г. Киров, ул. Красноармейская, 72*

### Резюме

Обеспечение качества трансфузионных сред – основополагающий принцип функционирования всех учреждений службы крови, позволяющий гарантировать безопасность реципиента. Неотъемлемой частью процесса заготовки гемокомпонентов является их лабораторное тестирование, достоверность и воспроизводимость результатов которого возможно доказать посредством проведения валидации аналитических методик. Цель исследования – определить правила планирования и выполнения валидационных испытаний методик контроля качества компонентов крови, включая проверку их соответствия установленным критериям приемлемости. **Материал и методы.** Проведен анализ литературы по вопросам безопасности гемокомпонентов и качества лабораторных исследований с оценкой прикладной значимости приведенных сведений. **Результаты и их обсуждение.** По итогам проделанной работы создана унифицированная модель для подтверждения точности определения показателей безопасности трансфузионных сред, что способствует повышению качества донорского биоматериала и эффективности терапии. **Заключение.** Представленный дизайн валидации актуален для медицинских организаций, работающих в сфере донорства крови и ее компонентов.

**Ключевые слова:** компоненты крови, контроль качества, показатели безопасности, аналитические методики, валидация.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Калинина Е.Н., e-mail: kalininaen@niigpk.ru

**Для цитирования:** Калинина Е.Н., Кормщикова Е.С., Вильданова Н.С., Шерстнев Ф.С. Унифицированный дизайн валидации методик контроля качества компонентов крови. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2023;43(1):79–87. doi: 10.18699/SSMJ20230108

## A unified design for validation of methods for quality control of blood components

E.N. Kalinina, E.S. Kormshchikova, N.S. Vildanova, F.S. Sherstnev

*Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of FMBA of Russia  
610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72*

### Abstract

Quality assurance of transfusion media is a fundamental principle of the functioning of all blood service institutions, allowing guaranteeing the safety of the recipient. An integral part of the procuring process of blood components is their laboratory testing, which results reliability and reproducibility can be proved by carrying out of validation of analytical methods. The aim of the study was to define the rules for planning and carrying out validation tests of methods for quality control of blood components, including verification of their compliance with established acceptance criteria. **Material and methods.** The analysis of the literature about the safety of blood components and the quality of laboratory tests was carried out with an assessment of the applied significance of the information proved. **Results and discussion.** As a result of the work done, a unified model for confirming of the accuracy of determining of the safety indicators of

transfusion media was created, which contributes to improving of the quality of donor biomaterial and the effectiveness of therapy. **Conclusions.** The presented validation design is relevant for medical organizations working in the sphere of blood donation and its components.

**Key words:** blood components, quality control, safety indicators, analytical methods, validation.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Correspondence author:** Kalinina E.N., e-mail: kalininaen@niigpk.ru

**Citation:** Kalinina E.N., Kormshchikova E.S., Vildanova N.S., Sherstnev F.S. A unified design for validation of methods for quality control of blood components. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(1):79–87. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230108

## Введение

Создание системы безопасности трансфузионных сред является задачей каждого учреждения службы крови. На сегодняшний день это регламентировано как в нашей стране, так и за рубежом [1–3]. Функционирование указанной системы включает в себя обязательное лабораторное тестирование гемокомпонентов, главный принцип которого – обеспечение точности результатов. Минздравом России и Международной организацией по стандартизации предписано использование контрольных материалов, построение статистических карт [4–6]. Однако в инструкциях по применению наборов реагентов и руководствах по эксплуатации анализаторов не предусмотрена возможность исследования трансфузионных сред. В связи с этим в настоящее время в сфере донорства крови и ее компонентов особую актуальность приобрела валидация аналитических методик, т.е. документированное подтверждение их пригодности для использования по назначению путем проверки соответствия принятым критериям. Такая процедура позволяет с высокой степенью надежности гарантировать воспроизводимость и достоверность определения показателей безопасности заготовленного биоматериала и, как следствие, минимизировать риск причинения вреда жизни и здоровью реципиента. Это свидетельствует о необходимости унификации дизайна валидационных испытаний.

Целью исследования послужила разработка алгоритма планирования и выполнения валидационных испытаний методик контроля качества компонентов крови с оценкой их соответствия заданным критериям приемлемости.

## Материал и методы

Для изучения международного опыта валидации аналитических методик проведен обзор отечественных и зарубежных нормативных актов и научных публикаций. Методология работы заключалась в систематизации информации и по-

иске способов ее практического применения с учетом специфики учреждений службы крови и требований законодательства. Уделено внимание правовой базе в области фарминдустрии, смежной с медициной.

Настоящее исследование включало в себя идентификацию образцов для анализа, контролируемых параметров и методик их оценки, определение объема испытаний, выбор статистических моделей, установление критериев приемлемости. Выделены три группы гемокомпонентов: эритроцитсодержащие среды, концентрат тромбоцитов и свежемороженая плазма (СЗП). Перечень проверяемых показателей безопасности сформирован согласно Постановлению Правительства Российской Федерации от 22.06.2019 № 797 [1]. По итогам тестирования 42 эритроцитсодержащих компонентов крови, 14 проб СЗП и 14 образцов концентрата тромбоцитов, а также сопоставления данных двух научных центров нашей страны рекомендованы оптимальные методы лабораторного анализа [7–11].

Международная нормативная база не содержит требований к проведению валидации аналитических методик в учреждениях службы крови. В то же время для отечественных и зарубежных производителей лекарственных средств подобный алгоритм утвержден [12–14]. В связи с этим дизайн испытаний описан на основании ОФС.1.1.0012.15 [12] с учетом информации, приведенной в научных публикациях [7–11]. Статистическую обработку данных допустимо проводить в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 [13].

## Результаты и их обсуждение

Установлены единые правила валидации методик оценки показателей безопасности трансфузионных сред. В основе всех рекомендованных методов лежат количественные тесты, разрешенные для клинического анализа крови и других биологических жидкостей человека. Их чувствительность и диапазон измерения указаны в инструкциях по применению наборов реагентов,

паспортах и руководствах по эксплуатации оборудования, правильность и линейность обеспечиваются регулярным внутрिलाбораторным контролем качества и автоматической калибровкой приборов. В связи с этим пригодность методик для исследования гемокомпонентов может быть доказана путем проверки специфичности, сходимости и промежуточной прецизионности.

Возможность однозначного выявления аналита в присутствии посторонних примесей и сопутствующих веществ – обязательное условие, гарантирующее достоверность получаемых данных. При планировании валидационных испытаний целесообразно предусмотреть тестирование образцов «плацебо», не содержащих определяемого компонента. Применительно к трансфузионным средам в качестве таких проб могут использоваться антикоагулянты и взвешивающие растворы. Их исследование позволяет оценить влияние состава консервантов и растворителей на результат анализа.

Воспроизводимость методики отражает степень разброса значений целевого параметра в серии измерений, проведенных для одного и того же образца с соблюдением полной идентичности процедуры. Повторяемость данных можно проверить, выполнив не менее шести определений показателя в пробе в течение небольшого промежутка времени без смены оператора. Поскольку характеристики разных доз биоматериала в значительной мере зависят от индивидуальных особенностей доноров, обязательно следует учитывать биологическое разнообразие заготавливаемых трансфузионных сред. Целесообразно тестирование трех или более образцов компонентов крови каждого наименования в соответствии с утвержденной номенклатурой.

Одним из важнейших факторов, определяющих качество лабораторных исследований, является компетентность персонала, владение методами анализа, умение пользоваться аппаратурой. Важно доказать сопоставимость результатов при контроле разными сотрудниками одинаковых проб. Для этого необходимо все описанные выше испытания повторить еще одному аналитику в другой день. Если позволяют имеющиеся мощности подразделения, необходимо привлекать всех компетентных исполнителей, использовать несколько комплектов аналогичного оборудования. Такой подход повышает объективность оценки, так как дает возможность полноценно проверить прецизионность валидируемой методики на базе конкретной лаборатории.

Неотъемлемая часть валидации – статистическая обработка данных. Специфичность характеризует методику качественно, показывая

возможность адекватно идентифицировать искомый компонент в образце и нивелировать влияние мешающих факторов. Числовым выражением сходимости является коэффициент вариации ( $CV_n$ , %). Оценка промежуточной прецизионности включает в себя сравнение выборок. Посредством расчета коэффициента Фишера ( $F$ ) проверяют значимость различий в повторяемости результатов при изменении условий анализа (оператора, приборов, даты). О статистической эквивалентности средних значений судят по коэффициенту Стьюдента ( $t$ ). Относительное стандартное отклонение, рассчитанное исходя из средневзвешенной дисперсии и среднего арифметического для объединенной выборки ( $CV_m$ , %), отражает общий разброс результатов.

Проведение описанных вычислений само по себе не позволяет доказать пригодность валидируемой методики для исследования компонентов крови. Чтобы сделать окончательный вывод, экспериментально найденные значения статистических характеристик необходимо сопоставить с заранее заданными критериями приемлемости. Специфичность можно считать подтвержденной, если при тестировании отрицательных проб показания прибора не превышают допустимой погрешности измерения, указанной в паспорте. Однако это правило действует только в случае удовлетворительных данных текущего анализа калибраторов и контрольных материалов. Метрологическая оценка методов тестирования трансфузионных сред, проведенная в ФГБУН Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России, дала возможность установить максимальные показатели  $CV_n$  и  $CV_m$ . Рассчитанные коэффициенты  $F$  и  $t$  должны быть не выше их критических значений, приведенных в справочной литературе в зависимости от доверительной вероятности ( $p$ ) и числа степеней свободы ( $f$ ).

При определении объема работ необходимо учитывать индивидуальные особенности методики, что позволит оптимизировать трудозатраты, расход реактивов и вспомогательных материалов, потребление воды и энергоресурсов. Допустимо не проверять специфичность выявления аналита, если она подтверждается в рамках тестирования калибраторов и контролей (стандартных образцов, эталонов). В случае невозможности проведения внутрिलाбораторного контроля качества следует расширить перечень валидационных характеристик и предусмотреть проверку правильности определения. При этом номинальное значение показателя должно находиться в пределах доверительного интервала среднего результата.

Помимо планирования и выполнения испытаний, немаловажную роль играет докумен-

тирование процесса. Корректное ведение записей – гарантия прослеживаемости действий и объективности оценки, что способствует точно-му, безошибочному повторению аналитических операций. При оформлении плана валидации следует приводить объем и сроки испытаний, состав рабочей группы, полное описание процедуры тестирования, достаточное для воспроизведения, условия выполнения, последовательность математических и статистических расчетов, оцениваемые характеристики, критерии приемлемости. Распределение ответственности определяется наличием подписи разработчика, а также виз согласования и утверждения. Протокол валидации должен содержать перечень оборудования, реагентов и расходных материалов, первичные экспериментальные данные (показания приборов, распечатываемые бланки и т.п.), результаты вычислений, подписи исполнителей. Статистические выкладки, выводы и заключение о пригодности методики для контроля качества компонентов крови, рекомендации по устранению выявленных откло-

нений целесообразно отражать в согласованном и утвержденном отчете о валидации.

В случае обнаружения несоответствий надлежит предпринять корректирующие действия и повторить описанные мероприятия. Кроме того, ревалидация требуется при изменении технологии заготовки гемокомпонентов, их номенклатуры, перечня проверяемых параметров и методик их анализа.

Дизайн валидационных испытаний методик контроля качества гемокомпонентов представлен в табл. 1–3.

Предлагаемый алгоритм базируется на положениях действующих законодательных актов и данных метрологической оценки лабораторных методов, практикуемых в трансфузиологии.

Вариабельность данных лазерной проточной цитофлуориметрии зависит от типа идентифицируемых клеток и состава гемокомпонента (см. табл. 1–3). В настоящее время известно несколько специализированных наборов реагентов [7–11], что также влияет на воспроизводимость этой методики.

Таблица 1. Дизайн валидации методик контроля качества тромбоцитного концентрата

Table 1. Validation design for quality control methods of platelet concentrate

Показатель безопасности	Метод анализа	Объем испытаний	Критерии приемлемости <sup>1</sup>
Содержание тромбоцитов	Унифицированный метод подсчета в 2-сеточной камере Горяева <sup>2</sup>	Испытуемые образцы: – 3 пробы тромбоконцентрата от разных донаций; – по 1 образцу каждого взвешивающего раствора и антикоагулянта. Количество испытаний: – 6-кратное тестирование каждой пробы;	$CV_n \leq 18,6\%$ $CV_m \leq 18,6\%$ $F \leq F_{cr.}(P, f)$ $t \leq t_{cr.}(P, f)$ $Y_{i,0} \leq \delta$ $\varepsilon \leq \Delta \bar{x}$
	Кондуктометрия с гидродинамическим фокусированием		– повтор испытаний при изменении условий анализа; – при использовании камеры Горяева – 1-кратный анализ пробы аппаратным методом
Остаточное содержание лейкоцитов	Лазерная проточная цитофлуориметрия	– повтор испытаний при изменении условий анализа; – при использовании камеры Горяева – 1-кратный анализ пробы аппаратным методом	$CV_n \leq 17,5\%$ $CV_m \leq 17,5\%$ $F \leq F_{cr.}(P, f)$ $t \leq t_{cr.}(P, f)$ $Y_{i,0} \leq \delta$
рН (при +22 °С) в конце срока годности	Потенциометрический метод		$CV_n \leq 1,0\%$ $CV_m \leq 1,0\%$ $F \leq F_{cr.}(P, f)$ $t \leq t_{cr.}(P, f)$

**Примечание:** <sup>1</sup> – при удовлетворительных результатах внутрилабораторного контроля качества исследований; <sup>2</sup> – при отсутствии возможности анализа контрольных материалов необходима оценка правильности методики;  $CV_n$  и  $CV_m$  – коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение) в условиях сходимости и промежуточной прецизионности соответственно;  $F$  и  $F_{cr.}$  – расчетное и критическое значения критерия Фишера соответственно;  $t$  и  $t_{cr.}$  – расчетное и критическое значения критерия Стьюдента соответственно;  $p$  – доверительная вероятность (рекомендуется  $p = 95\%$ );  $f$  – число степеней свободы;  $Y_{i,0}$  – показания прибора при анализе образцов «плацебо»;  $\delta$  – допустимая погрешность измерения согласно документации на оборудование;  $\varepsilon$  – абсолютная ошибка определения (разность между средним результатом и истинным значением, полученным при исследовании образца на гематологическом анализаторе с помощью валидированной эталонной методики);  $\Delta \bar{x}$  – полуширина доверительного интервала среднего результата.

Таблица 2. Дизайн валидации методик контроля качества СЗП

Table 2. Validation design for quality control methods of fresh frozen plasma

Показатель безопасности		Метод анализа	Объем испытаний	Критерии приемлемости <sup>1</sup>
Фактор VIII		Клоттинговый метод		$CV_n \leq 7,8 \%$ $CV_m \leq 7,8 \%$ $F \leq F_{cr.}(P, f)$ $t \leq t_{cr.}(P, f)$ $Y_{t0} \leq \delta$
Остаточное содержание клеток	Эритроциты	Лазерная проточная цитофлуориметрия	Испытуемые образцы: – 3 пробы плазмы от разных донаций; – по 1 образцу каждого антикоагулянта. Количество испытаний: – 6-кратное тестирование каждой пробы; – повтор испытаний при изменении условий анализа	$CV_n \leq 18,8 \%$ $CV_m \leq 18,8 \%$ $F \leq F_{cr.}(P, f)$ $t \leq t_{cr.}(P, f)$ $Y_{t0} \leq \delta$
	Лейкоциты			$CV_n \leq 29,9 \%$ $CV_m \leq 29,9 \%$ $F \leq F_{cr.}(P, f)$ $t \leq t_{cr.}(P, f)$ $Y_{t0} \leq \delta$
	Тромбоциты			$CV_n \leq 21,2 \%$ $CV_m \leq 21,2 \%$ $F \leq F_{cr.}(P, f)$ $t \leq t_{cr.}(P, f)$ $Y_{t0} \leq \delta$

**Примечание:** <sup>1</sup> – при удовлетворительных результатах внутрилабораторного контроля качества исследований. Ост. обозн. см. в примечаниях к табл. 1.

Поскольку нормы точности для определения показателей безопасности СЗП не регламентированы ни в нашей стране, ни за рубежом, представленные в табл. 2 критерии приемлемости установлены на основании опубликованных данных об эмпирически найденных приписанных характеристиках сходимости соответствующих аналитических методик [8, 11]. При проверке специфичности и промежуточной прецизионности рекомендуется придерживаться требований общих фармакопейных статей [12, 13].

За максимально допустимые значения  $CV_n$  и  $CV_m$  при оценке количества клеток в тромбоцитном концентрате (см. табл. 1) и эритроцитсодержащих средах (см. табл. 3) приняты величины, полученные опытным путем [9–11]. Аналогичный показатель для измерения рН определяли, руководствуясь ОФС.1.2.1.0004.15 [15]. Данный документ предписывает регулярное исследование стандартных буферных растворов, результат тестирования которых не должен отличаться от номинальной величины более чем на 0,05 ед. Известно, что рН тромбоцитных компонентов крови не может превышать 6,4 [1], а сходимость потенциометрического метода выражена приписанной характеристикой 0,4 % [10, 11]. С учетом этого сформулирован соответствующий критерий прецизионности (см. табл. 1). Кроме того, текущий

анализ эталонов подтверждает специфичность выявления ионов  $H^+$ . Нормы точности для показателей «Гемоглобин», «Гематокрит» и «Гемолиз» (гемоглобин в сыворотке) приведены в приказах Минздрава России [4, 5].

При отсутствии возможности проведения внутрилабораторного контроля качества при подсчете числа тромбоцитов в камере Горяева (см. табл. 1), оценке содержания гемоглобина гемиглобинцианидным методом и гематокрита путем центрифугирования в капиллярах (см. табл. 3) рекомендована проверка правильности результатов анализа путем их сравнения с истинным значением. В качестве номинальной величины допустимо использовать данные тестирования испытуемого образца с применением эталонной методики, пригодность которой доказана посредством валидации и регулярного тестирования специализированных контрольных материалов. Для этого в рамках настоящего алгоритма предлагается в ходе испытаний перечисленных методов определять содержание гемоглобина, гематокрита и количество тромбоцитов в пробах на зарегистрированном гематологическом анализаторе. Степень гемолиза вычисляется исходя из уровня общего и свободного гемоглобина и значения гематокрита. В этом случае эталонная методика – аппаратное

Таблица 3. Дизайн валидации методик контроля качества эритроцитсодержащих компонентов крови

Table 3. Validation design for quality control methods of erythrocyte-containing blood components

Показатель безопасности	Метод анализа	Объем испытаний	Критерии приемлемости <sup>1</sup>	
Гемоглобин	Гемиглобинцианидный метод (метод 1) <sup>2</sup>	Испытуемые образцы: – 3 пробы гемокомпонентов от разных донаций; – по 1 образцу каждого взвешивающего раствора и антикоагулянта.  Количество испытаний: – 6-кратное тестирование каждой пробы; – повтор испытаний при изменении условий анализа; – при оценке гематокрита унифицированным методом и содержания гемоглобина гемиглобинцианидным методом – 1-кратный анализ пробы аппаратным методом	$CV_n \leq 4,0 \%$ $CV_m \leq 4,0 \%$ $F \leq F_{cr.}(P, f)$ $t \leq t_{cr.}(P, f)$ $Y_{i0} \leq \delta$ $\varepsilon \leq \Delta x$	
	SLS-метод (метод 2)		$CV_n \leq 4,0 \%$ $CV_m \leq 4,0 \%$ $F \leq F_{cr.}(P, f)$ $t \leq t_{cr.}(P, f)$ $Y_{i0} \leq \delta$	
Гематокрит	Унифицированный метод центрифугирования в гематокритных капиллярах (метод 1) <sup>2</sup>		$CV_n \leq 2,4 \%$ $CV_m \leq 2,4 \%$ $F \leq F_{cr.}(P, f)$ $t \leq t_{cr.}(P, f)$ $Y_{i0} \leq \delta$ $\varepsilon \leq \Delta x$	
	Кондуктометрия с гидродинамическим фокусированием (метод 2), расчетное значение		$CV_n \leq 2,4 \%$ $CV_m \leq 2,4 \%$ $F \leq F_{cr.}(P, f)$ $t \leq t_{cr.}(P, f)$ $Y_{i0} \leq \delta$	
Гемолиз в конце срока годности (расчетный показатель)	Общий и свободный гемоглобин – метод 1, гематокрит – метод 1 <sup>2</sup>		унифицированным методом и содержания гемоглобина гемиглобинцианидным методом – 1-кратный анализ пробы аппаратным методом	$CV_n \leq 23,3 \%$ $CV_m \leq 23,3 \%$ $F \leq F_{cr.}(P, f)$ $t \leq t_{cr.}(P, f)$ $Y_{i0} \leq \delta$ $\varepsilon \leq \Delta x$
	Общий и свободный гемоглобин – метод 2, гематокрит – метод 2			$CV_n \leq 23,3 \%$ $CV_m \leq 23,3 \%$ $F \leq F_{cr.}(P, f)$ $t \leq t_{cr.}(P, f)$ $Y_{i0} \leq \delta$
Остаточное содержание лейкоцитов	Лазерная проточная цитофлуориметрия		$CV_n \leq 19,8 \%$ $CV_m \leq 19,8 \%$ $F \leq F_{cr.}(P, f)$ $t \leq t_{cr.}(P, f)$ $Y_{i0} \leq \delta$	

Примечание: <sup>1</sup> – при удовлетворительных результатах внутрिलाбораторного контроля качества исследований; <sup>2</sup> – при отсутствии возможности анализа контрольных материалов необходима оценка правильности методики. Ост. обозн. см. в примечаниях к табл. 1

тестирование исходного биоматериала и надосадочной жидкости.

Несмотря на то что все представленные методики удовлетворяют критериям точности, подсчет числа тромбоцитов в камере Горяева и унифицированный метод определения гематокрита могут быть рекомендованы только в случае недостаточного оснащения для использования более современных инструментальных методов, которые проще и быстрее в исполнении. В пользу применения кондуктометрии свидетельствует и тот факт, что по данным метрологических ис-

пытаний коэффициент вариации при оценке количества тромбоцитов в счетной камере почти в 7 раз выше, чем при исследовании на гематологическом анализаторе [10, 11]. Возможно, причиной такого различия является менее субъективный способ интерпретации результатов при аппаратном тестировании по сравнению с микроскопией.

Разработанный алгоритм успешно апробирован в ФГБУН Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России. На базе учреждения осуществляется заготовка лейкоредуцированных компонентов крови, таких как

концентрат тромбоцитов, полученный методом афереза, эритроцитная взвесь, СЗП. По итогам валидации доказана возможность проведения текущего контроля качества указанных трансфузионных сред путем:

- измерения рН на приборе марки рН-150М;
- оценки количества тромбоцитов в концентрате, гематокрита, содержания общего и свободного гемоглобина с использованием гематологического анализатора Sysmex XT-4000i;
- определения активности фактора VIII с помощью автоматического коагулометра STA Compact MAX;
- проверки содержания остаточных клеток с применением лазерного проточного цитофлуориметра BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, США), программного обеспечения FACS Diva, тест-систем BD Plasma Count (в случае исследования СЗП) и BD Leuco Count (при подсчете числа лейкоцитов в эритроцитной взвеси и концентрате тромбоцитов).

В ходе испытаний для оценки специфичности анализа в качестве образцов «плацебо» использовали 0,9%-й раствор хлорида натрия, 4%-й раствор цитрата натрия, антикоагулянты ACD-A и CPD, взвешивающие растворы SAGM и SSP+. Правильность определения подтверждали результатами регулярного тестирования эталонных буферных растворов с рН 6,86 и 9,18 (стандарт-титры СТ-рН-04.32), контрольных материалов CBC-XE (L, N, H) (R&D Systems, США), STA-System Control (N+P) (Diagnostica Stago S.A.S., Франция), BD Leucocount Control Kit (BD Biosciences).

Согласно опубликованным данным, применение метода проточной цитометрии для контроля содержания остаточных лейкоцитов в СЗП рекомендовано и по результатам исследований, проведенных в ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России [7]. Аналогичность выводов, сделанных в двух научных центрах, свидетельствует об адекватности предлагаемой модели проверки пригодности аналитических методик.

Актуальность и научную новизну работы подчеркивает то, что на сегодняшний день ни в России, ни за рубежом не регламентирован порядок валидации методик оценки показателей безопасности трансфузионных сред. В то же время эта процедура – часть управления качеством, внедрение которого в учреждениях службы крови является обязательным во многих странах [1–3].

## Заключение

Представленный в статье унифицированный дизайн валидационных испытаний может быть

рекомендован для использования в медицинских организациях, осуществляющих деятельность по заготовке донорской крови и ее компонентов.

## Список литературы

1. Постановление Правительства Российской Федерации от 22.06.2019 № 797 «Об утверждении правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов». Режим доступа: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_328029/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_328029/)

2. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 26.10.2020 № 1148н «Об утверждении требований к организации системы безопасности деятельности субъектов обращения донорской крови и (или) ее компонентов при заготовке, хранении, транспортировке и клиническом использовании донорской крови и (или) ее компонентов». Режим доступа: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/74845109/>

3. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 2020. Recommendation No. R (95) 15, 20th Edition. Available at: <https://www.quotidianosanita.it/allegati/allegato8291904.pdf>

4. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 07.02.2000 № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации». Режим доступа: <https://medica-n.ru/wp-content/uploads/2018/03/Prikaz-45-ot-07.02.2000.pdf>

5. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 26.05.2003 № 220 «Об утверждении отраслевого стандарта “Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов”». Режим доступа: <https://medica-n.ru/wp-content/uploads/2018/03/Prikaz-220-ot-26.05.2003.pdf>

6. International standard ISO 5725-2:2019 «Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method». International Organization for Standardization. Available at: <https://www.sis.se/api/document/preview/80018860/>

7. Козырева В.С., Шилова А.Н., Шкода О.В. Использование метода проточной цитометрии для контроля содержания остаточных лейкоцитов в плазме крови. *Гематол. и трансфузиол.* 2019;64(1):66–72. doi: 10.35754/0234-5730-2019-64-1-66-72

8. Никулина Н.С., Кормщикова Е.С., Калинина Е.Н., Исаева Н.В., Кривокорытова Т.В. Метрологическая оценка методик контроля показателей безопасности свежезамороженной плазмы. *Акту-*

альные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии: к 60-летию Кировского научно-исследовательского института гематологии и переливания крови: сб. тр. конф., Киров, 01–02 октября 2020. Киров: Флат-Принт, 2020. С. 44–56.

9. Никулина Н.С., Калинина Е.Н. Метрологическая оценка методик контроля качества эритроцит-содержащих компонентов крови. *Сиб. науч. мед. ж.* 2019;39(1):136–141. doi: 10.15372/SSMJ20190119

10. Никулина Н.С., Калинина Е.Н., Ноздрина Е.В., Исаева Н.В., Кривокорытова Т.В., Кормщикова Е.С. Метрологическая оценка методик контроля показателей безопасности концентратов тромбоцитов лейкоредуцированных. *Сиб. науч. мед. ж.* 2020;40(3):28–33. doi: 10.15372/SSMJ20200304

11. Калинина Е.Н., Вильданова Н.С., Кормщикова Е.С., Коновалова Е.А., Исаева Н.В., Кривокорытова Т.В., Ковтунова М.Е., Воробьев К.А. Контроль качества компонентов крови: выбор методов лабораторного исследования. *Сиб. науч. мед. ж.* 2022;42(1):56–61. doi: 10.18699/SSMJ20220106

12. ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». В кн.: *Государственная Фармакопея Российской Федерации*. XIV изд. Т. 1. М., 2018. С. 276–288.

13. ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента». В кн.: *Государственная Фармакопея Российской Федерации*. XIV изд. Т. 1. М., 2018. С. 289–318.

14. ICH Harmonized Tripartite Guideline “Validation of analytical procedures: text and methodology”. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Q2(R1), 2005. Available at: [https://www.fptl.ru/biblioteca/validaciya-metodik/ICH\\_Q2-R1\\_guideline.pdf](https://www.fptl.ru/biblioteca/validaciya-metodik/ICH_Q2-R1_guideline.pdf)

15. ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия». В кн.: *Государственная Фармакопея Российской Федерации*. XIV изд. Т. 1. М., 2018. С.532–541.

## References

1. Resolution of the Government of the Russian Federation of June 22, 2019 No. 797 «On approval of the rules for the procurement, storage, transportation and clinical use of donor blood and its components». Available at: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_328029/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_328029/) [In Russian].

2. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of October 26, 2020 No. 1148n «On approval of the requirements for the organization of a safety system for the activities of subjects of circulation of donor blood and (or) its components during the procurement, storage, transportation and clinical use of donor blood and (or) its components». Available at: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/74845109/> [In Russian].

3. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 2020. Recommendation No. R (95) 15, 20th Edition. Available at: <https://www.quotidianosanita.it/allegati/allegato8291904.pdf>

4. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of February 07, 2000 No. 45 «On the system of measures to improve the quality of clinical laboratory tests in healthcare institutions of the Russian Federation». Available at: <https://medica-n.ru/wp-content/uploads/2018/03/Prikaz-45-ot-07.02.2000.pdf> [In Russian].

5. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of May 26, 2003 No. 220 «On approval of sector standard “Rules for carrying out in-laboratory quality control of quantitative methods of clinical laboratory tests using control materials”». Available at: <https://medica-n.ru/wp-content/uploads/2018/03/Prikaz-220-ot-26.05.2003.pdf> [In Russian].

6. International standard ISO 5725-2:2019 «Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method». International Organization for Standardization. Available at: <https://www.sis.se/api/document/preview/80018860/>

7. Kozyreva V.S., Shilova A.N., Shkoda O.V. Flow cytometry for measuring residual leukocytes in blood plasma. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology*. 2019;64(1):66–72. [In Russian]. doi: 10.35754/0234-5730-2019-64-1-66-72

8. Nikulina N.S., Kormshchikova E.S., Kalinina E.N., Isaeva N.V., Krivokorytova T.V. Metrological assessment of control the safety of fresh frozen plazma. *Topical issues of transfusiology, hematology oncology and cell therapy: to the 60th anniversary of the Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion: proc. conf.*, Киров, 01–02.10.2020. Киров: Флат-Принт, 2020. P. 44–56. [In Russian].

9. Nikulina N.S., Kalinina E.N. Metrological evaluation of quality control methods of erythrocyte-containing blood components. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019;39(1):136–141. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190119

10. Nikulina N.S., Kalinina E.N., Nozdrina E.V., Isaeva N.V., Krivokorytova T.V., Kormshchikova E.S. Metrological evaluation of methods for control the safety indicators of leukoreduced platelet concentrates. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2020;40(3):28–33. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20200304

11. Kalinina E.N., Vildanova N.S., Kormshchikova E.S., Konvalova E.A., Isaeva N.V., Krivokorytova T.V., Kovtunova M.E., Vorobiev K.A. Quality control of blood components: selection of laboratory testing methods. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal*

= *Siberian Scientific Medical Journal*. 2022;42(1):56–61. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20220106

12. OFS.1.1.0012.15 “Validation of analytical methods”. In: *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. XIV-th ed. Vol. 1. Moscow, 2018. P. 276–288. [In Russian].

13. OFS.1.1.0013.15 “Statistical processing of the results of a chemical experiment”. In: *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. XIV-th ed. Vol. 1. Moscow, 2018. P. 289–318. [In Russian].

14. ICH Harmonized Tripartite Guideline “Validation of analytical procedures: text and methodology”. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Q2(R1), 2005. Available at: [https://www.fptl.ru/biblioteca/validaciya-metodik/ICH\\_Q2-R1\\_guideline.pdf](https://www.fptl.ru/biblioteca/validaciya-metodik/ICH_Q2-R1_guideline.pdf)

15. OFS.1.2.1.0004.15 “Ionometry”. In: *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. XIV-th ed. Vol. 1. Moscow, 2018. P. 532–541. [In Russian].

#### Сведения об авторах:

Елена Николаевна Калинина, ORCID: 0000-0001-9754-5522, e-mail: kalininaen@niigpk.ru

Елена Сергеевна Кормщикова, ORCID: 0000-0002-8158-8445, e-mail: kormschikova@niigpk.ru

Наталья Сергеевна Вильданова, ORCID: 0000-0002-0791-0571, e-mail: vildanova@niigpk.ru

Филипп Сергеевич Шерстнев, к.м.н., ORCID: 0000-0002-1751-8522, e-mail: sherstnev@niigpk.ru

#### Information about the authors:

Elena N. Kalinina, ORCID: 0000-0001-9754-5522, e-mail: kalininaen@niigpk.ru

Elena S. Kormshchikova, ORCID: 0000-0002-8158-8445, e-mail: kormschikova@niigpk.ru

Nataliya S. Vildanova, ORCID: 0000-0002-0791-0571, e-mail: vildanova@niigpk.ru

Filipp S. Sherstnev, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-1751-8522, e-mail: sherstnev@niigpk.ru

Поступила в редакцию 28.10.2022

После доработки 02.12.2022

Принята к публикации 24.12.2022

Received 28.10.2022

Revision received 02.12.2022

Accepted 24.12.2022

## Алгоритм определения подлинности биомедицинских клеточных препаратов, содержащих мезенхимальные стволовые клетки

С.С. Дружинина<sup>1</sup>, М.А. Логинова<sup>1,2</sup>, Д.Н. Смирнова<sup>1</sup>, И.П. Обухов<sup>1</sup>, К.О. Ярошенко<sup>1</sup>,  
Е.А. Попонина<sup>1</sup>, Е.Л. Назарова<sup>1</sup>, Н.В. Исаева<sup>1</sup>, И.В. Парамонов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России

610027, г. Киров, ул. Красноармейская, 72

<sup>2</sup> Вятский государственный университет

610000, г. Киров, ул. Московская, 36

### Резюме

Применение мезенхимальных стволовых клеток (МСК), обладающих выраженной иммуномодулирующей активностью, – перспективное направление развития биомедицинских клеточных препаратов (БМКП). В онкогематологии использование БМКП, содержащих МСК, направлено на поддержку кроветворения при котрансплантации с гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК) и подавление иммунных конфликтов при аллогенной неродственной трансплантации и тяжелых аутоиммунных процессах. Обязательный этап регистрации БМКП – подтверждение подлинности клеточной линии МСК, включающий в себя установление морфологических характеристик, оценку экспрессии специфических маркеров и белков, подтверждение генетической стабильности клеточной линии в процессе культивирования. Определение маркеров генетической стабильности возможно с использованием различных методик, однако, согласно рекомендациям American National Standardization Institute, эталоном является анализ коротких tandemных повторов (STR-анализ). Цель исследования – разработка алгоритма определения подлинности БМКП, содержащих МСК, включающего в себя STR-анализ. **Материал и методы.** Идентификацию МСК в БМКП проводили по наличию иммунологических маркеров и адгезии к пластику веретенновидных клеток. Количество жизнеспособных клеток подсчитывали в камере Горяева. Иммунофенотипические характеристики МСК определяли методом проточной цитометрии. Уровень продукции специфических белков оценивали с помощью иммуоферментного анализа. Маркеры генетической стабильности выявляли методом STR-анализа. **Результаты и их обсуждение.** Методики апробированы в трех повторностях для десяти образцов БМКП для подтверждения воспроизводимости и достоверности получаемых результатов. Разработанный алгоритм определения подлинности БМКП имеет высокую точность, так как включает в себя методику STR-анализа, позволяющего идентифицировать 19 полиморфных STR-маркеров, расположенных на разных аллелях. Использование способа позволит производителям БМКП проходить процедуру государственной регистрации препаратов.

**Ключевые слова:** биомедицинский клеточный препарат, мезенхимальные стромальные стволовые клетки, идентичность (подлинность) клеточной линии, STR-анализ.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Дружинина С.С., e-mail: kss1993@bk.ru

**Для цитирования:** Дружинина С.С., Логинова М.А., Смирнова Д.Н., Обухов И.П., Ярошенко К.О., Попонина Е.А., Назарова Е.Л., Исаева Н.В., Парамонов И.В. Алгоритм определения подлинности биомедицинских клеточных препаратов, содержащих мезенхимальные стволовые клетки. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(1):88–95. doi: 10.18699/SSMJ20230109

## Algorithm for determining the authenticity of biomedical cell preparations containing mesenchymal stem cells

S.S. Druzhinina<sup>1</sup>, M.A. Loginova<sup>1,2</sup>, D.N. Smirnova<sup>1</sup>, I.P. Obukhov<sup>1</sup>, K.O. Yaroshenko<sup>1</sup>, E.A. Poponina<sup>1</sup>, E.L. Nazarova<sup>1</sup>, N.V. Isaeva<sup>1</sup>, I.V. Paramonov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of FMBA of Russia  
610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72

<sup>2</sup>Vyatka State University

610000, Kirov, Moskovskaya str., 36

### Abstract

The use of mesenchymal stem cells (MSCs), which have a pronounced immunomodulatory activity, is a promising direction in the development of biomedical cell preparations (BMCPs). In oncohematology, the use of BMCPs containing MSCs is aimed at supporting hematopoiesis during cotransplantation with hematopoietic stem cells (HSCs) and suppressing immune conflicts during allogeneic unrelated transplantation and severe autoimmune processes. An obligatory stage of registration of BMCPs is confirmation of the identity of the MSC cell line (CL), which includes the establishment of morphological characteristics, evaluation of the expression of specific markers and proteins, and confirmation of the genetic stability of CL during cultivation. Determination of markers of genetic stability is possible using various methods, however, according to the recommendations of the American National Standardization Institute, the standard is the analysis of short tandem repeats (STR analysis). The purpose of the study is to develop an algorithm for determining the authenticity of BMCPs containing MSCs, including STR analysis. **Material and methods.** Identification of MSC cells in BMCP was performed according to the criteria of the International Society for Cell Therapy. Viable cells were counted in a Goryaev chamber. Immunophenotypic characteristics of MSCs were determined by flow cytometry. The level of production of specific proteins was assessed using enzyme immunoassay. Genetic stability markers were identified by STR analysis. **Results and discussion.** The methods were tested in triplicate for ten BMCP samples to confirm the reproducibility and reliability of the results. The developed algorithm for determining the authenticity of BMCP has a high accuracy, as it includes the STR analysis technique, which makes it possible to identify 19 polymorphic STR markers located on different alleles. Using the method will allow BMCP manufacturers to go through the procedure of state registration of drugs.

**Key words:** biomedical cell preparation, mesenchymal stromal stem cells, cell line identity (authenticity), STR analysis.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Correspondence author:** Druzhinina S.S., e-mail: kss1993@bk.ru

**Citation:** Druzhinina S.S., Loginova M.A., Smirnova D.N., Obukhov I.P., Yaroshenko K.O., Poponina E.A., Nazarova E.L., Isaeva N.V., Paramonov I.V. Algorithm for determining the authenticity of biomedical cell preparations containing mesenchymal stem cells. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(1):88–95. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230109

### Введение

На сегодняшний день одним из наиболее эффективных методов лечения онкогематологических заболеваний является высокодозная химиотерапия с последующей трансплантацией аллогенных ГСК [1]. Несмотря на стремительное развитие технологий HLA-типирования (HLA, human leukocyte antigens), позволяющих подбирать гистосовместимого донора, что является важнейшим фактором приживления трансплантата, частота развития посттрансплантационных осложнений остается крайне высокой: 30–50 % после родственной трансплантации аллогенных ГСК и 60–80 % после неродственной. Медика-

ментозная профилактика и лечение осложнений эффективны лишь в 50 % наблюдений [2]. Инновационным подходом к решению этой проблемы может стать применение клеточной терапии, а именно использование биомедицинских клеточных препаратов (БМКП), содержащих мезенхимальные стромальные стволовые клетки (МСК) доноров костного мозга.

Несмотря на то что исследования по получению и применению МСК в сфере трансплантологии и онкогематологии ведутся на протяжении длительного времени, в настоящее время в Российской Федерации не зарегистрирован ни один препарат, содержащий МСК. При производстве и государственной регистрации БМКП, содержа-

ских МСК, в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения № 14н от 31.01.2017 «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт» в спецификацию на препарат должны быть включены сведения об идентичности (подлинности) клеточной линии, входящей в его состав [3]. На сегодняшний день в России отсутствует практический опыт проведения процедуры подтверждения подлинности клеточных линий, которая также является востребованной при создании банков и реестров клеток [4].

Наиболее вариабельной методикой определения подлинности клеточных линий, входящих в состав БМКП, является выявление маркеров генетической стабильности. Для аутентификации клеток возможно применение таких методов, как кариотипирование, изоферментный анализ, иммунофенотипирование, молекулярно-генетические методы (HLA-типирование, построение генного профиля, анализ экспрессии микроРНК, анализ эпигенетического профиля, ДНК-фингерпринтинг) [5, 6].

Рабочей группой по биологическим лекарственным препаратам Европейского агентства по лекарственным средствам установлено, что использование только проточной цитометрии считается недостаточным для доказательства подлинности препарата. Рекомендованная ВОЗ методика, включающая в себя этап HLA-типирования, является легко воспроизводимой, но недостаточно точной, так как позволяет определять группу генетических маркеров, локализованных лишь на одной хромосоме [7]. Методика, использующая определение однонуклеотидных полиморфизмов (SNP-анализ), имеет низкую информативность в расчете на локус из-за использования биаллельных маркеров [8]. Методика, рекомендованная рабочей группой Европейского агентства по лекарственным средствам, основанная на определении полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, требует относительно большого количества ДНК (> 25 нг), не подверженной фрагментации, что в ряде случаев является труднодостижимым [9].

Метод коротких tandemных повторов (STR-анализ, short tandem repeat analysis) – один из наиболее качественных, чувствительных и точных методов оценки генома, признанный эталоном анализа подлинности клеточной линии, позволяет выявлять 19 полиморфных STR-маркеров и локус амелогенина человека, что соответствует международным стандартам молекулярно-генетической идентификации [10].

Цель исследования – разработать алгоритм определения подлинности биомедицинских клеточных препаратов, содержащих МСК доноров

костного мозга, включающий в себя метод STR-анализа.

## **Материал и методы**

В качестве источника МСК использовали образцы костного мозга, полученные при миелоэкспузии у десяти доноров. Выделение миелокариоцитов выполнено путем разделения образца на фракции методом центрифугирования на градиенте плотности (условия:  $\rho = 1,077$ , 1500 об/мин, 10–15 мин, температура  $22 \pm 1$  °C). МСК культивировали в среде  $\alpha$ MEM (StemCells, Канада), содержащей богатую тромбоцитами плазму (4 %), гепарин (Sigma, США, 2 Ед/мл), L-глутамин 2 мМ (StemCells, Канада), в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5 % CO<sub>2</sub>, температура 37 °C). После того, как формировался конфлюэнтный монослой, клетки обрабатывали 0,25%-м раствором трипсина.

МСК в препаратах БМКП идентифицировали по наличию иммунологических маркеров и адгезии к пластику веретенных клеток. Для определения жизнеспособности клеток производили их окрашивание трипановым синим красителем и подсчитывали неокрашенные клетки в камере Горяева. Наличие иммунологических маркеров определяли методом проточной цитометрии с использованием набора реагентов «Human MSC Analysis Kit» (BD Biosciences, США). Результаты реакции оценивали на лазерном проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II (BD Biosciences) с использованием программного обеспечения BD FACS Diva версии 6,0. По результатам анализа делали выводы о наличии или отсутствии примеси ГСК, стабильности иммунофенотипа МСК в процессе культивирования.

Для оценки жизнеспособности и иммуномодулирующих свойств культуры МСК анализировали продукцию цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-12, фактора некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ) и трансформирующего фактора роста бета (TGF  $\beta$ )) в супернатантах культур МСК методом твердофазного ИФА с использованием наборов реагентов АО «Вектор-Бест» (Новосибирск) и Thermo Fisher Scientific (США) на анализаторе Tecan (TECAN, Австрия).

Для выявления маркеров генетической стабильности из препаратов МСК методом колоночной фильтрации с помощью наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAgen GmbH, Германия) выделяли геномную ДНК. Концентрацию препаратов ДНК определяли спектрофотометрически на приборе TECAN Infinite 200 (TECAN). Для минимизации рисков ингибирования реакции амплификации остаточными количествами гепарина, добавляемого в среду для культивирования

Таблица 1. Сводная информация об анализируемых STR-локусах

Table 1. Summary of analyzed STR loci

Маркер	Референс-ный номер GenBank®	Референс-ный аллель GenBank®	Хромосомная локализация	Характеристика локуса
D3S1358	NT_005997	18	3p21.31	Локусы стандартной панели CODIS
D5S818	AC008512	11	5q23.2	
D7S820	AC004848	13	7q21.11	
D8S1179	AF216671	13	8q24.13	
D13S317	AL353628	11	13q31.1	
D16S539	AC024591	11	16q24.1	
D18S51	AP001534	18	18q21.33	
D21S11	AP000433	29	21q21.1	
CSF1PO	X14720	12	5q33.1	
FGA	M64982	21	4q31.3	
TH01	D00269	9	11p15.5	
TPOX	M68651	11	2p25.3	
VWA	M25858	18	12p13.31	
D1S1656	NC_000001.9	17	1q42	Локусы, рекомендованные ENFSI для расширения европейских национальных баз данных
D2S441	AL079112	12	2p14	
D10S1248	AL391869	13	10q26.3	
D12S391	G08921	19.3	12p13.2	
D22S1045	AL022314	17	22q12.3	
SE33	V00481	26.2	6q14	Наиболее полиморфный из известных STR-маркеров
Амелогенин X	M55418	X	Xp22.1-22.3	Продукты амплификации для хромосом X и Y различаются по длине
Амелогенин Y	M55419	Y	Yp11.2	

**Примечание:** CODIS – Combined DNA Index System, система комбинированного индекса ДНК; ENFSI – The European Network of Forensic Science Institutes, европейская сеть институтов криминалистики.

МСК, использовали разведение препарата ДНК деионизированной водой с учетом оптимального количества вносимого в реакцию ДНК (0,5 нг при объеме не более 20 мкл).

Аутентификацию клеточных линий выполняли методом мультиплексной амплификации 19 полиморфных STR-маркеров и локуса амелогенина человека, указанных в табл. 1, с использованием наборов COrDIS Plus («ГОРДИЗ», Россия).

По завершении амплификации проводили капиллярный электрофорез на генетическом анализаторе 3500xl (Thermo Fisher Scientific). Полученные данные оценивали с использованием программного обеспечения GeneMapper ID (Thermo Fisher Scientific).

## Результаты

Определение подлинности БМКП, содержащих МСК, осуществляли путем выполнения включенных в алгоритм аналитических методик. Во всех БМКП были идентифицированы МСК: клетки имели иммунологические маркеры, вер-

теновидную форму и адгезировались к пластику. Жизнеспособность МСК в течение всего срока наблюдения установлена на уровне 90 % и более. Иммунологическая характеристика клеток и остаточное содержание ГСК – одни из наиболее значимых показателей качества культуры МСК. При анализе иммунофенотипа отмечена экспрессия в высокой степени (более 60 %) таких маркеров, как CD90, CD73, CD44, CD105 (табл. 2).

Оценка популяции клеток первичного посева показала, что примесь ГСК составляет  $3,5 \pm 1,8$  % от общего количества клеток, к концу первого пассажа данный показатель снизился до 0,5–1 %. Также выявлено снижение экспрессии антигенов гистосовместимости HLA класса II к пассажам 2 и 3. При анализе результатов цитометрии продукта культивирования подтверждается однородность полученной клеточной популяции – наличие одной фракции однотипных клеток.

Иммуномодулирующие свойства культуры МСК оценивали по продукции цитокинов, представленной в табл. 3 в виде минимума, максимума и медианы.

**Таблица 2. Иммунофенотипическая характеристика образцов МСК**

**Table 2. Immunophenotypic characteristics of MSC samples**

Иммунологический маркер	Номер пассажа			
	Первичный посев (n = 10)	P1 (n = 10)	P2 (n = 10)	P3 (n = 10)
CD90	85,4 ± 14,5	85,1 ± 14,3	74,5 ± 20,8	88,3 ± 13,7
CD105	70,6 ± 4,8	78,9 ± 13,1	77,2 ± 6,4	71,0 ± 4,6
CD73	85,3 ± 12,9	83,7 ± 13,2	66,1 ± 25,1	78,7 ± 12,7
CD44	86,3 ± 14,0	86,5 ± 9,6	61,6 ± 20,5	77,4 ± 15,6
CD34	4,0 ± 3,7	1,9 ± 0,9	1,1 ± 0,6	1,1 ± 0,5
CD45	5,2 ± 4,4	0	0	0,3 ± 0,1
CD31	0	6,3 ± 5,3	0,7 ± 0,3	0
CD54	14,3 ± 1,1	10,9 ± 6,6	2,6 ± 2,2	0
CD117	0	2,6 ± 2,3	0,2 ± 0,1	0
CD133	1,1 ± 1,0	3,8 ± 2,8	0,2 ± 0,2	0,8 ± 0,1
HLA-DR	10,9 ± 7,8	4,9 ± 2,6	4,9 ± 4,6	5,9 ± 5,8

Основными белками, синтезируемыми МСК, являются ИЛ-6 (не менее 82,19 пг/мл/сут) и TGFβ (не менее 4,76 пг/мл/сут). Их продукция оставалась на стабильном уровне на протяжении всех этапов культивирования. Различия указанных показателей на пассажах P0–P3 статистически недостоверны ( $p > 0,05$ , критерий Фридмана). Синтез остальных изученных цитокинов был ниже, однако в процессе культивирования значимых различий данных параметров не наблюдали ( $p > 0,05$ ).

В ходе проведения STR-анализа установлено полное соответствие генетических профилей, определенных в образцах ДНК, полученных из препаратов МСК до культивирования и на каждом из трех этапов пассирования клеток. Экспериментально полученные STR-профили образца D1 в нативном препарате МСК (D1P0) и после

1-го, 2-го и 3-го пассажа (D1P1- D1P3) приведены в табл. 4.

В ходе исследования установлена полная идентичность STR-профилей референсных образцов и соответствующих им образцов БМКП, полученных на этапах многократного пассирования клеточных культур, что свидетельствует о сохранении генетической стабильности в процессе культивирования. Методики, входящие в алгоритм определения подлинности БМКП, апробированы в трех повторностях для десяти образцов БМКП с целью подтверждения воспроизводимости и достоверности получаемых результатов.

### Заклучение

Алгоритм, состоящий из трех аналитических методик, позволяет получить все результаты, необходимые для подтверждения подлинности

**Таблица 3. Продукция цитокинов МСК доноров, пг/мл/сут**

**Table 3. Production of cytokines by donor MSCs, pg/ml/day**

Содержание цитокина	Номер пассажа			
	Первичный посев (n = 10)	P1 (n = 10)	P2 (n = 10)	P3 (n = 10)
ИЛ-1β	0,57–0,83 (0,72)	0,51–0,95 (0,68)	0,59–1,07 (0,83)	0,57–1,01 (0,66)
ИЛ-2	0,37–0,70 (0,41)	0,26–1,79 (0,37)	0,22–2,47 (0,81)	0,29–1,59 (0,70)
ИЛ-6	82,19–233,25 (140,03)	124,85–240,46 (169,65)	126,39–233,95 (169,98)	123,93–168,52 (143,22)
ИЛ-12	0,09–0,55 (0,39)	0,08–0,78 (0,52)	0,11–0,75 (0,44)	0,12–0,55 (0,38)
ФНОα	0,14–0,55 (0,25)	0,05–0,21 (0,09)	0,04–0,29 (0,16)	0,03–0,18 (0,12)
TGFβ	5,76–19,59 (12,61)	4,76–28,91 (10,62)	5,26–18,11 (14,37)	6,26–17,01 (12,61)

**Таблица 4.** Генетический STR-профиль образца D1 в нативном препарате МСК и после пассирования клеток в процессе культивирования

**Table 4.** Genetic STR profile of the D1 sample in the native MSC preparation and after cell passaging during cultivation

Маркер	Образец D1			
	Эксперимент № 1 (D1P0)		Эксперименты № 2–4 (D1P1–D1P3)	
	Аллель 1	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 2
AMEL	X	Y	X	Y
CSF1PO	10	12	10	12
D10S1248	14	16	14	16
D12S391	18.3	20	18.3	20
D13S317	8	9	8	9
D16S539	12		12	
D18S51	13		13	
D1S1656	17.3	18.3	17.3	18.3
D21S11	31	32.2	31	32.2
D22S1045	15	16	15	16
D2S441	11		11	
D3S1358	16		16	
D5S818	11	12	11	12
D7S820	11	12	11	12
D8S1179	13	16	13	16
FGA	19	26	19	26
SE33	23.2	28.2	23.2	28.2
TH01	9.3		9.3	
TPOX	8	11	8	11
vWA	14	15	14	15

МСК, удовлетворяющие требованиям Приказа Минздрава России от 19.01.2017 № 14н «Об утверждении формы спецификации на биомедицинский клеточный продукт», поэтому может стать частью технологического регламента производства и способствовать прохождению доклинических испытаний и регистрации БМКП. Используемый в качестве метода подтверждения генетической стабильности STR-анализ, позволяющий анализировать 19 полиморфных STR-маркеров, расположенных на разных хромосомах, повышает точность алгоритма, а применение во всех методиках стандартизованных реагентов и автоматического анализа минимизирует риск субъективных ошибок.

### Список литературы

1. Звонков Е.Е., Королева Д.А., Габеева Н.Г., Гаврилина О.А., Федорова С.Ю., Губкин А.В., Ковригина А.М., Яцык Г.А., Клясова Г.А., Савенко Т.А., Савченко В.Г. Высокодозная химиотерапия первичной диффузной В-крупноклеточной лимфомы центральной нервной системы. Промежуточные результаты протокола CNS-2015. *Гематол. и трансфузиол.* 2019;64(4): 447–461. doi:10.35754/0234-5730-2019-64-4-447-461
2. Реакция «трансплантат против хозяина». Режим доступа: <https://www.podari-zhizn.ru/main/node/7769> (дата обращения: 05/06/2022)
3. Приказ Минздрава России от 19.01.2017 № 14н «Об утверждении формы спецификации на

биомедицинский клеточный продукт». Режим доступа: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_212714/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_212714/)

4. Мельникова Е.В., Рачинская О.А., Трусов Г.А., Хорольский М.Д., Семенова И.С., Терешкина Н.В., Меркулов В.А. Обоснование методических подходов к экспертной оценке подлинности биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(1):28–38. doi: 10.30895/2221-996X-2019-19-1-28-38

5. SME Workshop on CMC of Biological Medicinal Products. EMA London. CMC ISSUES for Cell Based ATMP. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-sme-workshop-cmc-biological-medicinal-products-margarida-menezes-ferreira\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-sme-workshop-cmc-biological-medicinal-products-margarida-menezes-ferreira_en.pdf)

6. Q5D Quality of Biotechnological/Biological Products: Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q5d-quality-biotechnologicalbiological-products-derivation-and-characterization-cell-substrates-used>

7. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks (WHO/BS/10.2132). Available at: <https://gxp-academy.org/upload/iblock/8df/8df32e5342a440d38ed3e5b0fbec42ca.pdf>

8. Однонуклеотидные полиморфизмы в судебной генетике: методы детекции SNP Available at: <https://testgen.ru/ru/nauchnyie-issledovaniya/stati-i-spravochnye-materialy/odnonukleotidnye-polimorfizmy-v-sudebnoy-genetike-metody-detektsii-snp/>

9. SME Workshop on CMC of Biological Medicinal Products. EMA London 14–16.04.2015. CMC ISSUES for Cell Based ATMP. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Presentation/2015/05/WC500187353.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2015/05/WC500187353.pdf)

10. American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002. Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat. Rev. Cancer*. 2010;10(6):441–448. doi: 10.1038/nrc2852/

## References

1. Zvonkov E.E., Koroleva D.A., Gabeeva N.G., Gavrulina O.A., Fedorova S.Yu., Gubkin A.V., Kovrigina A.M., Yatsyk G.A., Klyasova G.A., Savenko T.A., Savchenko V.G. High-dose chemotherapy for primary diffuse large  $\beta$ -cell lymphoma of the central nervous system. interim results of the CNS-2015 protocol. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology*. 2019;64(4): 447–461. [In Russian]. doi: 10.35754/0234-5730-2019-64-4-447-461

2. Graft-versus-host reaction. [In Russian]. Available at: <https://www.podari-zhizn.ru/main/node/7769> (date of access: 05/06/2022).

3. Order of Minzdrav of Russia dated January 19, 2017 No 14n “On approval of the specification form for a biomedical cell product”. [In Russian]. Available at: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_212714/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_212714/)

4. Melnikova E.V., Rachinskaya O.A., Trusov G.A., Khorolsky M.D., Semenova I.S., Tereshkina N.V., Merkulov V.A. Justification of methodological approaches to identification testing of biomedical cell products. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(1):28–38. [In Russian]. doi: 10.30895/2221-996X-2019-19-1-28-38

5. SME Workshop on CMC of Biological Medicinal Products. EMA London. CMC ISSUES for Cell Based ATMP. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-sme-workshop-cmc-biological-medicinal-products-margarida-menezes-ferreira\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-sme-workshop-cmc-biological-medicinal-products-margarida-menezes-ferreira_en.pdf)

6. Q5D Quality of Biotechnological/Biological Products: Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q5d-quality-biotechnologicalbiological-products-derivation-and-characterization-cell-substrates-used>

7. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks (WHO/BS/10.2132). Available at: <https://gxp-academy.org/upload/iblock/8df/8df32e5342a440d38ed3e5b0fbec42ca.pdf>

8. Single nucleotide polymorphisms in forensic genetics: SNP detection methods. [In Russian]. Available at: <https://testgen.ru/ru/nauchnyie-issledovaniya/stati-i-spravochnye-materialy/odnonukleotidnye-polimorfizmy-v-sudebnoy-genetike-metody-detektsii-snp/> [In Russian].

9. SME Workshop on CMC of Biological Medicinal Products. EMA London 14–16.04.2015. CMC ISSUES for Cell Based ATMP. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Presentation/2015/05/WC500187353.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2015/05/WC500187353.pdf)

10. American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002. Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat. Rev. Cancer*. 2010;10(6):441–448. doi: 10.1038/nrc2852/

**Сведения об авторах:**

**Светлана Сергеевна Дружинина**, ORCID: 0000-0002-2371-4044, e-mail: kss1993@bk.ru  
**Мария Александровна Логинова**, д.б.н., ORCID: 0000-0001-7088-3986, e-mail: loginova@niigpk.ru  
**Дарья Николаевна Смирнова**, к.б.н., ORCID: 0000-0002-0090-1891, e-mail: smirnovadn@niigpk.ru  
**Иван Павлович Обухов**, ORCID: 0000-0001-8782-6419, e-mail: van-obukhov@yandex.ru  
**Кристина Олеговна Ярошенко**, ORCID: 0000-0001-8117-1327, e-mail: repnitsina@niigpk.ru  
**Елена Александровна Попонина**, к.м.н., ORCID: 0000-0003-4941-1735, e-mail: poponinaea@niigpk.ru  
**Елена Львовна Назарова**, к.м.н., ORCID: 0000-0003-2010-8679, e-mail: nazarova@niigpk.ru  
**Наталья Васильевна Исаева**, к.б.н., ORCID: 0000-0001-9766-5137, e-mail: isaevanatalia@yandex.ru  
**Игорь Владимирович Парамонов**, д.м.н., ORCID: 0000-0002-7205-912X, e-mail: paramonov@niigpk.ru

**Information about the authors:**

**Svetlana S. Druzhinina**, ORCID: 0000-0002-2371-4044, e-mail: kss1993@bk.ru  
**Maria A. Loginova**, doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0001-7088-3986, e-mail: loginova@niigpk.ru  
**Daria N. Smirnova**, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-0090-1891, e-mail: smirnovadn@niigpk.ru  
**Ivan P. Obukhov**, ORCID: 0000-0001-8782-6419, e-mail: van-obukhov@yandex.ru  
**Kristina O. Yaroshenko**, ORCID: 0000-0001-8117-1327, e-mail: repnitsina@niigpk.ru  
**Elena A. Poponina**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-4941-1735, e-mail: poponinaea@niigpk.ru  
**Elena L. Nazarova**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-2010-8679, e-mail: nazarova@niigpk.ru  
**Natalya V. Isaeva**, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0001-9766-5137, e-mail: isaevanatalia@yandex.ru  
**Igor V. Paramonov**, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-7205-912X, e-mail: paramonov@niigpk.ru

*Поступила в редакцию 10.10.2022*

*После доработки 18.11.2022*

*Принята к публикации 13.01.2023*

*Received 10.10.2022*

*Revision received 18.11.2022*

*Accepted 13.01.2023*

## Диастолический стресс-тест в оценке функционального состояния постинфарктного миокарда

А.М. Воробьев<sup>1,2</sup>, В.И. Рузов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ульяновский государственный университет

432017, г. Ульяновск, ул. Кузнецова, 26

<sup>2</sup> Центральная городская клиническая больница г. Ульяновска

432057, г. Ульяновск, ул. Оренбургская, 27

### Резюме

Учитывая противоречивые данные литературы и неоднозначность интерпретации параметров диастолической функции сердца у больных с ишемической болезнью сердца, нами проведено исследование диастолической функции сердца у пациентов после перенесенного инфаркта миокарда на амбулаторно-поликлиническом этапе реабилитации. Цель исследования – изучить диагностическую информативность и целесообразность проведения диастолического стресс-теста для оценки функционального состояния постинфарктного миокарда. **Материал и методы.** Обследовано 86 пациентов на амбулаторно-поликлиническом этапе реабилитации через 6 недель после перенесенного инфаркта миокарда со стентированием коронарных артерий ad hoc. Контрольную группу составили 10 здоровых добровольцев. Структурно-функциональное исследование сердца проводилось в покое и сразу после физической нагрузки с помощью стресс-эхокардиографии. **Результаты и их обсуждение.** Пациенты после инфаркта миокарда имеют больший, чем лица контрольной группы, объем индексированного объема левого предсердия (соответственно  $30,71 \pm 8,88$  и  $20,49 \pm 4,04$  мл/м<sup>2</sup>) и отношение E/e' (соответственно  $8,45 \pm 3,27$  и  $6,46 \pm 1,42$ ). У 38 больных (62,3 %) с нормальной фракцией выброса (ФВ) левого желудочка (ЛЖ) диастолическая функция ЛЖ не была нарушена, 19 (31,1 %) и 2 (3,3 %) пациента имели диастолическую дисфункцию 1 и 2 типа соответственно, 2 (3,3 %) человека – неопределенный результат. У лиц со сниженной ФВ ЛЖ достоверно меньше усредненная скорость раннего диастолического движения кольца митрального клапана. Проведенный стресс-тест выявил значимое постнагрузочное повышение E/e' лишь у одного пациента (с 8,92 до 18,37), который также имел исходно сниженную ФВ (32 %). Стресс-тест не показал достоверных изменений диастолических параметров сердца после нагрузки у пациентов с сохранной ФВ ЛЖ, что может указывать на относительно хорошие диастолические резервы сердца. **Заключение.** Перенесенный инфаркт миокарда сопровождается наличием диастолической дисфункции ЛЖ у 53,5 % пациентов на 6-й неделе реабилитационного периода. Диастолический стресс-тест сопровождается редкой встречаемостью стресс-индуцированной диастолической дисфункции (4 %) у пациентов со сниженной ФВ ЛЖ после инфаркта миокарда.

**Ключевые слова:** диастолическая дисфункция, постинфарктное состояние, диастолический стресс-тест.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Воробьев А.М., e-mail: kreed73@yandex.ru

**Для цитирования:** Воробьев А.М., Рузов В.И. Диастолический стресс-тест в оценке функционального состояния постинфарктного миокарда. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2023;43(1):96–103. doi: 10.18699/SSMJ20230110

## Diastolic stress test in assessing functional state of postinfarction myocardium

A.M. Vorobev<sup>1,2</sup>, V.I. Ruzov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ulyanovsk State University

432017, Ulyanovsk, Kuznetsova str., 26

<sup>2</sup> Central City Clinical Hospital of Ulyanovsk

432057, Ulyanovsk, Orenburgskaya str., 27

### Abstract

Taking into account the conflicting literature data and the ambiguity in the interpretation of parameters of diastolic heart function in patients with coronary heart disease, we conducted an analysis of diastolic heart function in patients after myocardial infarction at the outpatient rehabilitation stage. Aim of the study was to investigate the diagnostic information content and the feasibility of diastolic stress testing to assess the functional condition of postinfarction myocardium.

**Material and methods.** 86 patients were examined at the outpatient stage of rehabilitation 6 weeks after myocardial infarction with coronary artery stenting ad hoc. The control group consisted of 10 healthy volunteers. Structural and functional examination of the heart was performed at rest and immediately after exercise using stress echocardiography.

**Results and discussion.** Patients after myocardial infarction have a larger indexed volume of the left atrium ( $30.71 \pm 8.88$  vs.  $20.49 \pm 4.04$  ml/m<sup>2</sup>) and an E/e' ratio ( $8.45 \pm 3.27$  vs.  $6.46 \pm 1.42$ ) in comparison with the control group. 38 (62.3 %) patients with normal left ventricular (LV) ejection fraction (EF) had unimpaired LV diastolic function, 19 (31.1 %) and 2 (3.3 %) patients had type 1 and type 2 diastolic dysfunction, respectively, 2 patients (3.3 %) had an indeterminate result. Patients with reduced LV EF have a significantly lower early diastolic mitral annular velocity (e'). The diastolic stress test revealed a significant post-exercise increase in E/e' in only one patient (from 8.92 to 18.37), who also had an initially reduced EF (32 %). The stress test showed no significant changes in diastolic heart parameters after exercise in patients suffering from heart failure with preserved EF, which may indicate relatively good diastolic reserves of the heart. **Conclusions.** Myocardial infarction is accompanied by the presence of LV diastolic dysfunction in 53,5 % of the patients at the 6th week of the rehabilitation period. The diastolic stress test is accompanied by a rare occurrence of stress-induced diastolic dysfunction (4 %) in patients with reduced LV EF after myocardial infarction.

**Key words:** diastolic dysfunction, post-infarction condition, diastolic stress test.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Correspondence author:** Vorobev A.M., e-mail: kreed73@yandex.ru

**Citation:** Vorobev A.M., Ruzov V.I. Diastolic stress test in assessing functional state of postinfarction myocardium. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(1):96–103. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230110

### Введение

На сегодняшний день нарушение диастолической функции (ДД), основной причиной которой является ишемическая болезнь сердца (ИБС), можно считать общепризнанным фактом [1]. ДД ассоциирована с нарушением раннего диастолического расслабления при острой или хронической ишемии, повышением жесткостных характеристик миокарда в месте постинфарктного рубца и наличия соединительной ткани [2]. В ряде классических работ, посвященных изучению ДД, показано, что ее формирование предполагается у всех пациентов с ИБС [3–5], как у лиц без перенесенного инфаркта миокарда (ИМ), так и при наличии постинфарктного кардиосклероза, вследствие острой ишемии при коронарной ок-

клюзии, нагрузке и чрескожной транслюминальной ангиопластике [6]. В то же время в литературе описывается наличие нормальной диастолической функции у пациентов даже с перенесенным острым ИМ [7].

Есть множество параметров для анализа ДД, однако в настоящее время существуют международные рекомендации, регламентирующие основные правила диагностики. В 2016 г. Американское общество эхокардиографии совместно с Европейской ассоциацией кардиовизуализации опубликовало рекомендации по диагностике ДД, в которых представлены два алгоритма по верификации ДД в зависимости от выраженности систолической дисфункции ЛЖ [8]. В литературе отмечено, что около 25 % здоровых лиц старше 40

лет могут иметь ДД 1 типа, что ставит под сомнение целесообразность диагностики дисфункции, которая столь часто встречается в норме [9]. Таким образом, до настоящего времени диагностика ДД ЛЖ у пациентов с ИБС является трудной задачей, однозначные жесткие критерии для того или иного типа в настоящий момент точно не определены и часто остаются на усмотрение врача в каждой конкретной ситуации. Поэтому все большее значение уделяется использованию диастолического стресс-теста [10].

Известно, что у части больных сердечной недостаточностью диастолическое давление в ЛЖ в состоянии покоя не изменено, но увеличивается после нагрузки. У здоровых людей диастолическое давление при физической нагрузке (ФН) остается в пределах нормы, в частности, вследствие лучшей релаксации миокарда. Поэтому нормальное давление наполнения в состоянии покоя не исключает клинически значимой ДД у больных с сердечной недостаточностью с сохранной ФВ ЛЖ (СНсФВ) [11]. Следовательно, при сохранной ФВ ЛЖ, небедительных показателях ДД и сомнительных признаках сердечной недостаточности в покое выполняется стресс-эхокардиография для подтверждения ДД, возникающей при нагрузке [12]. Стандартными эхокардиографическими показателями, используемыми при стресс-тестах, являются соотношение  $E/e'$  и пиковая скорость трикуспидальной регургитации, дополнительными – продольная деформация (систолическая функция), ударный объем и изменение сердечного выброса при нагрузке [13]. Поскольку тест изначально не предполагает выявление ишемии, он может выполняться на небольших степенях нагрузки. Но чаще применяется стресс-эхокардиография до достижения субмаксимальной возрастной частоты [13].

Учитывая противоречивые данные литературы и неоднозначность интерпретации параметров диастолической функции сердца у больных ИБС, мы провели исследование данного параметра у пациентов после перенесенного ИМ на амбулаторно-поликлиническом этапе реабилитации. Цель исследования – изучить диагностическую информативность и целесообразность проведения диастолического стресс-теста для оценки функционального состояния постинфарктного миокарда.

## Материал и методы

Обследовано 86 пациентов на амбулаторно-поликлиническом этапе реабилитации через 6 недель после перенесенного ИМ со стентированием коронарных артерий ad hoc. Клинико-демо-

графическая характеристика больных представлена в табл. 1.

В контрольную группу вошли 10 добровольцев без соматической патологии, их возраст составил  $51,4 \pm 2,4$  года. Исходно в контрольную группу планировалось включить 30 человек, однако в ходе предварительного исследования у 20 (66,6 %) были обнаружены такие состояния, как гипертоническая болезнь, в том числе с поражением органов-мишеней и клинически-ассоциированными состояниями (гипертрофия ЛЖ, хроническая болезнь почек, атеросклероз периферических артерий), хроническая обструктивная болезнь легких, преддиабет и сахарный диабет 2 типа, ожирение 2–3 степеней. Данные лица были исключены из исследования для формирования однородной группы здоровых добровольцев, соотносимых по возрасту и антропометрическим характеристикам с пациентами после ИМ.

Критерии включения в исследование: нахождение на амбулаторно-поликлиническом этапе реабилитации ИМ с первичным стентированием коронарных артерий. Все пациенты подписывали информационное согласие на обследования. Критерии исключения: умеренная, выраженная недостаточность (стенозом) клапанов сердца, фибрилляция предсердий, тяжелые нарушения ритма и

**Таблица 1.** Клинико-демографическая характеристика пациентов после ИМ

**Table 1.** Clinical characteristics of patients after MI

Параметр	Значение
Возраст, лет	$56,2 \pm 9,3$
Пол, мужчин/женщин	61/25
Артериальная гипертензия, %	86,1
Сахарный диабет 2 типа, %	13,6
Сердечная недостаточность 1 ФК NYHA, %	60,0
Сердечная недостаточность 2 ФК NYHA, %	28,4
Сердечная недостаточность 3 ФК NYHA, %	11,6
Нормальная масса тела, %	20,9
Избыточная масса тела, %	41,9
Ожирение, %	37,2
ФВ > 50 %, %	70,9
ФВ < 50 %, %	29,1
ИМ с подъемом сегмента ST, %	89,5
ИМ без подъема сегмента ST, %	10,5
ИМ в бассейне передней нисходящей артерии, %	51,1
ИМ в бассейне правой коронарной артерии, %	33,7
ИМ в бассейне огибающей артерии, %	15,2

проводимости, острые заболевания и обострения хронических заболеваний, хроническая обструктивная болезнь легких, бронхиальная астма, анемия различного генеза, возраст более 75 лет.

Все пациенты находились на стандартной терапии после перенесенного ИМ согласно европейским рекомендациям по ведению пациентов с острым ИМ с подъемом сегмента ST (2017) и без подъема сегмента ST (2015). Структурно-функциональное исследование сердца проводилось в покое и сразу после ФН с помощью стресс-эхокардиографии на аппарате Xario SSA-660A (Toshiba, Япония). Определяли максимальную скорость раннего (E) и позднего (A) диастолического трансмитрального кровотока, усредненную скорость раннего диастолического движения кольца митрального клапана (e'), их соотношение (E/e'), время замедления кровотока (DT), время изоволюмического расслабления ПЖ (IVRT), скорость трикуспидальной регургитации ( $V_{TR}$ ). Тест с ФН выполняли на подвижной ленте по методике непрерывно возрастающих нагрузок на тредмиле Valiant 2 спет (Lode B.V., Нидерланды). Использовался модифицированный протокол Bruce со ступенчатым наращиванием нагрузки каждые 3 мин путем увеличения скорости и угла наклона движения ленты. Критериями оценки результатов пробы с субмаксимальной ФН были: частота сердечных сокращений 120 уд./мин или 70 % от максимума для данного возраста, появление ангинозного приступа или одышки, снижение сегмента ST на  $\geq 1$  мм, три и более последовательные желудочковые экстрасистолы (пароксизм неустойчивой желудочковой тахикардии).

Количественные показатели представлены данными среднего и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ), качественные – в виде доли (%) от общего числа больных по выборке или в соответствующей группе. Для сравнения показателей двух групп использовались тесты Вилкоксона и Манна – Уитни. В случае распределения, близкого

го к нормальному, для сравнения двух выборок использовали также критерий Стьюдента. Корреляционный анализ проводился с использованием ранговой корреляции Спирмена. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

В ходе исследования установлено, что пациенты после ИМ имеют больший объем индексированного объема левого предсердия (ИОЛП) и отношение E/e' в сравнении с контрольной группой (табл. 2). Пороговые значения уровня достоверности различий по E/e', очевидно, обусловлены относительно небольшой группой контроля. У больных была меньше усредненная скорость раннего диастолического движения кольца митрального клапана e', чем у лиц контрольной группы, что указывает на сниженную способность к диастолическому расслаблению ЛЖ у пациентов после ИМ.

Следует заметить, что 29,1 % пациентов ( $n = 25$ ) имели ФВ менее 50 %, 70,9 % ( $n = 61$ ) – более 50 %. Согласно международным рекомендациям 2016 г. по диагностике ДД [8], пациенты со сниженной ФВ ЛЖ имеют ее по умолчанию. Распределение по типам ДД было следующим: тип 1 – 20 человек (80,0 %), тип 2 – 2 (8,0 %), тип 3 – 3 (12,0 %). Диагностика ДД у пациентов с СНсФВ ЛЖ является более сложной задачей. Согласно данным литературы лица с патологическими типами гипертрофии ЛЖ имеют ДД как минимум 1 типа [8]. В рамках нашего исследования 21 пациент (34,4 %) с сохранной ФВ имел патологический тип ГЛЖ, из них 19 – 1 тип ДД, 2–2 тип. Изучение диастолической функции у пациентов с сохранной ФВ без ГЛЖ показало, что у 95,0 % (38 человек) она не была нарушена, 5,0 % (2 человека) имели неопределенный результат. Вероятно, это обусловлено своевременной реваскуляризацией инфаркт-связанной артерии и отсутствием выраженного ремоделирования ЛЖ

**Таблица 2.** Параметры, характеризующие диастолическую функцию ЛЖ у пациентов, перенесших ИМ, и лиц контрольной группы

**Table 2.** Parameters characterizing LV diastolic function in patients after MI and in the control group

Параметр	Пациенты после ИМ ( $n = 86$ )	Контрольная группа ( $n = 10$ )	$p$
ИОЛП, мл/м <sup>2</sup>	30,71 $\pm$ 8,88	20,49 $\pm$ 4,04	< 0,01
E/A	0,99 $\pm$ 0,42	1,02 $\pm$ 0,17	> 0,05
E, см/с	69,75 $\pm$ 18,06	76,87 $\pm$ 14,42	> 0,05
E/e'	8,45 $\pm$ 3,27	6,46 $\pm$ 1,42	0,054
e', см/с	8,80 $\pm$ 2,32	12,12 $\pm$ 1,93	< 0,01
DT, мс	185,80 $\pm$ 26,72	184,57 $\pm$ 17,48	> 0,05
IVRT, мс	84,42 $\pm$ 22,21	74,43 $\pm$ 4,98	> 0,05
$V_{TR}$ , м/с	2,09 $\pm$ 0,52	2,04 $\pm$ 0,35	> 0,05

**Таблица 3.** Параметры диастолической функции ЛЖ до и после нагрузки у пациентов после ИМ с сохранной и сниженной ФВ ЛЖ

**Table 3.** Parameters of LV diastolic function before and after exercise in post-MI patients with preserved and reduced LV EF

Параметр	Пациенты с ФВ > 50 % (n = 61)		Пациенты с ФВ < 50 % (n = 25)	
	До ФН	После ФН	До ФН	После ФН
ИОЛП, мл/м <sup>2</sup>	29,92 ± 8,82	–	32,66 ± 9,44	–
Е/А	0,98 ± 0,26	0,98 ± 0,24	1,02 ± 0,69	1,06 ± 0,64
Е, см/с	71,87 ± 16,84	77,88 ± 17,49	64,55 ± 21,21	73,23 ± 28,06
Е/е'	8,11 ± 2,30	8,54 ± 2,31	9,28 ± 5,05	10,33 ± 5,28
е', см/с	9,27 ± 2,27	9,49 ± 2,20	7,65 ± 2,10*	7,68 ± 2,35*
IVRT, мс	86,25 ± 23,42	80,44 ± 19,81	79,92 ± 20,07	77,00 ± 19,37
V <sub>TR</sub> , м/с	2,07 ± 0,55	2,34 ± 0,48	2,14 ± 0,51	2,28 ± 0,45

\* Отличие от величины соответствующего показателя пациентов с ФВ > 50 % статистически значимо при p < 0,05.

со значимым увеличением давления в ЛП у пациентов на амбулаторно-поликлиническом этапе реабилитации через 6 недель после ИМ.

Таким образом, согласно алгоритмам текущих клинических рекомендаций 38 пациентов с сохранной фракцией выброса ЛЖ (62,3 %) имели ненарушенную диастолическую функцию ЛЖ, 19 (31,1 %) – ДД 1 типа, 2 (3,3 %) – ДД 2 типа, 2 (3,3 %) – неопределенный результат. Учитывая существующую неопределенность в трактовке рекомендаций по оценке ДД у пациентов с ИМ, вызывает сомнение факт ее отсутствия у большинства пациентов с нормальной ФВ с верифицированной ИБС и постинфарктным кардиосклерозом в анамнезе.

В эпоху распространенности своевременной реперфузионной терапии большую часть пациентов после ИМ представляют пациенты с сохранной ФВ, поэтому существенный интерес представляет изучение различий в характеристике диастолической функции ЛЖ пациентов с ФВ > 50 % и с ФВ < 50 %. Как видно из табл. 3, в которой представлена их эхокардиографическая характеристика, пациенты со сниженной ФВ ЛЖ имеют достоверно меньшую усредненную ско-

рость раннего диастолического движения кольца митрального клапана, что согласуется с данными литературы [14], где показано что е' снижается у пациентов с систолической дисфункцией ЛЖ после ИМ, особенно если место инфаркта близко к точке измерения е'.

Таким образом, большинство пациентов после перенесенного ИМ после своевременной реваскуляризации имеют невыраженную ДД либо давление наполнения ЛЖ и давление в ЛП в рамках нормальных значений. В клинической практике в неопределенных случаях либо для выявления скрытой ДД проводится диастолический стресс-тест (ДСТ), представляющий собой разновидность трансторакальной стресс-эхокардиографии с дозированной ФН и позволяющий выявить признаки повышения среднего давления в ЛП во время нагрузки. Согласно недавним европейским рекомендациям по диагностике СНсФВ проведение ДСТ является важнейшим компонентом диагностического алгоритма СНсФВ [10].

На сегодняшний день доказана высокая воспроизводимость ДСТ, его корректность в отражении давления наполнения и высокая прогностическая значимость. Во время ДСТ динамику

**Таблица 4.** Параметры диастолической функции ЛЖ после ФН

**Table 4.** Parameters of LV diastolic function after exercise

Параметр	Пациенты (n = 86)		Контрольная группа (n = 10)	
	До ФН	После ФН	До ФН	После ФН
Е/А	0,99 ± 0,42	1,00 ± 0,39	1,02 ± 0,17	0,97 ± 0,17
Е, см/с	69,75 ± 18,3	76,54 ± 20,62	76,87 ± 14,42	77,94 ± 9,56
Е/е'	8,45 ± 3,31	9,06 ± 3,42	6,46 ± 1,42 <sup>#</sup>	6,26 ± 1,37*
е', см/с	8,80 ± 2,32	8,73 ± 2,69	12,12 ± 1,93*	12,80 ± 2,21*
DT, мс	185,80 ± 26,72	179,36 ± 27,13	184,57 ± 17,48	191,86 ± 24,12
IVRT, мс	84,42 ± 22,47	79,44 ± 19,31	74,43 ± 4,98	62,57 ± 6,82*
V <sub>TR</sub> , м/с	2,09 ± 0,52	2,32 ± 0,47	2,04 ± 0,35	2,30 ± 0,38

\* Отличие от величины соответствующего показателя лиц контрольной группы статистически значимо при p < 0,05; <sup>#</sup> – p = 0,054.

давления наполнения ЛЖ обычно оценивают по соотношению максимальных скоростей раннего диастолического трансмитрального кровотока и диастолического подъема основания ЛЖ в раннюю диастолу (соотношению  $E/e'$ ) [10]. На настоящий момент соотношение  $E/e'$  является лучшим неинвазивным способом оценки давления наполнения; в норме при нагрузке оно почти не изменяется, оставаясь в пределах от 6 до 8 [10]. Если же при нагрузке повышается давление наполнения, то параллельно этому повышается и соотношение  $E/e'$ , и если оно достигнет 15, то проба считается положительной. Показано, что соотношение  $E/e' \geq 15$  при ФН с очень высокой специфичностью позволяет выявить пациентов со сниженной переносимостью нагрузки и значительно улучшает точность диагностики СНсФВ [10].

Стресс-эхокардиография (табл. 4) у пациентов выявила большее давление наполнения ЛЖ ( $E/e'$ ), увеличенное время изоволюмического расслабления ЛЖ (IVRT) и меньшую среднюю скорость движения фиброзного кольца митрального клапана ( $e'$ ) по сравнению с контрольной группой. У контрольной группы ухудшения параметров диастолической функции до и после ФН не отмечалось. Наши данные подтверждаются результатами исследований ряда авторов, наблюдавших у здоровых лиц отсутствие изменений диастолического давления наполнения ЛЖ, что связано с большей эластичностью и лучшей релаксацией миокарда при ФН [15]. При нагрузке значительно повышается податливость ЛЖ, предположительно за счет цАМФ-зависимого фосфорилирования молекул титина [10], благодаря чему увеличивается «вместимость» желудочка, и он легко справляется с повышенной преднагрузкой. Способность сердца увеличивать объем своего наполнения при ФН без сопутствующего повышения давления наполнения называется диастолическим резервом.

Кроме того, у пациентов в нашем исследовании после ДСТ отмечалось увеличение максимальной скорости раннего наполнения ЛЖ ( $E$ ) ( $p = 0,07$ ), а учитывая отсутствие значимого уменьшения  $e'$  после нагрузки, можно предположить, что повышение  $E/e'$  связано в основном с увеличением давления в ЛП, но не со сниженной способностью к расслаблению ЛЖ. Подтверждает этот довод больший индексированный объем ЛП у пациентов по сравнению с контрольной группой (см. табл. 2).

Согласно данным литературы [10], критерием положительного ДСТ является доплеровское соотношение  $E/e' \geq 15$  на любой ступени нагрузки, однако точность диагностики СНсФВ существенно возрастает, если одновременно с этим максимальная скорость трикуспидальной регургита-

ции превышает 3,4 м/с. Исходно три пациента (3,5 %) имели соотношение  $E/e'$  более 15, которое после проведения нагрузочного теста значимо не изменилось, однако следует отметить, что все эти лица имели ФВ ЛЖ менее 40 %, следовательно, диагноз сердечной недостаточности со сниженной ФВ ЛЖ и ДД как минимум 1 типа не вызывал сомнений. ДСТ выявил значимое постнагрузочное повышение  $E/e'$  лишь у одного пациента (с 8,92 до 18,37), который также имел исходно сниженную ФВ (32 %), а причиной прекращения нагрузки было нарастание одышки на второй ступени теста. Согласно данным литературы у пациентов со сниженной ФВ  $E/e'$  хорошо коррелирует с инвазивно измеренным давлением заклинивания легочных капилляров (ДЗЛК) ( $r = 0,74$ ), однако эта связь ослабевает на высоте проведения ФН ( $r = 0,57$ ), и  $E/e'$  становится менее надежным маркером повышения давления наполнения при нагрузке [16]. В рамках нашего исследования лишь 11 % пациентов имели хроническую сердечную недостаточность 3-го функционального класса, у большинства из них ФВ ЛЖ была снижена.

В исследовании D.R. Talreja et al. предиктивная чувствительность неповышения  $E/e'$  более 15 при ФН относительно наличия нормального ДЗЛК составила около 89 % [17]. В другой работе постнагрузочное увеличение  $E/e'$  более 13 указывало на среднее диастолическое давление в ЛЖ более 15 мм рт. ст. с чувствительностью 67 % и специфичностью 95 % [18]. Однако M.T. Maeder et al., также изучавшие взаимосвязь инвазивно измеренного ДЗЛК и  $E/e'$  на высоте нагрузки, отмечают, что  $E/e'$  не является надежным маркером повышения ДЗЛК и не отражает в должной мере динамику изменения давления наполнения ЛЖ при нагрузке у пациентов с СНсФВ [19].

Согласно методическим рекомендациям ДСТ предлагается к применению в большей степени пациентам с подозрением на СНсФВ, нежели со систолической дисфункцией. Как видно из табл. 3, ДСТ не показал достоверных изменений параметров диастолической функции после ФН у больных с СНсФВ, что может указывать на относительно хорошие диастолические резервы сердца, которые обеспечивают адекватный ответ на ФН у данной когорты пациентов. Учитывая индивидуальные критерии положительного ДСТ (увеличение  $E/e'$  более 15), ни один из пациентов не имел положительного результата. Повышения максимальной скорости трикуспидальной регургитации более чем 3,4 м/с не наблюдалось ни у одного из пациентов в исследовании как исходно, так и после проведения нагрузочного тестирования.

Учитывая вышеприведенные данные, можно заключить, что клиническая целесообразность рутинного выполнения ДСТ для пациентов с СНсФВ 1–2 функциональных классов сомнительна. Для больных после ИМ ДСТ может быть полезен для выявления резидуальной ишемии и контроля уровня ФН, при котором возникает значимое нарастание давления наполнения ЛЖ, что может быть использовано с целью прогноза и оценки эффективности проводимой терапии.

Таким образом, проведение ДСТ показало, что основная часть пациентов с СНсФВ после ИМ на амбулаторно-поликлиническом этапе реабилитации имеет относительно сохранную диастолическую функцию сердца, которая обеспечивает адекватный ответ на ФН без значимого повышения давления наполнения ЛЖ. В целом, ДСТ ввиду своей относительной безопасности и невысокой стоимости может быть рекомендован для пациентов с СНсФВ и одышкой неопределенного происхождения с целью дифференциальной диагностики.

## Выводы

Перенесенный ИМ сопровождается наличием диастолической дисфункции ЛЖ у 53,5 % пациентов на 6-й неделе реабилитационного периода.

ДСТ сопровождается редкой встречаемостью стресс-индуцированной ДД (4 %) у пациентов со сниженной ФВ ЛЖ после ИМ.

## Список литературы / References

1. Ohara T., Little W.C. Evolving focus on diastolic dysfunction in patients with coronary artery disease. *Curr. Opin. Cardiol.* 2010;25(6):613–621. doi: 10.1097/HCO.0b013e32833f0438

2. Носенко Н.Н., Поташев С.В., Симагина Т.В., Перепельченко Н.А., Долженко М.Н., Шупик П.Л. Тканевая миокардиальная доплер-эхокардиография: возможности и ограничения метода. *Внутр. мед.* 2007;6(6):18–21.

Nosenko N.N., Potashev S.V., Simagina T.V., Perepelchenko N.A., Dolzhenko M.N., Shupik P.L. Tissue myocardial Doppler echocardiography: possibilities and limitations of the method. *Vnutrennyaya meditsina = Internal Medicine.* 2007;6(6):18–21. [In Russian].

3. Castello R., Vaughn M., Dressler F.A., McBride L.R., Willman V.L., Kaiser G.C., Schweiss J.F., Ofili E.O., Labovitz A.J. Relation between pulmonary venous flow and pulmonary wedge pressure: influence of cardiac output. *Am. Heart. J.* 1995;130(1):127–134. doi: 10.1016/0002-8703(95)90247-3

4. Choong C.Y., Weiman E.A. Left ventricle: diastolic function – its principles and evaluation.

Principles and practice of echocardiography. Philadelphia: Lea and Febiger, 1994. P. 1721–1729.

5. Хлопина И.А., Шацова Е.Н., Лупачев В.В., Плакуев А.Н., Черноземова А.В., Кубасов Р.В. Характеристика диастолической функции левого желудочка у больных после аортокоронарного шунтирования. *Актуальные вопросы кардиологии. Вестн. РАМН.* 2015;70(2):196–202. doi: 10.15690/vramn.v70i2.1313

Khlopina I.A., Shatsova E.N., Lupachev V.V., Plakuev A.N., Chernozemova A.V., Kubasov R.V. Characteristics of diastolic function of the left ventricle in patients after coronary artery bypass grafting. *Topical issues of cardiology. Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2015;70(2):196–202. [In Russian]. doi: 10.15690/vramn.v70i2.1313

6. Higashita R., Sugawara M., Kondoh Y., Kawai Y., Mitsui K., Ohki S., Tange S., Ichikawa S., Suma K. Changes in diastolic regional stiffness of the left ventricle before and after coronary artery bypass grafting. *Heart Vessels.* 1996;11(3):145–151. doi: 10.1007/BF01745172

7. El Din Behairy N.H., Homos M., Ramadan A., El Sayed Gouda S.O. Evaluation of left ventricle diastolic dysfunction in ischemic heart disease by CMR: Correlation with echocardiography and myocardial scarring. *Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine.* 2014;45(4):1099–1104. doi: 10.1016/j.ejrm.2014.07.007

8. Nagueh S.F., Smiseth O.A., Appleton C.P., Byrd B.F. 3rd, Dokainish H., Edvardsen T., Flachskampf F.A., Gillebert T.C., Klein A.L., Lancellotti P., ... Waggoner A.D. Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography: An update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 2016;29(4):277–314. doi: 10.1016/j.echo.2016.01.011

9. Kuznetsova T., Herbots L., López B., Jin Y., Richart T., Thijs L., González A., Herregods M.C., Fagard R.H., Díez J., Staessen J.A. Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in a general population. *Circ. Heart. Fail.* 2009;2(2):105–112. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.822627

10. Овчинников А.Г., Агеев Ф.Т., Алехин М.Н., Беленков Ю.Н., Васюк Ю.А., Галявич А.С., Гиляревский С.Р., Лопатин Ю.М., Мареев В.Ю., Мареев Ю.В., ... Бойцов С.А. Диастолическая трансторакальная стресс-эхокардиография с дозированной физической нагрузкой в диагностике сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса: показания, методология, интерпретация результатов. *Согласованное мнение экспертов, выработанное под эгидой ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» МЗ*

РФ, Общества специалистов по сердечной недостаточности (ОСН) и Российской ассоциации специалистов ультразвуковой диагностики в медицине (РАСУДМ). *Кардиология*. 2020;60(12):48–63. doi:10.18087/cardio.2020.12.n1219

Ovchinnikov A.G., Ageev F.T., Alekhin M.N., Belenkov Yu.N., Vasyuk Yu.A., Galyavich A.S., Gilyarevskiy S.R., Lopatin Yu.M., Mareev V.Yu., Mareev Yu.V., ... Boytsov S.A. The role of diastolic transthoracic stress echocardiography with incremental workload in the evaluation of heart failure with preserved ejection fraction: indications, methodology, interpretation. Expert consensus developed under the auspices of the National Medical Research Center of Cardiology, Society of Experts in Heart Failure (SEHF), and Russian Association of Experts in Ultrasound Diagnosis in Medicine (REUDM). *Kardiologiya = Cardiology*. 2020;60(12):48–63. [In Russian]. doi:10.18087/cardio.2020.12.n1219

11. Ha J.W., Oh J.K., Pellikka P.A., Ommen S.R., Stussy V.L., Bailey K.R., Seward J.B., Tajik A.J. Diastolic stress echocardiography: a novel noninvasive diagnostic test for diastolic dysfunction using supine bicycle exercise Doppler echocardiography. *J. Am. Soc. Echocardiogr*. 2005; 18: 63–68. doi: 10.1016/j.echo.2004.08.033

12. Donal E., Lund L.H., Oger E., Reynaud A., Schnell F., Persson H., Drouet E., Linde C., Daubert C., KaRen investigators. Value of exercise echocardiography in heart failure with preserved ejection fraction: a substudy from the KaRen study. *Eur. Heart. J. Cardiovasc. Imaging*. 2016;17(1):106–113. doi: 10.1093/ehjci/jev144

13. Nelson M.D., Szczepaniak L.S., Wei J., Haftabaradaren A., Bharadwaj M., Sharif B., Mehta P., Zhang X., Thomson L.E., Berman D.S., Li D., Bairey Merz C.N. Diastolic dysfunction in women with signs and symptoms of ischemia in the absence of obstructive

coronary artery disease: a hypothesis-generating study. *Circ. Cardiovasc. Imaging*. 2014;7(3):510–516. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.114.001714

14. Alam M., Wardell J., Andersson E., Samad B.A., Nordlander R. Effects of first myocardial infarction on left ventricular systolic and diastolic function with the use of mitral annular velocity determined by pulsed wave doppler tissue imaging. *J. Am. Soc. Echocardiogr*. 2000;13(5):343–352. doi: 10.1016/s0894-7317(00)70003-4

15. Paulus W.J., van Ballegoij J.J. Treatment of heart failure with normal ejection fraction: an inconvenient truth! *J. Am. Coll. Cardiol*. 2010;55(6):526–537. doi: 10.1016/j.jacc.2009.06.067

16. Marchandise S., Vanoverschelde J.L., D'Hondt A.M., Gurne O., Vancraeynest D., Gerber B., Pasquet A. Usefulness of tissue Doppler imaging to evaluate pulmonary capillary wedge pressure during exercise in patients with reduced left ventricular ejection fraction. *Am. J. Cardiol*. 2014;113(12):2036–2044. doi: 10.1016/j.amjcard.2014.03.051

17. Talreja D.R., Nishimura R.A., Oh J.K. Estimation of left ventricular filling pressure with exercise by Doppler echocardiography in patients with normal systolic function: a simultaneous echocardiographic-cardiac catheterization study. *J. Am. Soc. Echocardiogr*. 2007;20(5):477–479. doi: 10.1016/j.echo.2006.10.005

18. Erdei T., Smiseth O.A., Marino P., Fraser A.G. A systematic review of diastolic stress tests in heart failure with preserved ejection fraction, with proposals from the EU-FP7 MEDIA study group. *Eur. J. Heart. Fail*. 2014;16(12): 1345–1361. doi:10.1002/ejhf.184

19. Maeder M.T., Thompson B.R., Brunner-La Rocca H.P., Kaye D.M. Hemodynamic basis of exercise limitation in patients with heart failure and normal ejection fraction. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2010;56(11):855–863. doi: 10.1016/j.jacc.2010.04.040

#### Сведения об авторах:

Андрей Михайлович Воробьев, ORCID: 0000-0002-7461-4780, e-mail: Kreed73@yandex.ru

Виктор Иванович Рузов, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0001-7510-3504, e-mail: viruzov@yandex.ru

#### Information about the authors:

Andrei M. Vorobev, ORCID: 0000-0002-7461-4780, e-mail: Kreed73@yandex.ru

Victor I. Ruzov, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0001-7510-3504, e-mail: viruzov@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.09.2022

После доработки 05.11.2022

Принята к публикации 02.12.2022

Received 20.09.2022

Revision received 05.11.2022

Accepted 02.12.2022

## Топографическая анатомия восходящей и нисходящей ободочных кишок детей и подростков по данным прижизненной визуализации

А.С. Лозинский, С.В. Чемезов

*Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России  
460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6*

### Резюме

Цель исследования – установление возрастных и половых закономерностей топографии восходящей и нисходящей ободочных кишок детей и подростков по данным прижизненной визуализации. **Материал и методы.** Проанализированы компьютерные томограммы живота 88 детей и подростков без видимой патологии со стороны органов брюшной полости. Обследованные разделены на четыре возрастные группы: периоды раннего, первого и второго детства, подростковый период. Исследование выполнено на 16-срезовых компьютерных томографах с определением расстояний от восходящей и нисходящей ободочных кишок до поверхности тела, соседних органов и анатомических образований живота, скелетотопии. Полученные данные подвергнуты вариационно-статистической обработке с определением медианы, значений 25-го и 75-го перцентилей и достоверности различий по U-критерию Манна – Уитни. **Результаты и их обсуждение.** В статье представлена топографо-анатомическая характеристика восходящей и нисходящей ободочных кишок детей и подростков и установлены закономерности изменений с учетом пола и возраста обследованных. **Заключение.** Определено достоверное увеличение расстояний от восходящей ободочной кишки до правого мочеточника, тощей и подвздошной кишок и квадратной мышцы поясницы. Расстояние от поверхности тела до восходящей ободочной кишки с возрастом увеличивалось по всем исследуемым линиям. Проксимальная часть восходящей ободочной кишки среди всех обследованных в большинстве своем определялась от межпозвоночного диска  $L_{IV}-L_V$  до межпозвоночного диска  $L_V-S_1$ , а печеночный изгиб ободочной кишки – на уровне от  $L_1$  до межпозвоночного диска  $L_{II}-L_{III}$ . Установлено достоверное увеличение расстояний от нисходящей ободочной кишки до левого мочеточника, поджелудочной железы и квадратной мышцы поясницы. Расстояние от поверхности тела до нисходящей ободочной кишки с возрастом увеличивалось по передней срединной, левой средней подмышечной и левой лопаточной линиям. Селезеночный изгиб ободочной кишки располагался на уровне от  $L_1$  до межпозвоночного диска  $L_I-L_{II}$ , а дистальная часть нисходящей ободочной кишки – на уровне от  $L_{IV}$  до межпозвоночного диска  $L_{IV}-L_V$ .

**Ключевые слова:** ободочная кишка, компьютерная томография, дети, подростки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Лозинский А.С., e-mail: a-lozinskiy@mail.ru

**Для цитирования:** Лозинский А.С., Чемезов С.В. Топографическая анатомия восходящей и нисходящей ободочных кишок детей и подростков по данным прижизненной визуализации. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2023;43(1):104–110. doi: 10.18699/SSMJ20230111

## Topographic anatomy of the ascending and descending colons of children and adolescents according to intravital imaging

A.S. Lozinskiy, S.V. Chemezov

*Orenburg State Medical University of Minzdrav of Russia  
460000, Orenburg, Sovetskaya str., 6*

### Abstract

**The aim of the study** was to establish the age and sex patterns of the topography of the ascending and descending colons of children and adolescents according to intravital imaging data. **Material and methods.** Computed tomograms of the abdomen of 88 children and adolescents without visible abdominal organs pathology were analyzed. The surveyed

were divided into 4 age groups: periods of early, first and second childhood, adolescence. The study was performed on 16-slice computed tomographs with the determination of the distances from the ascending and descending colon to the surface of the body, neighboring organs and anatomical structures of the abdomen, skeletotopia. The data obtained were subjected to variation-statistical processing with the determination of the median, the values of the 25th and 75th percentiles and the significance of differences according to the Mann – Whitney U test. **Results and discussion.** The article presents the topographic and anatomical characteristics of the ascending and descending colons of children and adolescents and establishes the patterns of change, taking into account the sex and age of the examined. **Conclusions.** A significant increase in the distance from the ascending colon to the right ureter, jejunum and ileum, and quadratus lumborum was determined. The distance from the body surface to the ascending colon increased with age along all the studied lines. The proximal part of the ascending colon among all those examined was mostly defined from the intervertebral disc L<sub>IV</sub>–L<sub>V</sub> to the intervertebral disc L<sub>V</sub>–S<sub>I</sub>, and the hepatic flexure of the colon was defined at the level from L<sub>I</sub> to the intervertebral disc L<sub>II</sub>–L<sub>III</sub>. A significant increase in the distance from the descending colon to the left ureter, pancreas and quadratus lumborum was found. The distance from the body surface to the descending colon increased with age along the anterior median, left middle axillary, and left scapular lines. The splenic flexure of the colon was located at the level from L<sub>I</sub> to the intervertebral disc L<sub>I</sub>–L<sub>II</sub>, and the distal part of the descending colon was located at the level from L<sub>IV</sub> to the intervertebral disc L<sub>IV</sub>–L<sub>V</sub>.

**Key words:** colon, computed tomography, children, adolescents.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Correspondence author:** Lozinskiy A.S., e-mail: a-lozinskiy@mail.ru

**Citation:** Lozinskiy A.S., Chemezov S.V. Topographic anatomy of the ascending and descending colons of children and adolescents according to intravital imaging. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2023;43(1):104–110. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230111

## Введение

В литературе представлено достаточно большое количество работ, посвященных заболеваниям ободочной кишки у детей и подростков [1–5] и оперативным вмешательствам на ней [6, 7], что диктует необходимость детального прижизненного изучения не только анатомии, но и топографии данного органа. Встречаются публикации по морфометрической характеристике толстой кишки в норме и при отдельных видах патологии [8–11]. Вместе с тем в связи с широкой распространенностью диагностических процедур и оперативных вмешательств на ободочной кишке возникает необходимость в детальном изучении топографии данного органа для выполнения лучевых методов диагностики, а также индивидуализации и оптимизации оперативных доступов и приемов у детей и подростков.

Цель исследования – установление возрастных и половых закономерностей топографии восходящей и нисходящей ободочных кишок детей и подростков по данным прижизненной визуализации.

## Материал и методы

Для достижения поставленной цели был проведен анализ компьютерных томограмм брюшной полости 88 детей и подростков без видимой патологии органов брюшной полости из архива рентгенологического отделения Оренбургской областной детской клинической больницы. В исследование включены дети и подростки, не имевшие на момент проведения исследования видимой патологии органов брюшной полости, а в анамнезе – оперативных вмешательств на них. Его проведение одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России (протокол № 61 от 23.06.2022), получено письменное согласие законных представителей пациентов. Компьютерные томограммы были анонимизированы и деперсонифицированы. Возраст обследованных варьировал от 1 года до 16 лет, в среднем 9,4 года (девочек – 7,6 года, мальчиков – 8,4 года). Пациенты были разделены на четыре возрастные группы (табл. 1).

**Таблица 1.** Распределение исследуемых по возрастным группам и полу

**Table 1.** Distribution of subjects by age groups and gender

№ группы	Возрастной период	Девочки	Мальчики	Всего
1-я группа	Период раннего детства	8	13	21
2-я группа	Период первого детства	10	13	23
3-я группа	Период второго детства	12	9	21
4-я группа	Подростковый период	12	11	23
Итого		42	46	88

**Таблица 2.** Расстояние от восходящей ободочной кишки до других органов и анатомических образований, см  
**Table 2.** Distance from the ascending colon to other organs and anatomical formations, cm

Группа	№	Орган, анатомическое образование									
		Правая почка	Правый мочеточник	Желчный пузырь	Двенадцатиперстная кишка	Тошая и подвздошная кишки	Печень	Большая поясничная мышца	Квадратная мышца поясницы		
1	Всего	0,04 (0,01; 0,12)	1,66 (1,40; 1,76) <sup>10</sup>	0,01 (0,01; 0,21)	0,35 (0,05; 0,64)	0,06 (0,01; 0,26) <sup>7,10</sup>	0,01 (0,01; 0,01)	1,15 (0,69; 1,28)	1,60 (1,26; 1,81) <sup>10</sup>		
	Девочки	0,02 (0,01; 0,08)	1,77 (1,13; 2,01) <sup>11</sup>	0,01 (0,01; 0,01)	0,46 (0,23; 1,44)	0,08 (0,01; 0,21) <sup>11</sup>	0,01 (0,01; 0,01)	1,12 (0,65; 1,55)	1,44 (0,76; 1,63) <sup>11</sup>		
	Мальчики	0,05 (0,01; 0,12)	1,56 (1,40; 1,61) <sup>9,12</sup>	0,01 (0,01; 0,23)	0,26 (0,02; 0,63)	0,06 (0,01; 0,28) <sup>9,12</sup>	0,01 (0,01; 0,01)	1,15 (1,01; 1,28)	1,65 (1,35; 1,95) <sup>12</sup>		
2	Всего	0,03 (0,01; 0,24)	1,30 (0,94; 1,81) <sup>10</sup>	0,01 (0,01; 0,11)	0,16 (0,05; 0,56)	0,36 (0,07; 0,72)	0,01 (0,01; 0,01)	1,00 (0,38; 1,29)	1,79 (1,46; 2,18) <sup>10</sup>		
	Девочки	0,04 (0,01; 0,27)	1,37 (0,94; 1,81) <sup>11</sup>	0,01 (0,01; 0,11)	0,20 (0,06; 0,22)	0,31 (0,12; 0,40)	0,01 (0,01; 0,01)	1,03 (0,60; 1,30)	1,87 (1,46; 2,28)		
	Мальчики	0,03 (0,01; 0,10)	1,25 (1,08; 1,67) <sup>9,12</sup>	0,01 (0,01; 0,12)	0,11 (0,05; 0,56)	0,63 (0,03; 0,78)	0,01 (0,01; 0,01)	0,97 (0,38; 1,14)	1,69 (1,51; 2,18)		
3	Всего	0,03 (0,01; 0,05)	1,95 (1,46; 2,34)	0,01 (0,01; 0,15)	0,03 (0,01; 0,45)	0,56 (0,03; 0,93) <sup>1</sup>	0,01 (0,01; 0,01)	0,96 (0,64; 1,27)	1,60 (1,01; 2,14)		
	Девочки	0,03 (0,01; 0,15)	1,62 (1,48; 2,09)	0,01 (0,01; 0,01)	0,01 (0,01; 0,45)	0,71 (0,27; 1,45)	0,01 (0,01; 0,01)	0,97 (0,70; 1,28)	1,93 (1,43; 2,17)		
	Мальчики	0,02 (0,01; 0,03)	2,15 (1,44; 2,51) <sup>3,6</sup>	0,01 (0,01; 0,16)	0,11 (0,07; 0,39)	0,68 (0,03; 0,83) <sup>3</sup>	0,01 (0,01; 0,01)	0,95 (0,57; 1,27)	1,75 (0,77; 2,11)		
4	Всего	0,01 (0,01; 0,07)	2,22 (1,86; 2,78) <sup>1</sup>	0,01 (0,01; 0,01)	0,06 (0,01; 0,48)	0,69 (0,09; 1,12) <sup>1</sup>	0,01 (0,01; 0,07)	0,94 (0,67; 1,60)	2,03 (1,64; 2,69) <sup>1,4</sup>		
	Девочки	0,01 (0,01; 0,06)	2,39 (1,73; 2,86) <sup>2</sup>	0,01 (0,01; 0,01)	0,06 (0,01; 1,55)	0,77 (0,24; 0,98) <sup>2</sup>	0,01 (0,01; 0,10)	0,91 (0,74; 1,69)	2,04 (1,29; 2,33) <sup>2</sup>		
	Мальчики	0,01 (0,01; 0,11)	2,22 (1,86; 2,78) <sup>3</sup>	0,01 (0,01; 0,01)	0,09 (0,01; 0,48)	0,95 (0,12; 1,83) <sup>3</sup>	0,01 (0,01; 0,07)	0,95 (0,48; 1,60)	2,01 (1,72; 3,22) <sup>3</sup>		

**Примечание.** Надстрочными знаками указаны подгруппы, с которыми имеются статистически значимые различия при  $p < 0,05$ .

Исследования выполнены на 16-срезовых компьютерных томографах General Electric BrightSpeed (США) и Toshiba Aquilion (Япония) с толщиной среза 1–1,25 мм в нативную, раннюю артериальную, портальную венозную и отсроченную венозную фазы. Контрастное усиление осуществляли с использованием неионизированного низкоосмолярного рентгеноконтрастного препарата Ультравист 370. Исследования проводились натощак.

С помощью программы «RadiAnt DICOM Viewer» (версия 2020.2.2) на уровне средин тел позвонков от Th<sub>XII</sub> до L<sub>V</sub> были определены:

– кратчайшие расстояния от восходящей ободочной кишки до правой почки, правого мочеточника, желчного пузыря, двенадцатиперстной кишки, тощей и подвздошной кишок, печени, большой поясничной мышцы и квадратной мышцы поясницы;

– кратчайшие расстояния от нисходящей ободочной кишки до левой почки, левого мочеточника, селезенки, поджелудочной железы, тощей и подвздошной кишок, большой поясничной мышцы и квадратной мышцы поясницы;

– скелетотопия проксимальной части восходящей ободочной кишки, печеночного и селезеночного изгибов ободочной кишки и дистальной части нисходящей ободочной кишки;

– кратчайшие расстояния от ближайшей точки восходящей ободочной кишки до поверхности тела по продолжениям передней срединной, правой среднеключичной, правой средней подмышечной и правой лопаточной линий;

– кратчайшие расстояния от ближайшей точки нисходящей ободочной кишки до поверхности тела по продолжениям передней срединной, левой среднеключичной, левой средней подмышечной и левой лопаточной линий.

Для статистической обработки материала использованы критерии непараметрической статистики с определением медианы и значений 25-го и 75-го процентилей (Me (25 %; 75 %)). Достоверность различий полученных значений определяли с помощью U критерия Манна – Уитни. Статистически значимыми считались различия между значениями показателей при уровне  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Расстояние от восходящей ободочной кишки до правой почки, печени и желчного пузыря от 1-й к 4-й группе статистически значимо не изменялось, в то время как до правого мочеточника, петель тощей и подвздошной кишок, квадратной мышцы поясницы увеличивалось, до двенадцатиперстной кишки и большой поясничной мышцы имело тенденцию к уменьшению без статистически значимых различий (табл. 2). Достоверных различий между расстояниями от восходящей ободочной кишки до рассматриваемых органов между мальчиками и девочками в пределах одного возраста ни в одной группе не определено. Как видно из табл. 3, расстояние от поверхности тела до восходящей ободочной кишки с возрастом увеличивалось по всем исследуемым линиям.

Проксимальная часть восходящей ободочной кишки определялась от уровня L<sub>IV</sub> до уровня S<sub>I</sub>, в

Таблица 3. Расстояние от восходящей ободочной кишки до поверхности тела, см

Table 3. Distance from the ascending colon to the body surface, cm

Группа	№	Передняя срединная линия	Правая среднеключичная линия	Правая средняя подмышечная линия	Правая лопаточная линия
1	Всего	1 5,18 (4,25; 5,58) <sup>7,10</sup>	2,76 (1,97; 3,70) <sup>10</sup>	2,79 (2,37; 3,23) <sup>10</sup>	3,55 (3,33; 4,18) <sup>4,7,10</sup>
	Девочки	2 4,20 (4,12; 4,91) <sup>5,8,11</sup>	2,72 (1,54; 3,04) <sup>11</sup>	2,46 (1,91; 2,86) <sup>11</sup>	3,30 (2,77; 3,85) <sup>5,8,11</sup>
	Мальчики	3 5,32 (5,02; 6,09) <sup>9,12</sup>	2,77 (2,23; 3,91) <sup>12</sup>	2,81 (2,43; 3,54) <sup>12</sup>	3,63 (3,39; 4,18) <sup>9,12</sup>
2	Всего	4 5,52 (5,30; 5,92) <sup>10</sup>	2,90 (2,05; 3,18) <sup>7,10</sup>	3,05 (2,78; 3,33) <sup>10</sup>	4,37 (3,84; 5,15) <sup>1,10</sup>
	Девочки	5 5,43 (5,30; 5,91) <sup>2,8,11</sup>	2,75 (2,05; 3,09)	3,15 (2,78; 3,38) <sup>11</sup>	4,44 (4,28; 5,20) <sup>2,11</sup>
	Мальчики	6 5,57 (5,33; 5,99) <sup>9,12</sup>	2,80 (2,34; 3,24)	3,05 (2,81; 3,24) <sup>12</sup>	4,10 (3,66; 4,80) <sup>12</sup>
3	Всего	7 6,98 (6,11; 7,81) <sup>1</sup>	3,63 (2,39; 4,06) <sup>4</sup>	3,27 (2,57; 3,95)	4,97 (4,22; 5,96) <sup>1,10</sup>
	Девочки	8 6,35 (5,82; 7,07) <sup>2,5,11</sup>	2,86 (2,02; 3,89)	3,24 (2,34; 4,09)	4,93 (4,63; 6,24) <sup>2,11</sup>
	Мальчики	9 7,49 (7,27; 8,31) <sup>3,6</sup>	3,06 (2,46; 4,38)	3,30 (2,85; 3,75)	5,21 (3,81; 5,69) <sup>3,12</sup>
4	Всего	10 7,64 (7,04; 8,95) <sup>1,4</sup>	3,55 (2,77; 5,03) <sup>1,4</sup>	4,10 (3,79; 4,66) <sup>1,4</sup>	6,50 (6,00; 7,63) <sup>1,4,7</sup>
	Девочки	11 7,71 (6,57; 7,96) <sup>2,5,8</sup>	3,47 (2,76; 4,71) <sup>2</sup>	3,91 (3,41; 4,56) <sup>2,5</sup>	6,18 (5,67; 6,56) <sup>2,5,8</sup>
	Мальчики	12 7,24 (7,15; 9,44) <sup>3,6</sup>	3,59 (2,77; 5,15) <sup>3</sup>	4,47 (3,79; 4,96) <sup>3,6</sup>	7,26 (6,46; 7,75) <sup>3,6,9</sup>

**Примечание.** Надстрочными знаками указаны подгруппы, с которыми имеются статистически значимые различия при  $p < 0,05$ .

большинстве случаев в диапазоне от межпозвоночного диска L<sub>IV</sub>-L<sub>V</sub> до межпозвоночного диска L<sub>V</sub>-S<sub>I</sub>. У 50 % обследованных девочек 1-й группы проксимальная часть восходящей ободочной кишки располагалась на уровне L<sub>V</sub>, в то время как в 4-й группе в 66,7 % случаев – на уровне межпозвоночного диска L<sub>V</sub>-S<sub>I</sub>. Среди мальчиков 1-й группы по 46,2 % детей имели проксимальную часть восходящей ободочной кишки на уровне межпозвоночного диска L<sub>IV</sub>-L<sub>V</sub> и L<sub>V</sub>. Среди мальчиков-подростков в 45,5 % случаев изучаемый показатель определялся на уровне L<sub>V</sub> и в 36,3 % – на уровне межпозвоночного диска L<sub>V</sub>-S<sub>I</sub>. Расположение печеночного изгиба ободочной кишки было на уровне от межпозвоночного диска Th<sub>XII</sub>-L<sub>I</sub> до межпозвоночного диска L<sub>III</sub>-L<sub>IV</sub>, в большинстве случаев – на уровне от L<sub>I</sub> до межпозвоночного диска L<sub>II</sub>-L<sub>III</sub>. Среди девочек 1-й группы в 50 % случаев печеночный изгиб ободочной кишки определялся на уровне межпозвоночного диска L<sub>I</sub>-L<sub>II</sub>. В 4-й группе правый изгиб ободочной киш-

ки находился на уровне межпозвоночного диска L<sub>II</sub>-L<sub>III</sub> у 41,7 % обследованных. Среди мальчиков 1-й группы печеночный изгиб ободочной кишки у 30,8 % обследованных располагался на уровне L<sub>I</sub>, а в 4-й группе у 36,4 % подростков – на уровне межпозвоночного диска L<sub>II</sub>-L<sub>III</sub>.

При изучении топографии нисходящей ободочной кишки установлено, что расстояние от нее до левой почки, большой поясничной мышцы, петель тощей и подвздошной кишок имело тенденцию к увеличению, до селезенки – тенденцию к уменьшению при отсутствии достоверных различий (табл. 4). Расстояние до левого мочеточника и квадратной мышцы поясницы увеличилось, а до левой почки, селезенки и петель тощей и подвздошной кишок не изменилось (см. табл. 4).

Данные, представленные в табл. 5, позволяют заключить, что расстояние от нисходящей ободочной кишки до поверхности тела по передней срединной, по левой средней подмышечной и по левой лопаточной линиям увеличилось среди

**Таблица 4.** Расстояние от нисходящей ободочной кишки до других органов и анатомических образований, см

**Table 4.** Distance from the descending colon to other organs and anatomical formations, cm

Группа	№	Орган, анатомическое образование						
		Левая почка	Левый мочеточник	Селезенка	Поджелудочная железа	Большая поясничная мышца	Квадратная мышца поясницы	
1	Всего	1	0,14 (0,05; 0,35)	2,32 (2,29; 2,61) <sup>4,7,10</sup>	0,06 (0,01; 0,17)	4,66 (3,82; 5,54) <sup>4,7,10</sup>	1,57 (1,66; 2,33)	1,32 (1,02; 1,66) <sup>10</sup>
	Девочки	2	0,06 (0,03; 0,08)	2,31 (1,87; 2,43) <sup>5,8,11</sup>	0,06 (0,01; 0,11)	4,04 (3,30; 4,38) <sup>8,11</sup>	1,53 (1,19; 1,84)	1,27 (0,92; 1,15) <sup>5,8,11</sup>
	Мальчики	3	0,28 (0,06; 0,46)	2,32 (2,29; 2,70) <sup>6,9,12</sup>	0,07 (0,01; 0,25)	5,14 (4,51; 5,63) <sup>12</sup>	1,69 (1,79; 2,37)	1,56 (1,09; 1,68) <sup>9,12</sup>
2	Всего	4	0,08 (0,04; 0,32)	2,94 (2,57; 3,42) <sup>1,7,10</sup>	0,01 (0,01; 0,10)	5,61 (4,43; 6,53) <sup>1,10</sup>	1,74 (1,50; 2,34)	1,74 (0,76; 2,08) <sup>10</sup>
	Девочки	5	0,07 (0,02; 0,45)	2,87 (2,67; 3,11) <sup>2,8,11</sup>	0,01 (0,01; 0,12)	5,12 (4,02; 6,10) <sup>11</sup>	1,84 (1,70; 1,93)	1,62 (1,41; 2,36) <sup>2</sup>
	Мальчики	6	0,10 (0,04; 0,27)	3,23 (2,57; 3,46) <sup>3,12</sup>	0,01 (0,01; 0,01)	5,76 (4,77; 6,96)	1,86 (1,48; 2,34)	1,87 (0,47; 1,91) <sup>9,12</sup>
3	Всего	7	0,17 (0,03; 0,77)	3,53 (3,36; 4,10) <sup>1,4,10</sup>	0,01 (0,01; 0,10)	5,66 (3,71; 6,40) <sup>1,10</sup>	2,00 (1,46; 2,76)	2,03 (0,83; 2,70)
	Девочки	8	0,06 (0,02; 0,78)	3,57 (3,47; 4,09) <sup>2,5</sup>	0,01 (0,01; 0,28)	5,66 (5,07; 6,06) <sup>2,11</sup>	2,07 (1,36; 2,75)	1,96 (0,57; 2,45) <sup>2</sup>
	Мальчики	9	0,57 (0,08; 0,76)	3,43 (2,83; 4,10) <sup>3</sup>	0,01 (0,01; 0,10)	5,95 (2,54; 6,67)	1,99 (1,59; 3,23)	2,22 (1,08; 2,92) <sup>3,6</sup>
4	Всего	10	0,11 (0,02; 0,72)	3,92 (3,46; 4,82) <sup>1,4,7</sup>	0,01 (0,01; 0,14)	7,39 (5,80; 8,40) <sup>1,4,7</sup>	2,04 (1,88; 2,82)	2,30 (1,73; 2,84) <sup>1,4</sup>
	Девочки	11	0,12 (0,05; 0,75)	4,19 (3,65; 4,70) <sup>2,5</sup>	0,01 (0,01; 0,03)	7,40 (5,87; 8,70) <sup>2,5,8</sup>	2,23 (1,92; 2,71)	2,07 (1,47; 2,30) <sup>2</sup>
	Мальчики	12	0,09 (0,01; 0,72)	3,77 (3,30; 4,96) <sup>3,6</sup>	0,01 (0,01; 0,14)	7,38 (4,82; 7,07) <sup>3</sup>	2,36 (1,82; 2,91)	2,52 (2,30; 3,56) <sup>3,6</sup>

**Примечание.** Надстрочными знаками указаны подгруппы, с которыми имеются статистически значимые различия при  $p < 0,05$ .

Таблица 5. Расстояние от нисходящей ободочной кишки до поверхности тела, см

Table 5. Distance from the descending colon to the body surface, cm

Группа	№	Передняя срединная линия	Левая среднеключичная линия	Левая средняя подмышечная линия	Левая лопаточная линия	
1	Всего	1	7,58 (7,19; 7,99) <sup>4,7,10</sup>	4,80 (4,23; 5,54)	2,20 (1,98; 3,29) <sup>7,10</sup>	2,60 (2,39; 2,91) <sup>4,7,10</sup>
	Девочки	2	7,18 (6,62; 7,46) <sup>5,8,1</sup>	4,89 (4,57; 5,16)	2,17 (1,97; 3,52) <sup>5,8,11</sup>	2,44 (2,26; 2,89) <sup>5,8,11</sup>
	Мальчики	3	7,84 (7,34; 8,31) <sup>9,12</sup>	4,72 (4,10; 5,63)	2,23 (1,89; 3,11) <sup>9,12</sup>	2,77 (2,39; 2,91) <sup>9,12</sup>
2	Всего	4	8,45 (7,94; 8,85) <sup>1,7,10</sup>	5,04 (4,23; 5,56)	2,50 (1,85; 3,00) <sup>7,10</sup>	3,25 (2,81; 3,59) <sup>1,7,10</sup>
	Девочки	5	8,48 (8,06; 8,65) <sup>2,11</sup>	4,90 (4,39; 5,20)	2,47 (2,27; 2,87) <sup>2,11</sup>	3,46 (3,27; 3,86) <sup>2,11</sup>
	Мальчики	6	8,39 (7,94; 8,85) <sup>12</sup>	5,39 (4,10; 5,66)	2,52 (1,85; 3,06) <sup>9,12</sup>	3,18 (2,71; 3,25) <sup>9,12</sup>
3	Всего	7	9,06 (8,66; 9,88) <sup>1,4</sup>	5,24 (4,48; 5,61)	3,15 (2,59; 4,02) <sup>1,4</sup>	4,25 (3,72; 5,95) <sup>1,4,7</sup>
	Девочки	8	8,91 (7,30; 9,88) <sup>2</sup>	4,95 (4,26; 6,21)	3,15 (2,35; 3,78) <sup>2</sup>	4,09 (2,85; 5,05) <sup>2,11</sup>
	Мальчики	9	9,06 (8,73; 9,56) <sup>3,12</sup>	5,48 (5,21; 5,57)	3,22 (3,09; 4,26) <sup>3,6</sup>	4,96 (4,03; 6,01) <sup>3,6</sup>
4	Всего	10	9,73 (9,23; 10,48) <sup>1,4</sup>	5,39 (4,38; 5,69)	3,66 (3,31; 4,28) <sup>1,4</sup>	6,26 (5,34; 7,26) <sup>1,4,7</sup>
	Девочки	11	9,49 (8,99; 10,00) <sup>2,5</sup>	5,30 (5,07; 5,59)	3,74 (3,28; 4,23) <sup>2,5</sup>	5,73 (5,25; 6,47) <sup>2,5,8</sup>
	Мальчики	12	10,18 (9,36; 11,48) <sup>3,6,9</sup>	5,51 (3,75; 6,88)	3,64 (3,37; 4,28) <sup>3,6</sup>	7,06 (5,54; 7,64) <sup>3,6</sup>

**Примечание.** Надстрочными знаками указаны подгруппы, с которыми имеются статистически значимые различия при  $p < 0,05$ .

всех обследованных, по левой среднеключичной линии имело тенденцию к увеличению без достоверных различий. Достоверных различий рассматриваемых показателей между девочками и мальчиками ни в одной возрастной группе не установлено.

Селезеночный изгиб ободочной кишки располагался на уровне от Th<sub>XII</sub> до L<sub>III</sub>: в 1-й группе – на уровне L<sub>I</sub> в 37,5 % случаев среди девочек и в 38,4 % случаев среди мальчиков, в 4-й группе – на уровне L<sub>I</sub>–L<sub>II</sub> у 33,3 % девочек и 36,3 % мальчиков. Дистальная часть нисходящей ободочной кишки располагалась на уровне от L<sub>III</sub> до уровня межпозвоночного диска L<sub>V</sub>–S<sub>I</sub>: в 1-й группе – на уровне L<sub>IV</sub> у 37,5 % девочек и 38,5 % мальчиков, в 4-й группе – на уровне L<sub>IV</sub>–L<sub>V</sub> у 41,7 % девочек и 45,4 % мальчиков.

### Заключение

В результате проведенного исследования определено достоверное увеличение расстояния от восходящей ободочной кишки до право-

го мочеточника, тощей и подвздошной кишок и квадратной мышцы поясницы. Расстояние от поверхности тела до восходящей ободочной кишки с возрастом увеличивалось по всем исследуемым линиям. Проксимальная часть восходящей ободочной кишки среди всех обследованных в большинстве своем определялась от межпозвоночного диска L<sub>IV</sub>–L<sub>V</sub> до межпозвоночного диска L<sub>V</sub>–S<sub>I</sub>, а печеночный изгиб ободочной кишки – на уровне от L<sub>I</sub> до межпозвоночного диска L<sub>II</sub>–L<sub>III</sub>.

Установлено достоверное увеличение расстояния от нисходящей ободочной кишки до левого мочеточника, поджелудочной железы и квадратной мышцы поясницы. Расстояние от поверхности тела до нисходящей ободочной кишки с возрастом увеличивалось по передней срединной, левой средней подмышечной и левой лопаточной линиям. Селезеночный изгиб ободочной кишки располагался на уровне от L<sub>I</sub> до межпозвоночного диска L<sub>I</sub>–L<sub>II</sub>, а дистальная часть нисходящей ободочной кишки – на уровне от L<sub>IV</sub> до межпозвоночного диска L<sub>IV</sub>–L<sub>V</sub>.

## Список литературы / References

1. Grover Z., Alex G. Management of inflammatory bowel disease in children: It is time for an individualised approach. *J. Paediatr. Child. Health.* 2020;56(11):1677–1684. doi: 10.1111/jpc.14652
2. Nardo G.D., Esposito G., Ziparo C., Micheli F., Masoni L., Villa M.P., Parisi P., Manca M.B., Baccini F., Corleto V.D. Enteroscopy in children and adults with inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 2020;26(39):5944–5958. doi: 10.3748/wjg.v26.i39.5944
3. Sahn B., Bitton S. Lower gastrointestinal bleeding in children. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* 2016;26(1):75–98. doi: 10.1016/j.giec.2015.08.007
4. Siow V.S., Bhatt R., Mollen K.P. Management of acute severe ulcerative colitis in children. *Semin. Pediatr. Surg.* 2017;26(6):367–372. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2017.10.006
5. Turner D. Relapsing and refractory ulcerative colitis in children. *Dig. Dis.* 2014;32(4):419–426. doi: 10.1159/000358148
6. Bilal R., Ospanov M., Dzenalayev D., Olkhovik Y., Khamitov M., Kozhakhmetov A., Satbekov R., Abetova D. The technique of mobilization of the colon for pull-through procedure in hirschsprung's disease. *Front. Surg.* 2022;9:921789. doi: 10.3389/fsurg.2022.921789
7. Chen C.J., Chuang J.P. Conservative surgery for right colon perforation leads to better long-term outcomes in children: A 21-year experience. *Pediatr. Neonatol.* 2015;56(3):159–164. doi: 10.1016/j.pedneo.2014.09.001
8. Civitelli F., di Nardo G., Oliva S., Nuti F., Ferrari F., Dilillo A., Viola F., Pallotta N., Cucchiara S., Aloï M. Ultrasonography of the colon in pediatric ulcerative colitis: a prospective, blind, comparative study with colonoscopy. *J. Pediatr.* 2014;165(1):78–84. doi: 10.1016/j.jpeds.2014.02.055
9. Koppen I.J., Yacob D., di Lorenzo C., Saps M., Benninga M.A., Cooper J.N., Minneci P.C., Deans K.J., Bates D.G., Thompson B.P. Assessing colonic anatomy normal values based on air contrast enemas in children younger than 6 years. *Pediatr. Radiol.* 2017;47(3):306–312. doi: 10.1007/s00247-016-3746-0
10. Mirjalili S.A., Tarr G., Stringer M.D. The length of the large intestine in children determined by computed tomography scan. *Clin. Anat.* 2017;30(7):887–893. doi: 10.1002/ca.22941
11. Wozniak S., Pytrus T., Kobierzycki C., Grabowski K., Paulsen F. The large intestine from fetal period to adulthood and its impact on the course of colonoscopy. *Anatomischer Anzeiger.* 2019;224:17–22. doi: 10.1016/j.aanat.2019.02.004

## Сведения об авторах:

**Андрей Сергеевич Лозинский**, к.м.н., ORCID: 0000-0002-7279-9195, e-mail a-lozinskiy@mail.ru  
**Сергей Всеволодович Чемезов**, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-1994-4293, e-mail: prof\_chemezov@mail.ru

## Information about the authors:

**Andrey S. Lozinskiy**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-7279-9195, e-mail a-lozinskiy@mail.ru  
**Sergey V. Chemezov**, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-1994-4293,  
e-mail: prof\_chemezov@mail.ru

Поступила в редакцию 30.09.2022

После доработки 24.11.2022

Принята к публикации 09.12.2022

Received 30.09.2022

После доработки 24.11.2022

Accepted 09.12.2022

## Частота метаболически здорового и нездорового фенотипов у женщин 25–44 лет при разных уровнях тиреотропного гормона, пролактина, лептина

В.И. Алфёрова, С.В. Мустафина, О.Д. Рымар, С.М. Воевода, Л.В. Щербакова, Е.М. Стахнёва, Д.В. Денисова

*НИИ терапии и профилактической медицины – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН 630089, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1*

### Резюме

Сообщения о том, что риск развития сердечно-сосудистых заболеваний при ожирении неодинаков, привели к выделению метаболически здорового и нездорового фенотипов (МЗФ и МНЗФ), в основе этой концепции лежит способность жировой ткани продуцировать ряд адипокинов, например лептин. Интересны с точки зрения влияния на метаболизм такие гормоны, как тиреотропный гормон (ТТГ) и пролактин. Цель исследования – изучить распространенность МЗФ и МНЗФ у женщин молодого возраста с разным индексом массы тела (ИМТ) и особенности гормонального статуса (ТТГ, пролактин, лептин) при разных фенотипах. **Материал и методы.** Из репрезентативной выборки населения г. Новосибирска в возрасте 25–44 лет выделена группа женщин ( $n = 655$ ) для изучения клинико-лабораторных показателей. Дизайн – одномоментное наблюдательное одноцентровое исследование. Для оценки МЗФ и МНЗФ использовались критерии IDF, 2005 и NCEP ATR III, 2001. **Результаты и их обсуждение.** Распространенность МНЗФ у молодых женщин г. Новосибирска составила 22,3 %, МЗФ – 77,7 % по IDF, 2005; по NCEP ATR III, 2001 – соответственно 13,1 и 86,9 %. Частота МНЗФ увеличивалась по мере роста ИМТ с 4,0 до 72,0 % (IDF, 2005) и с 2,3 до 58,0 % (NCEP ATR III, 2001). У женщин с ожирением МНЗФ определялся в два раза чаще, чем МЗФ, – 72 и 28 % по IDF, 2005, 58 и 42 % по NCEP ATR III, 2001 соответственно. ТТГ и пролактин не дают информации о метаболическом здоровье у молодых женщин. Содержание лептина ассоциировано с ИМТ. Пороговое значение уровня лептина составило 18,3 нг/мл при максимальной чувствительности и специфичности ( $Se = 53,3 \%$ ,  $Sp = 81,5 \%$ ), 14,5 нг/мл – при равенстве чувствительности и специфичности ( $Se = 65,7 \%$ ,  $Sp = 65,7 \%$ ). Площадь под ROC-кривой (AUC) для диагностики МНЗФ составила 0,727 ( $SE = 0,029$ ,  $p < 0,0001$ ). **Заключение.** Распространенность МЗФ у молодых женщин уменьшается при увеличении ИМТ. МНЗФ распространен в 3,5 раза реже, чем МЗФ, по критериям IDF, 2005. ТТГ и пролактин не ассоциированы с метаболическим фенотипом у молодых женщин. Уровень лептина более 18,3 нг/мл определен как один из маркеров для распознавания МНЗФ у женщин в возрасте 25–44 лет независимо от ИМТ.

**Ключевые слова:** метаболическое здоровье, индекс массы тела, ожирение, молодые женщины, тиреотропный гормон, пролактин, лептин.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Алфёрова В.И., e-mail: lady.alfyorova2009@yandex.ru

**Для цитирования:** Алфёрова В.И., Мустафина С.В., Рымар О.Д., Воевода С.М., Щербакова Л.В., Стахнёва Е.М., Денисова Д.В. Частота метаболически здорового и нездорового фенотипов у женщин 25–44 лет при разных уровнях тиреотропного гормона, пролактина, лептина. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2023;43(1):111–123. doi: 10.18699/SSMJ20230112

## The frequency of metabolically healthy and unhealthy phenotypes in women aged 25–44 years with different levels of thyroid-stimulating hormone, prolactin, leptin

V.I. Alferova, S.V. Mustafina, O.D. Rymar, S.M. Voevoda, L.V. Shcherbakova, E.M. Stakhneva, D.V. Denisova

Research Institute of Internal and Preventive Medicine –

Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS

630089, Novosibirsk, Borisa Bogatkova str., 175/1

### Abstract

Reports that the risk of developing cardiovascular diseases in obesity is not the same, led to the allocation of metabolically healthy and unhealthy phenotypes (MHP and MUHP), this concept is based on the ability of adipose tissue to produce a number of adipokines, one of which is leptin. Hormones such as thyroid-stimulating hormone (TSH) and prolactin (PRL) are interesting from the point of view of their effect on metabolism. Aim of the study was to investigate the prevalence of MHP and MUHP in young women with different body mass index (BMI) and hormonal status (TSH, PRL, leptin) in different phenotypes. **Material and methods.** A group of women ( $n = 655$ ) was selected from a representative sample of the Novosibirsk population aged 25–44 to study clinical and laboratory parameters. The design is a cross – sectional, observational, single – centre study. IDF, 2005 and NCEP ATP III, 2001 criteria were used to evaluate the MHP and MUHP. **Results and discussion.** The prevalence of MUHP in young women in Novosibirsk was 22.3 %, MHP – 77.7 % according to IDF, 2005; according to NCEP ATP III, 2001 – 13.1 and 86.9 %, respectively. The prevalence of MUHP increased with increasing BMI from 4.0 to 72.0 % according to IDF, 2005 and from 2.3 to 58.0 % according to NCEP ATP III, 2001, respectively. In obese women, MUHP was detected twice as often as MHP – 72 and 28 % according to IDF, 2005, 58 and 42 % according to NCEP ATP III, 2001. TSH and PRL do not provide information about metabolic health in young women. Leptin content is associated with BMI. The threshold value of the leptin level was 18.3 ng/ml with maximum sensitivity and specificity ( $Se = 53.3 \%$ ,  $Sp = 81.5 \%$ ), 14.5 ng/ml with equal sensitivity and specificity ( $Se = 65.7 \%$ ,  $Sp = 65.7 \%$ ). The area under ROC curve (AUC) for diagnosis of MUHP was 0.727 ( $SE = 0.029$ ,  $p < 0.0001$ ). **Conclusion.** The frequency of MHP in young women decreases with increasing BMI. MUHP is 3.5 times less common than MHP according to IDF criteria, 2005. TSH and PRL are not associated with the metabolic phenotype in young women. A leptin level more than 18.3 ng/ml has been identified as one of the markers for the recognition of MUHP in women aged 25–44 years, regardless of BMI.

**Key words:** metabolic health, body mass index, obesity, young women, thyroid-stimulating hormone, prolactin, leptin.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

**Correspondence author:** Alferova V.I., e-mail: lady.alfyoroova2009@yandex.ru

**Citation:** Alferova V.I., Mustafina S.V., Rymar O.D., Voevoda S.M., Shcherbakova L.V., Stakhneva E.M., Denisova D.V. The frequency of metabolically healthy and unhealthy phenotypes in women aged 25–44 years with different levels of thyroid-stimulating hormone, prolactin, leptin. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(1):111–123. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230112

### Введение

В настоящее время ожирение считается ведущим фактором риска развития атеросклеротических заболеваний сердечно-сосудистой системы (ССЗ), а также сахарного диабета 2 типа [1]. В последние годы появляется все больше данных о том, что риск развития ССЗ у лиц с ожирением неодинаков. Исследование этой гипотезы привело к возникновению классификации ожирения на метаболически здоровый (МЗФО) и метаболически нездоровый (МНЗФО) фенотипы [2–4]. Впоследствии эта концепция была экстраполирована на лиц с любым индексом массы тела (ИМТ), что привело к разделению людей на лиц с МЗФ или

МНЗФ при нормальной, избыточной массе тела и ожирении [3, 5].

Во всем мире ведутся исследования, направленные на установление точных протективных механизмов, реализующихся у лиц с МЗФ. Одной из наиболее перспективных видится эндокринная теория, согласно которой жировая ткань, как крупный эндокринный орган, способна вырабатывать широкий спектр гормонов-адипоцитокитинов [6], одним из которых является лептин. Лептин – гормон-регулятор аппетита и пищевого поведения [7, 8], при этом в мировой литературе сообщается, что у людей с МЗФ и МНЗФО концентрация адипоцитокитинов, в том числе лептина, различается – лица с МНЗФО имеют значительно

более низкий уровень лептина по сравнению с метаболически здоровыми людьми с ожирением [9, 10].

Помимо активного изучения роли адипокинов в регуляции метаболизма, не ослабевает интерес научного сообщества к участию в ней таких «классических» гормонов, как тиреотропный гормон (ТТГ) и пролактин. Данных о вкладе ТТГ и пролактина в формирование МЗФ и МНЗФ в литературе немного, и они в основном свидетельствуют о неблагоприятных эффектах, оказываемых повышением концентрации этих гормонов (соответственно при гипотиреозе и гиперпролактинемии опухолевого генеза) [11–13]. Однако все еще остается малоизученным вопрос, каким образом ТТГ и пролактин влияют на метаболизм вне болезни (в пределах референсных значений). Также изучается влияние на метаболический профиль человека умеренного повышения содержания пролактина [13].

Необходимо отметить, что распространенность МЗФ и МНЗФ у молодых женщин, а также клиничко-лабораторные особенности различных фенотипов мало изучены. Таким образом, изучение частоты МЗФ и МНЗФ и их характеристик у женщин молодого возраста является актуальной проблемой.

Цель исследования – изучить распространенность МЗФ и МНЗФ у женщин молодого возраста с разной массой тела и особенности гормонального статуса (ТТГ, пролактин, лептин) при разных фенотипах.

## Материал и методы

Исследование проводилось на базе НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН) с 2013 по 2017 г. В изучаемую выборку включены все женщины, участвующие в скрининге. Критерии включения в анализ: женский пол, возраст 25–44 лет, наличие подписанного добровольного информированного согласия на участие в исследовании. Критерии исключения из анализа: беременность и лактация на момент проведения исследования, отказ от забора венозной крови.

Исследование проведено на основе репрезентативной выборки из неорганизованной популяции женщин в возрасте 25–44 лет, обследованных в рамках бюджетной темы «Эпидемиологический мониторинг состояния здоровья населения и изучение молекулярно-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распространенных терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования подходов к их диагностике, профилактике и лечению» (рег. № 122031700094–5).

Репрезентативная выборка в количестве 2500 человек сформирована из населения Октябрьского района г. Новосибирска методом случайных чисел. Октябрьский район по своим социальным, этническим и промышленным характеристикам является типичным административным районом Новосибирска. Выборка построена на основе данных Территориального фонда обязательного медицинского страхования лиц в возрасте 25–44 лет. Применены методы поэтапного эпидемиологического стимулирования (почтовые приглашения, телефонные звонки, информационные сообщения в СМИ). Отклик составил 60,5 %, всего обследовано 1513 человек, из них 840 женщин. При формировании итоговой выборки из анализа исключены 185 участниц с подтвержденной беременностью и неполным биохимическим анализом крови.

Итоговая выборка женщин (655 человек) проанализирована в группах индекса массы тела (ИМТ), который оценивался по критериям ВОЗ, 1997: за нормальную принимали массу тела при ИМТ < 25,0 кг/м<sup>2</sup>, масса тела при ИМТ 25,0–29,9 кг/м<sup>2</sup> считалась избыточной, а при ИМТ ≥ 30,0 кг/м<sup>2</sup> диагностировалось ожирение. В каждой группе изучались МЗФ и МНЗФ.

Сбор информации осуществлялся путем анкетирования участниц с помощью стандартного опросника. Далее проводились антропометрические измерения (масса тела и рост с последующим расчетом ИМТ по формуле: масса тела (кг) / рост (м<sup>2</sup>), окружность талии (ОТ)). Рост измеряли в положении стоя, без обуви и верхней одежды, на стандартном ростомере, точность измерения до 0,5 см, массу тела – в положении стоя, без обуви и верхней одежды, на стандартных медицинских рычажных весах, прошедших метрологическую поверку, точность измерения до 0,1 кг. ОТ определяли при помощи гибкой сантиметровой ленты на середине расстояния между краем нижнего ребра и верхним краем гребня подвздошной кости (точность измерения 1 см). Артериальное давление (АД) измеряли трехкратно с помощью механического сфигмоманометра, в протокол заносили среднее значение трех измерений. Для проведения биохимического и гормонального исследования производили забор венозной крови из локтевой вены утром натощак, через 12 часов после последнего приема пищи. Пробирки с кровью центрифугировали, после чего сыворотку замораживали и хранили в низкотемпературной камере (–70 °С). Проведена оценка гормональных показателей (содержание ТТГ, пролактина, лептина), а также биохимических показателей (концентрация глюкозы плазмы натощак (ГПН), общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов высокой (ХС ЛПВП) и низкой (ХС ЛПНП) плот-

ности, триглицеридов (ТГ), общего и прямого билирубина, креатинина, активность АлАТ, АсАТ, гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), щелочной фосфатазы (ЩФ), скорость клубочковой фильтрации (СКФ)).

Содержание ОХС, ХС ЛПВП, ТГ, ГПН, активность АлАТ, АсАТ, ГГТП, ЩФ определяли на автоматическом биохимическом анализаторе KoneLab 30i (Thermo Fisher Scientific Oy, Финляндии) с использованием стандартных наборов (Thermo Fisher Scientific Oy). Концентрацию ХС ЛПНП вычисляли по формуле Фридвальда (ХС ЛПНП = ОХС – (ТГ / 2,2 + ХС ЛПВП), ГПН – по формуле: ГПН =  $-0,137 + 1,047 \times$  глюкоза сыворотки крови. Активность АлАТ, АсАТ, ГГТП, ЩФ определяли кинетическим методом, рекомендованным Международной федерацией клинической химии и лабораторной медицины (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC). Содержание общего и прямого билирубина измеряли методом конечной точки с солью 4-нитробензолдиазония и с диазотированной сульфаниловой кислотой соответственно. СКФ рассчитывали по формуле Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD – EPI) при помощи онлайн-калькулятора [14].

Уровень ТТГ и пролактина определяли с помощью тест-систем Thyrotropin (TSH) и Prolactin Hormone (PRL) Elisa Monobind Inc. (США) на ИФА-анализаторе Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, США). Референсные значения указаны в инструкциях к используемым наборам (ТТГ – 0,39–6,16 мЕд/л, пролактин – 1,2–19,5 нг/мл). Концентрацию лептина измеряли методом мультиплексного анализа на проточном флуориметре MAGPIX (Luminex, США) с использованием панели Human Adipokine Panel 1 (Sigma-Aldrich, США).

Для оценки метаболического здоровья использовали критерии Международной федерации диабета (IDF), 2005 г. [15] для диагностики метаболического синдрома: ОТ  $\geq 80$  см при наличии двух и более дополнительных критериев (ТГ  $\geq 1,7$  ммоль/л; ХС ЛПВП  $< 1,3$  ммоль/л; артериальное давление  $\geq 130/85$  мм рт. ст.; ГПН  $\geq 5,6$  ммоль/л); женщины без метаболического синдрома и с его наличием считались соответственно метаболически здоровыми и нездоровыми. Дополнительно использовали критерии National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP АТР III), 2001 [16]: ОТ больше 88 см, ТГ  $\geq 1,7$  ммоль/л, ХС ЛПВП  $< 1,3$  ммоль/л у женщин, ГПН  $\geq 6,1$  ммоль/л; метаболически здоровым признавался фенотип при наличии не более двух любых критериев.

Статистическая обработка включала в себя создание и автоматизированную проверку базы

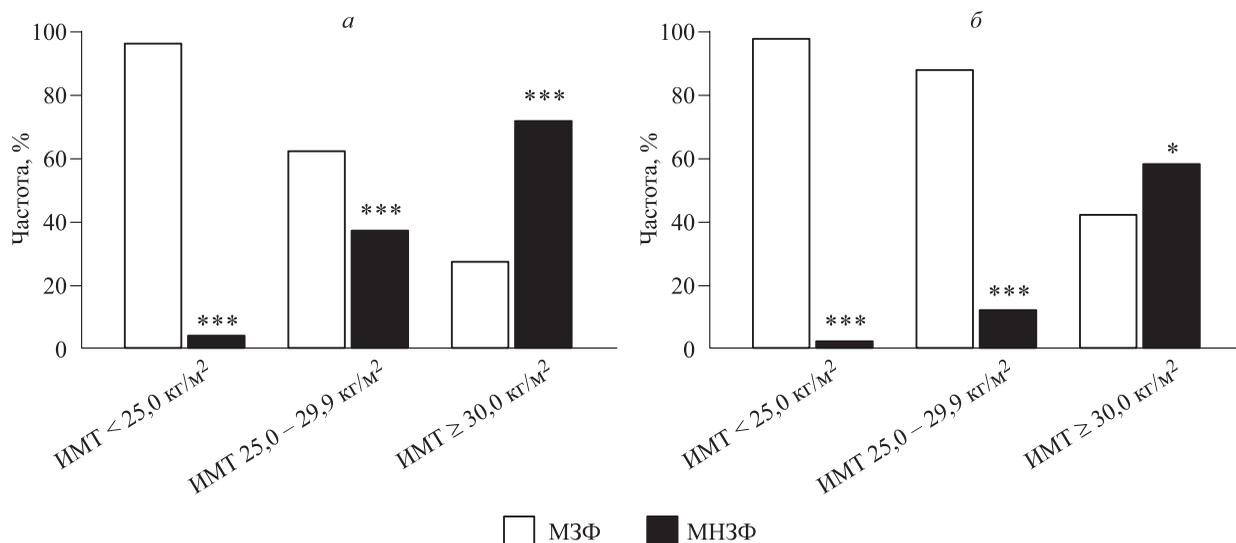
данных, статистический анализ. С целью оценки распределения переменных проведен тест Колмогорова – Смирнова. При распределении, отличном от нормального, данные представлены в виде Ме [25; 75], где Ме – медиана выборки, [25; 75] – 25-й и 75-й процентиля, при нормальном распределении – в виде  $M \pm SD$ , где  $M$  – среднее арифметическое значение,  $SD$  – стандартное отклонение. Непараметрический критерий Манна – Уитни применялся для сравнения двух независимых групп по количественным признакам с ненормальным распределением. Для анализа чувствительности и специфичности диагностического теста проведен ROC-анализ с определением площади под ROC-кривой (AUC) – показателя, используемого для получения численного значения клинической значимости теста, где значения AUC 0,9–1,0 рассматриваются как отличное качество модели, 0,8–0,9 – очень хорошее, 0,7–0,8 – хорошее, 0,6–0,7 – удовлетворительное, 0,5–0,6 – неудовлетворительное. Для определения статистической значимости качественных признаков применяли метод Пирсона ( $\chi^2$ ). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом НИИТПМ – филиала ИЦиГ СО РАН, протокол № 53 от 17.12.2013.

## Результаты

Возраст обследованных составил  $36,3 \pm 5,4$  года, ИМТ –  $25,0 \pm 5,7$  кг/м<sup>2</sup>, распространенность нормальной массы тела – 61,1 % ( $n = 400$ ), ИМТ  $25,0$ – $29,9$  кг/м<sup>2</sup> – 23,7 % ( $n = 155$ ), ожирения – 15,2 % ( $n = 100$ ). Частота МЗФ в изучаемой выборке составила по критериям IDF, 2005 77,7 %, МНЗФ – 22,3 % ( $p < 0,0001$ ), по критериям NCEP АТР III, 2001 – 86,9 и 13,1 % соответственно ( $p < 0,0001$ ). Во всей изучаемой выборке частота МЗФ оказалась выше при использовании критериев NCEP АТР III, 2001 ( $p < 0,0001$ ).

Данные о распространенности метаболически здорового и нездорового профиля у женщин 25–44 лет с разным ИМТ представлены на рис. 1. Обнаружено, что МЗФ по всем изучаемым классификациям у молодых женщин встречается тем реже, чем больше их ИМТ. Так, по критериям IDF, 2005 частота МЗФ в группе с нормальной массой тела была в 24 раза выше, чем МНЗФ ( $p < 0,0001$ ), при избытке массы тела – в 2 раза больше ( $p < 0,0001$ ), при ожирении, напротив, МНЗФ встречался в 2,6 раза чаще, чем МЗФ ( $p < 0,0001$ ). По критериям NCEP АТР III, 2001 частота МЗФ в группе с ИМТ  $< 25,0$  кг/м<sup>2</sup> и при ИМТ  $25,0$ – $29,9$  кг/м<sup>2</sup> была больше, чем частота МНЗФ, соответственно в 43,3 и 7,2 раза ( $p < 0,0001$ ), при ИМТ  $\geq 30,0$  кг/м<sup>2</sup> – в 1,4 раза меньше ( $p = 0,025$ ).



**Рис. 1.** Частота метаболического здоровья и нездоровья у женщин 25–44 лет при разных значениях ИМТ по критериям IDF, 2005 (а) и NCEP ATP III, 2001 (б). Обозначены статистически значимые отличия от величины показателя женщин с МЗФ: \* – при  $p < 0,05$ , \*\*\* – при  $p < 0,0001$

**Fig. 1.** The frequency of metabolic healthy / unhealthy phenotypes in women aged 25–44 years with different values of body mass index according to IDF criteria, 2005 (a) and NCEP ATP III criteria, 2001. Statistically significant differences from the value of women with MHF are indicated: \* – at  $p < 0.05$ , \*\*\* – at  $p < 0.0001$

Проанализированы тренды клинико-лабораторных показателей у женщин с МЗФ и МНЗФ с разной массой тела (табл. 1). В группе метаболически здоровых женщин по мере повышения ИМТ отмечено статистически достоверное повышение среднего возраста, в группе с МНЗФ таких отличий не зафиксировано. Как среди метаболически здоровых, так и у метаболически нездоровых молодых женщин по мере повышения ИМТ выявлено увеличение всех изученных антропометрических показателей (ОТ, ОБ, индекса ОТ/ОБ). В группе с МЗФ АД также возрастало, в группе с МНЗФ отмечено снижение систолического (САД) и диастолического АД (ДАД). Показатели липидного профиля и ГПН не отличались в группах МЗФ и МНЗФ при разных значениях ИМТ ( $p > 0,05$ ). Среди метаболически нездоровых женщин по мере увеличения ИМТ повышались активность ЩФ и содержание прямого билирубина. В группе метаболически здоровых участниц обнаружено значимое снижение концентрации общего билирубина при увеличении ИМТ. Уровень лептина возрастал как среди лиц с МЗФ, так и среди участниц с МНЗФ. Одной из целей нашей работы было изучение ассоциации между содержанием гормонов (ТТГ, пролактин, лептин) и метаболическим здоровьем у женщин. Средний уровень ТТГ в первом квартале составил  $0,7 \pm 0,2$  мЕд/л, во втором –  $1,3 \pm 0,2$  мЕд/л, в третьем –  $1,8 \pm 0,2$  мЕд/л, в четвертом –  $3,7 \pm 1,8$  мЕд/л. Обнаружено, что частота МЗФ и МНЗФ у молодых женщин значимо не ме-

нялась по мере увеличения уровня ТТГ (табл. 2). Содержание пролактина в первом квартале составило 4,6 [3,6; 5,5] нг/мл, во втором – 9,4 [8,0; 10,8] нг/мл, в третьем – 14,9 [13,5; 16,2] нг/мл, в четвертом – 24,5 [20,9; 30,1] нг/мл, при повышении уровня пролактина частота МЗФ и МНЗФ не менялась. Таким образом, концентрация ТТГ и пролактина у женщин 25–44 лет одинакова при разных метаболических фенотипах.

Содержание лептина составило у женщин с нормальной массой тела 8,1 [3,2; 14,5] нг/мл, с избытком массы тела – 16,2 [8,9; 23,1] нг/мл, с ожирением – 24,4 [16,1; 29,4] нг/мл ( $p_{1/2} < 0,0001$ ,  $p_{1/3} < 0,0001$ ,  $p_{2/3} < 0,0001$ ). В первом квартале оно равнялось 2,6 [1,6; 4,2] нг/мл, во втором – 9,1 [6,6; 10,4], в третьем – 15,5 [13,7; 17,5], в четвертом – 27,5 [23,2; 31,6] нг/мл. В квартилях лептина при нормальной массе тела (ИМТ  $< 25,0 \text{ кг/м}^2$ ) отмечается уменьшение частоты МЗФ, при избыточной массе тела – напротив, увеличение, при ожирении частота МНЗФ повышалась (см. табл. 2). Во всей выборке в квартилях лептина частота МЗФ снижалась, а частота МНЗФ возрастала. Также отмечено, что во всей выборке в первом и втором квартилях лептина выше частота МЗФ, чем МНЗФ, а в четвертом квартале чаще регистрировался МНЗФ (см. табл. 2).

В связи с отсутствием нормативных значений уровня лептина, пролактина и ТТГ для метаболически нездоровых женщин нами построена ROC-кривая для определения порогового значения. Так как не получено статистических различий со-

**Таблица 1.** Клинико-гормональные характеристики метаболически здоровых и нездоровых женщин 25–44 лет с разной массой тела  
**Table 1.** Clinical and hormonal characteristics of metabolically healthy and unhealthy women aged 25–44 with different body weights

Показатель	МЗФ			p	МНЗФ			p
	ИМТ < 25,0 кг/м <sup>2</sup> (n = 384)	ИМТ 25,0–29,9 кг/м <sup>2</sup> (n = 97)	ИМТ ≥ 30,0 кг/м <sup>2</sup> (n = 28)		ИМТ < 25,0 кг/м <sup>2</sup> (n = 16)	ИМТ 25,0–29,9 кг/м <sup>2</sup> (n = 58)	ИМТ ≥ 30,0 кг/м <sup>2</sup> (n = 72)	
Возраст, лет	35,5 ± 5,5 35,6 [31,1; 40,6]	36,9 ± 5,3 37,8 [31,9; 41,0]	37,1 ± 5,0 37,6 [34,0; 41,8]	<b>0,039</b>	37,8 ± 5,0 39,2 [33,3; 41,9]	37,3 ± 5,1 38,3 [33,5; 41,3]	38,7 ± 4,6 40,4 [34,9; 42,6]	0,237
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	21,4 ± 2,0 21,6 [20,0; 22,9]	27,0 ± 1,4 26,8 [25,8; 28,1]	34,6 ± 5,2 32,6 [31,2; 37,7]	<b>&lt;0,0001</b>	23,5 ± 1,2 23,6 [22,7; 24,6]	27,3 ± 1,6 27,1 [26,0; 28,9]	35,8 ± 5,6 33,3 [31,8; 39,6]	<b>&lt;0,0001</b>
ОГ, см	72,0 ± 6,2 71,9 [67,4; 76,0]	82,8 ± 6,3 82,0 [78,8; 86,6]	98,5 ± 9,7 96,9 [90,5; 103,0]	<b>&lt;0,0001</b>	83,5 ± 3,0 83,0 [81,0; 85,0]	87,6 ± 5,1 86,8 [83,8; 90,9]	102,3 ± 11,2 101,5 [96,0; 108,8]	<b>&lt;0,0001</b>
ОБ, см	95,0 ± 5,5 95,0 [91,5; 98,4]	105,3 ± 6,1 105,0 [102,0; 108,7]	119,8 ± 10,5 117,1 [113,2; 126,6]	<b>&lt;0,0001</b>	102,1 ± 4,0 101,4 [99,9; 105,0]	106,2 ± 4,7 105,7 [102,3; 108,9]	121,0 ± 11,0 119,1 [113,0; 127,9]	<b>&lt;0,0001</b>
ОГ/ОБ	0,76 ± 0,05 0,75 [0,73; 0,79]	0,79 ± 0,06 0,79 [0,75; 0,83]	0,82 ± 0,05 0,83 [0,79; 0,85]	<b>&lt;0,0001</b>	0,82 ± 0,04 0,81 [0,79; 0,84]	0,83 ± 0,04 0,82 [0,80; 0,85]	0,85 ± 0,06 0,86 [0,82; 0,89]	<b>0,001</b>
САД, мм рт. ст.	110,2 ± 10,8 109,0 [103,1; 117,0]	111,9 ± 9,2 111,0 [106,3; 117,5]	117,4 ± 10,3 118,8 [112,0; 124,4]	<b>&lt;0,0001</b>	132,0 ± 27,1 128,8 [112,5; 140,8]	120,7 ± 15,1 119,5 [110,8; 127,9]	130,3 ± 16,5 130,8 [121,1; 138,3]	<b>0,001</b>
ДАД, мм рт. ст.	71,9 ± 8,5 71,3 [66,5; 76,9]	73,4 ± 8,3 73,0 [69,5; 79,0]	75,5 ± 9,4 77,8 [69,0; 82,3]	<b>&lt;0,0001</b>	86,8 ± 16,7 86,8 [72,1; 97,5]	79,6 ± 10,9 80,3 [71,5; 86,1]	85,9 ± 11,0 85,8 [79,5; 91,9]	<b>0,006</b>
Содержание глюкозы, ммоль/л	5,4 ± 0,5 5,4 [5,0; 5,7]	5,4 ± 0,5 5,4 [5,1; 5,7]	5,4 ± 0,6 5,4 [4,9; 5,7]	0,861	5,8 ± 0,3 5,8 [5,6; 6,1]	5,9 ± 0,5 5,9 [5,6; 6,2]	6,0 ± 0,6 5,9 [5,6; 6,2]	0,618
Содержание ОХС, ммоль/л	4,8 ± 0,9 4,7 [4,2; 5,4]	4,9 ± 0,8 4,9 [4,3; 5,5]	5,0 ± 0,7 4,9 [4,4; 5,7]	0,193	5,0 ± 1,0 4,7 [4,2; 5,5]	5,2 ± 0,9 5,2 [4,4; 5,9]	5,2 ± 1,0 5,2 [4,4; 5,9]	0,441
Содержание ХС ЛПВП, ммоль/л	1,5 ± 0,3 1,4 [1,3; 1,7]	1,5 ± 0,2 1,5 [1,3; 1,6]	1,5 ± 0,3 1,4 [1,3; 1,6]	<b>&lt;0,0001</b>	1,2 ± 0,3 1,1 [1,1; 1,5]	1,2 ± 0,3 1,2 [1,1; 1,3]	1,2 ± 0,2 1,2 [1,1; 1,3]	0,934
Содержание ХС ЛПНП, ммоль/л	2,9 ± 0,8 2,9 [2,3; 3,5]	3,0 ± 0,7 3,1 [2,5; 3,6]	3,2 ± 0,7 3,1 [2,7; 3,6]	0,864	3,2 ± 1,0 3,1 [2,6; 3,8]	3,2 ± 0,9 3,3 [2,7; 3,9]	3,3 ± 0,8 3,3 [2,7; 3,9]	0,751
Содержание ТГ, ммоль/л	0,8 ± 0,4 0,7 [0,6; 1,0]	0,9 ± 0,4 0,9 [0,6; 1,1]	0,9 ± 0,3 0,9 [0,6; 1,1]	0,067	1,1 ± 0,5 1,0 [0,7; 1,5]	1,6 ± 1,4 1,3 [0,9; 2,0]	1,4 ± 0,7 1,1 [0,9; 1,8]	0,172

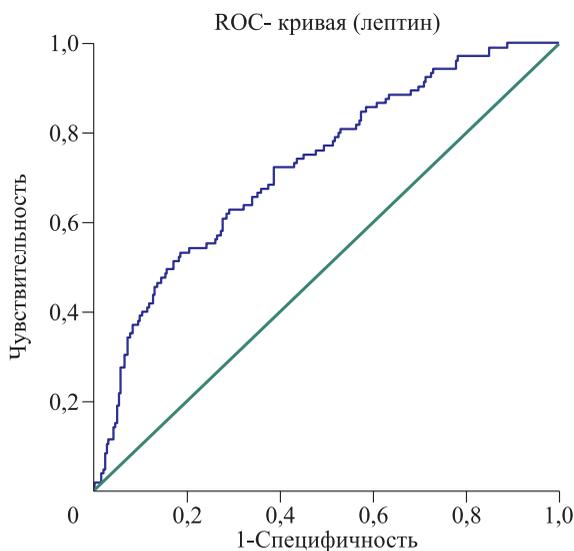
Содержание креатинина, мкмоль/л	71,7 ± 9,4 71,0 [66,0; 76,0]	70,5 ± 7,8 70,0 [63,8; 74,3]	69,7 ± 7,0 69,0 [64,8; 74,5]	0,499	69,3 ± 6,8 66,0 [64,0; 74,5]	69,3 ± 8,8 68,5 [63,3; 74,0]	71,5 ± 8,6 70,0 [66,0; 75,0]	0,357
СКФ, мл/ин/1,7м <sup>2</sup>	95,7 ± 13,4 96,0 [87,0; 106,0]	96,3 ± 13,2 95,5 [86,0; 107,0]	97,3 ± 12,3 96,0 [89,0; 107,0]	0,932	98,1 ± 10,8 102,0 [90,0; 107,0]	97,6 ± 13,0 98,0 [89,5; 108,8]	94,9 ± 12,0 94,0 [87,0; 102,0]	0,200
Активность АЛАТ, Ед/л	6,3 ± 8,5 4,0 [4,0; 6,0]	5,6 ± 2,2 5,0 [4,0; 6,3]	5,8 ± 2,2 5,0 [4,0; 7,0]	0,379	4,7 ± 1,0 4,0 [4,0; 6,0]	8,4 ± 6,2 5,5 [4,0; 11,8]	7,1 ± 5,5 5,0 [4,0; 8,3]	0,296
Активность АсАТ, Ед/л	12,3 ± 20,9 10,0 [7,0; 13,0]	11,0 ± 6,2 10,0 [7,0; 13,0]	10,7 ± 4,0 10,0 [7,5; 14,0]	0,938	9,2 ± 4,9 8,5 [4,8; 13,8]	10,4 ± 4,4 9,0 [7,3; 13,5]	12,6 ± 9,4 11,0 [7,8; 13,0]	0,574
Активность ГГТП, Ед/л	22,8 ± 15,9 19,0 [16,0; 25,0]	25,4 ± 23,5 20,5 [15,8; 28,3]	29,7 ± 15,3 27,0 [18,5; 32,5]	0,063	37,3 ± 23,8 25,5 [21,3; 63,0]	31,2 ± 11,6 30,5 [23,3; 38,3]	33,3 ± 20,2 29,5 [21,8; 37,3]	0,914
Активность ЩФ, Ед/л	127,9 ± 38,9 124,0 [103,0; 145,0]	131,3 ± 36,5 133,0 [100,0; 161,0]	152,5 ± 44,3 148,0 [112,5; 193,5]	0,114	114,3 ± 21,9 105,0 [101,0; 131,0]	162,0 ± 40,9 161,0 [127,5; 182,8]	159,4 ± 39,7 156,5 [132,0; 179,5]	0,010
Содержание общего билирубина, мкмоль/л	8,4 ± 8,1 6,7 [5,0; 9,9]	6,6 ± 3,2 5,9 [4,3; 8,0]	5,8 ± 3,1 4,5 [3,6; 8,0]	0,032	4,7 ± 1,8 4,2 [3,3; 6,8]	6,4 ± 3,4 5,8 [3,9; 8,4]	6,0 ± 2,9 5,0 [4,0; 7,1]	0,340
Содержание прямого билирубина, мкмоль/л	3,4 ± 18,6 1,6 [1,1; 2,5]	1,8 ± 1,0 1,7 [1,1; 2,3]	1,7 ± 1,3 1,4 [0,9; 2,1]	0,571	1,0 ± 0,4 1,0 [0,6; 1,4]	2,2 ± 1,7 1,8 [1,0; 3,3]	1,5 ± 1,1 1,2 [0,9; 1,8]	0,031
Содержание ТТГ, мЕд/л	1,7 ± 1,3 1,4 [1,0; 2,0]	1,8 ± 1,5 1,5 [1,0; 2,1]	2,2 ± 1,8 1,8 [1,0; 2,9]	0,507	1,8 ± 1,0 1,1 [1,0; 2,9]	1,9 ± 1,1 1,8 [1,4; 2,6]	2,2 ± 2,0 1,5 [0,9; 2,6]	0,932
Содержание пролактина, нг/мл	14,4 ± 9,2 12,9 [7,3; 19,5]	13,7 ± 10,6 12,2 [5,9; 16,3]	12,4 ± 6,0 12,1 [6,6; 15,6]	0,528	16,0 ± 8,8 13,4 [10,9; 20,7]	12,5 ± 9,1 9,9 [5,5; 16,7]	14,5 ± 12,9 10,0 [5,7; 16,2]	0,411
Содержание лептина, нг/мл	9,3 ± 7,4 7,9 [3,1; 14,5]	18,5 ± 10,7 18,1 [10,3; 25,0]	22,8 ± 11,0 23,9 [13,9; 26,9]	<0,0001	13,9 ± 9,8 11,3 [5,6; 26,0]	15,5 ± 9,4 13,6 [7,9; 22,0]	24,3 ± 11,0 25,3 [16,1; 29,7]	<0,0001

**Таблица 2.** Частота метаболически здорового и нездорового фенотипа в квартилях уровня тиреотропного гормона, пролактина и лептина, n (%)  
**Table 2.** Frequency of metabolically healthy and unhealthy phenotype in quartiles of thyroid-stimulating hormone, prolactin, and leptin levels, n (%)

ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	Метаболический профиль	Содержание ТТГ				Содержание пролактина				Содержание лептина				p <sub>2</sub>		
		Q <sub>1</sub> (0,1–1,0 МЕд/л)	Q <sub>2</sub> (1,0–1,5 МЕд/л)	Q <sub>3</sub> (1,5–2,2 МЕд/л)	Q <sub>4</sub> (2,2–10,4 МЕд/л)	p <sub>2</sub>	Q <sub>1</sub> (1,5–6,7 нг/мл)	Q <sub>2</sub> (6,7–12,1 нг/мл)	Q <sub>3</sub> (12,1–18,8 нг/мл)	Q <sub>4</sub> (18,8–63,1 нг/мл)	p <sub>2</sub>	Q <sub>1</sub> (1,6–10,7 нг/мл)	Q <sub>2</sub> (10,9–21,1 нг/мл)		Q <sub>3</sub> (21,8–40,4 нг/мл)	Q <sub>4</sub> (40,4–134,5 нг/мл)
<25,0	МЗФ	47 (24,1)	60 (30,8)	47 (24,1)	41 (21,0)	0,467	43 (21,9)	49 (25,0)	48 (24,5)	56 (28,6)	0,132	76 (37,4)	63 (31,0)	50 (24,6)	14 (6,9)	<0,0001
	МНЗФ	0	3 (60,0)	0	2 (40,0)	0	0	3 (50,0)	2 (33,3)	1 (16,7)	0	3 (27,3)	3 (27,3)	2 (18,2)	3 (27,3)	>0,05
	p <sub>1</sub>	0	0,166	0	0,309		0	0,169	0,622	0,524		0,497	0,793	0,628	0,016	
25,0–29,9	МЗФ	14 (26,4)	14 (26,4)	13 (24,5)	12 (22,6)	0,652	15 (28,3)	10 (18,9)	17 (32,1)	11 (20,8)	0,369	5 (10,2)	9 (18,4)	15 (30,6)	20 (40,8)	<0,001
	МНЗФ	7 (21,9)	2 (6,3)	14 (43,8)	9 (28,1)	0,566	10 (32,3)	9 (29,0)	5 (16,1)	7 (22,6)	0,396	6 (15,8)	9 (23,7)	11 (28,9)	12 (31,6)	0,110
	p <sub>1</sub>	0,639	0,024	0,069	0,572		0,703	0,286	0,113	0,844		0,439	0,545	0,867	0,378	
≥30,0	МЗФ	4 (26,7)	1 (6,7)	4 (26,7)	6 (40,0)	0,445	4 (26,7)	4 (26,7)	4 (26,7)	3 (20,0)	0,669	0	3 (23,1)	3 (23,1)	7 (53,8)	>0,05
	МНЗФ	12 (27,9)	7 (16,3)	8 (18,6)	16 (37,2)	0,360	14 (32,6)	11 (25,6)	10 (23,3)	8 (18,6)	0,142	2 (3,6)	6 (10,7)	12 (21,4)	36 (64,3)	<0,0001
	p <sub>1</sub>	0,967	0,357	0,510	0,849		0,673	0,934	0,791	0,906		0	0,237	0,897	0,486	
Вся выборка	МЗФ	65 (24,7)	75 (28,5)	64 (24,3)	59 (22,4)	0,538	62 (23,5)	63 (23,9)	69 (26,1)	70 (26,5)	0,422	81 (30,6)	75 (28,3)	68 (25,7)	41 (15,5)	<0,0001
	МНЗФ	19 (23,8)	12 (15,0)	22 (27,5)	27 (33,8)	0,164	24 (30,0)	23 (28,8)	17 (21,3)	16 (20,0)	0,146	11 (10,5)	18 (17,1)	25 (23,8)	51 (48,6)	<0,0001
	p <sub>1</sub>	0,861	0,015	0,568	0,042		0,239	0,377	0,377	0,239		<0,001	0,026	0,712	<0,0001	

**Примечание.** p<sub>1</sub> – вероятность различий между группами МЗФ и МНЗФ; p<sub>2</sub> – вероятность различий между Q<sub>1</sub> и Q<sub>4</sub>.

**Note.** p<sub>1</sub> is the probability of differences between the MHP and MUNP groups; p<sub>2</sub> is the probability of differences between Q<sub>1</sub> and Q<sub>4</sub>.



**Рис. 2.** ROC-анализ связи уровня лептина и МНЗФ у молодых женщин

**Fig. 2.** ROC analysis of leptin levels and MUHP in young women

держания пролактина и ТТГ между метаболически здоровыми и нездоровыми женщинами, поиск отрезных точек для распознавания МНЗФ по уровню данных гормонов не целесообразен. Построенная ROC-кривая для определения отрезной точки лептина для выявления МНЗФ представлена на рис. 2. Данная модель показала хорошее качество AUC для диагностики МНЗФ по критериям IDF, 2005 (0,727, SE = 0,029,  $p < 0,0001$ ). Пороговое значение уровня лептина у молодых женщин составило 18,3 нг/мл при максимальной чувствительности и специфичности (Se = 53,3 %, Sp = 81,5 %), 14,5 нг/мл – при равенстве чувствительности и специфичности (Se = 65,7 %, Sp = 65,7 %).

## Обсуждение

Данные о распространенности МЗФ и МНЗФ в современной литературе представлены в виде немногочисленных и достаточно неоднозначных исследований, при этом преимущественно оценивается распространенность метаболически здорового ожирения. Е.В. Островская и соавт. сообщали, что на территории Московской области при ретроспективном анализе медицинской документации женщин с ожирением по ИМТ в возрасте 18–60 лет за 2003–2015 гг. ( $n = 389$ ) распространенность МЗФ по критериям IDF, 2005 составила 38,6 % [17]. В сибирской популяции женщин старшей возрастной группы с ожирением ( $n = 2340$  человек с ИМТ  $\geq 30,0$  кг/м<sup>2</sup>, средний возраст  $58,2 \pm 6,8$  года) частота МЗФ по критериям IDF составила 25,0 %, по критериям NCEP

АТР III, 2001 – 43,0 % [18]. Нами изучена выборка молодых женщин, в которой при ожирении распространенность МЗФ составляет 28,0 % по критериям IDF, 2005 и 42,0 % по критериям NCEP АТР III, 2001.

Результаты Фрамингемского исследования (1998–2001 гг.) показали, что при оценке по классификации NCEP АТР III, 2001 распространенность МЗФ среди женщин ( $n = 2235$ , средний возраст 44,7 года) без ожирения составила 66,2 %, с ожирением – 4,8 %, МНЗФ при нормальной массе тела – 21,0 %, метаболически нездорового ожирения – 8,0 % [19]. В нашем исследовании частота МЗФ составила 77,7 % при использовании критериев IDF, 2005 и 86,9 % – согласно критериям NCEP АТР III, 2001.

По данным метаанализа BioSHARe – EU Healthy Obese, включавшего в себя данные десяти крупных исследований распространенности МЗФ в разных европейских странах ( $n = 163\,517$  человек, 18–80 лет) по единым критериям (NCEP АТР III, 2001 г.), частота МЗФ в Европе среди женщин колеблется от 7 % в Финляндии (Health2000, 2000 г.) до 28 % в Великобритании (NCDS, 2002 г.). Авторы обзора отмечают, что даже при оценке по единой системе критериев получены значительные отличия в распространенности МЗФ в различных европейских странах [20]. Наиболее сопоставимы с нашими результатами (42,0 % по критериям NCEP АТР III, 2001) данные британского исследования NCDS (National Child Development Study – Национальное исследование развития детей отслеживает жизнь первых 17415 человек, родившихся в Англии, Шотландии и Уэльсе за одну неделю 1958 г.), согласно которому среди 796 женщин с ожирением 38,4 % были метаболически здоровыми [20].

Нами установлено, что метаболически нездоровые женщины при любом значении ИМТ имели более высокие величины ОТ, индекса ОТ/ОБ, САД, ДАД, содержание ГПН, ТГ и меньшую концентрацию ХС ЛПВП. Полученные в описываемом исследовании данные по ожирению совпадают с результатами первой волны скрининга ЭССЕ-РФ («Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах Российской Федерации»), проведенного в 2012–2013 гг. в г. Санкт-Петербурге ( $n = 1600$  человек, из них 64,0 % женщин, средний возраст  $48,1 \pm 11,4$  года), в котором установлено, что у метаболически нездоровых лиц с ожирением по сравнению с метаболически здоровыми участниками были больше ОТ (соответственно  $106,6 \pm 10,7$  и  $100,7 \pm 11,3$  см,  $p < 0,0001$ ), ИМТ ( $33,1$  [31,4; 36,3] и  $32,4$  [31,2; 34,3] кг/м<sup>2</sup>,  $p = 0,019$ ), индекс ОТ/ОБ (0,92 [0,86; 0,98] и 0,89 [0,82; 0,97],  $p = 0,008$ ), САД (140,0 [130,0; 150,0] и 123,3 [117,8; 136,0] мм рт. ст.,

$p < 0,0001$ ), ДАД (87,8 [80,0; 94,8] и 80,0 [73,3; 85,2] мм рт. ст.,  $p < 0,0001$ ), содержание ТГ (1,8 [1,3; 2,5] и 1,1 [0,9; 1,4] ммоль/л,  $p < 0,0001$ ), ГПН (5,6 [5,1; 6,1] и 5,1 [4,8; 5,4] ммоль/л,  $p < 0,0001$ ), а уровень ХС ЛПВП – меньше (соответственно 1,1 [1,0; 1,3] и 1,4 [1,2; 1,6] ммоль/л,  $p < 0,0001$ ) [21].

В нашем исследовании при нормальной массе тела у женщин с МНЗФ по сравнению с лицами с МЗФ получены достоверно более высокие значения ИМТ (соответственно  $23,5 \pm 1,2$  и  $21,4 \pm 2,0$  кг/м<sup>2</sup>,  $p < 0,0001$ ) и ОБ ( $102,1 \pm 4,0$  и  $95,0 \pm 5,5$  см,  $p < 0,0001$ ). Можно предположить, что, хотя масса тела по критериям ВОЗ в данной подгруппе соответствует нормальной, у метаболически нездоровых женщин уже набрана критическая масса абдоминальной жировой ткани, необходимая для развития метаболических нарушений: у женщин с МНЗФ с ИМТ  $< 25,0$  кг/м<sup>2</sup> ОТ составила  $83,5 \pm 3,0$  см, что соответствует абдоминальному ожирению (ОТ  $> 80$  см), тогда как у участниц из той же подгруппы с МЗФ она равнялась  $72,0 \pm 6,2$  см ( $p < 0,0001$ ).

Публикации по анализу МЗФ и МНЗФ при нормальной массе тела немногочисленны, в российских журналах в основном представлены клинические работы. Так, например, В.С. Чулков и соавт. сообщали, что в 2013–2016 гг. при анализе клинико-лабораторных характеристик лиц в возрасте 18–44 лет ( $n = 251$ , их них 50,6 % женщин) выявлены следующие особенности. При разделении всех участников на группы согласно ИМТ и метаболическому профилю (метаболически здоровые с нормальной массой тела, метаболически нездоровые с нормальной массой тела, МЗФО, МНЗФО) оказалось, что лица с МНЗФО имели самые высокие показатели возраста, ИМТ, уровня ГПН, ОХС, ХС ЛПНП, ТГ и самое низкое содержание ХС ЛПВП ( $p < 0,05$ ) по сравнению с другими группами. Также отмечено, что уровень ОХС у метаболически нездоровых участников с нормальной массой тела был больше, чем в группах метаболически здоровых с нормальным весом и МЗФО [22]. В нашем исследовании концентрация ОХС и ХС ЛПНП значимо не различалась при разных метаболических профилях.

По полученным нами данным, частота МЗФ и МНЗФ в квартилях ТТГ и пролактина у молодых женщин значимо не менялась.

Как установлено в упомянутом выше исследовании ЭССЕ-РФ, среди участников с ожирением ( $n = 416$ ) лица с МЗФО и МНЗФО не отличались друг от друга по содержанию лептина (24,6 [16,7; 41,0] и 24,4 [14,4; 43,3] нг/мл соответственно,  $p = 0,667$ ), т.е. на распространенность МЗФ и МНЗФ оно не влияло [21]. В исследовании, проведенном в Испании в 2008–2010 гг. ( $n = 11540$ ,

50,5 % женщин, возраст  $46,9 \pm 17,0$  года), изучался уровень лептина при различных кардио-метаболических нарушениях. Его содержание составило 24,5 [14,1–37,0] нг/мл у женщин и 7,2 [3,3–14,3] нг/мл у мужчин. Метаболически нездоровые лица имели более высокую концентрацию лептина, чем метаболически здоровые лица с нормальным весом ( $p < 0,001$ ) [23]. В нашем исследовании у женщин с нормальной массой тела в квартилях лептина частота МЗФ снижалась, а при избыточной массе – возрастала, при ожирении частота МНЗФ значимо увеличивалась; в отношении всей выборки отмечено уменьшение частоты МЗФ и увеличение встречаемости МНЗФ.

Нами не обнаружены публикации, в которых проводится оценка распространенности МЗФ и МНЗФ при разных значениях массы тела у лиц с разным уровнем лептина. Если рассуждать в теоретическом ключе, то нужно сказать, что поскольку концентрация лептина прямо коррелирует с массой жировой ткани [8], выглядит логичным увеличение его содержания у лиц с ожирением. Но как объяснить взаимосвязь данного гормона с частотой МЗФ и МНЗФ? Вероятно, одним из ключевых моментов является уже упомянутое нами ранее абдоминальное ожирение. В нашем исследовании установлено, что у женщин с МНЗФ ОТ и индекс ОТ/ОБ больше, чем у метаболически здоровых участниц при любом значении ИМТ ( $p < 0,0001$  для всех групп). Известно, что по мере увеличения массы абдоминального жира нарастают проявления так называемого мезенхимального (или низкоинтенсивного) воспаления, в ходе которого возникает и прогрессирует дисбаланс различных медиаторов воспаления – адипокинов (адипоцитокинов), одним из которых является лептин [24]. В данном контексте кажется вполне объяснимым и даже закономерным снижение частоты метаболически здорового профиля по мере увеличения содержания лептина.

Учитывая, что лептин не рассматривается в качестве маркера метаболического здоровья или нездоровья, нам было интересно изучить, какой уровень лептина ассоциирован с МНЗФ. По нашим данным, в выборке женщин в возрасте 25–44 лет содержание лептина, ассоциированное с кардиометаболическими нарушениями, составляет 18,3 нг/мл, AUC = 0,727 (SE = 0,029,  $p < 0,0001$ ), Se = 53,3 %, Sp = 81,5 %. T. Gijón-Conde et al. также изучали способность лептина распознавать наличие метаболического синдрома. Анализ ROC-кривой показал, что пороговый уровень лептина для выявления кардиометаболических нарушений составил 23,75 нг/мл для женщин (AUC = 0,722, Se = 72,3 %, Sp = 58,7 %), 6,45 нг/мл – для мужчин (AUC = 0,716, Se = 71,4 %, Sp = 60,2 %) [23].

## Заключение

Распространенность МНЗФ у молодых женщин г. Новосибирска в 3,5 раза меньше, чем встречаемость МЗФ, по критериям IDF, 2005 (22,3 и 77,7 % соответственно), и в 6,6 раза – по критериям NCEP АТР III, 2001 (соответственно 13,1 и 86,9 %). Распространенность МНЗФ увеличивается по мере роста ИМТ с 4,0 до 72,0 % по критериям IDF, 2005 и с 2,3 до 58,0 % по критериям NCEP АТР III, 2001. У женщин с ожирением МНЗФ определен в два раза чаще, чем МЗФ (соответственно 72 и 28 % по критериям IDF, 2005, и 58 и 42 % по критериям NCEP АТР III, 2001). У лиц с разными метаболическими фенотипами по мере увеличения ИМТ повышается САД как основной фактор риска ССЗ. ТТГ и пролактин не дают информации о метаболическом здоровье у молодых женщин. Содержание лептина ассоциировано с ИМТ. По данным ROC-анализа, уровень лептина более 18,3 нг/мл определен как один из маркеров для распознавания МНЗФ у женщин в возрасте 25–44 лет независимо от ИМТ.

## Список литературы

1. Драпкина О.М., Елиашевич С.О., Шепель Р.Н. Ожирение как фактор риска хронических неинфекционных заболеваний. *Рос. кардиол. ж.* 2016;21(6):73–79. doi:10.15829/1560-4071-2016-6-73-79
2. Sims E.A. Are there persons who are obese, but metabolically healthy? *Metabolism.* 2001;50(12):1499–1504. doi: 10.1053/meta.2001.27213
3. Karelis A.D., Brochu M., Rabasa-Lhoret R., Garrel D., Poehlman E.T. Clinical markers for the identification of metabolically healthy but obese individuals. *Diabetes Obes. Metab.* 2004;6(6):456–457. doi: 10.1111/j.1462-8902.2004.00377.x
4. Мустафина С.В., Щербакова Л.В., Козупеева Д.А., Малютина С.К., Рагино Ю.И., Рымар О.Д. Распространенность метаболически здорового ожирения по данным эпидемиологического обследования выборки 45–69 лет г. Новосибирска. *Ожирение и метаболизм.* 2018;15(4):31–37. doi: 10.14341/ОМЕТ9615
5. Phillips C.M. Metabolically healthy obesity across the life course: epidemiology, determinants, and implications. *Ann. NY Acad. Sci.* 2017;1391(1):85–100. doi: 10.1111/nyas.13230
6. Косыгина А.В. Адипоцитокينات в научной и клинической практике. *Ожирение и метаболизм.* 2011;8(1):32–39. doi: 10.14341/2071-8713-5189
7. Chan J.L., Heist K., DePaoli A.M., Veldhuis J.D., Mantzoros C.S. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J. Clin. Invest.* 2003;111:1409–1421. doi: 10.1172/JCI17490
8. Farr O.M., Gavrieli A., Mantzoros C.S. Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity? *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2015;22(5):353–359. doi: 10.1097/MED.000000000000184
9. Jamar G., Caranti D.A., de Cassia Cesar H., Masquio D.C.L., Bandoni D.H., Pisani L.P. Leptin as a cardiovascular risk marker in metabolically healthy obese: Hyperleptinemia in metabolically healthy obese. *Appetite.* 2017;108:477–482. doi: 10.1016/j.appet.2016.11.013
10. Farkhondeh T., Llorens S., Pourbagher-Shahri A.M., Ashrafizadeh M., Talebi M., Shaki-baei M., Samarghandian S. An overview of the role of adipokines in cardiometabolic diseases. *Molecules.* 2020;25(21):5218. doi: 10.3390/molecules25215218
11. Teixeira P.F.D.S., dos Santos P.B., Pazos-Moura C.C. The role of thyroid hormone in metabolism and metabolic syndrome. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 2020;11:2042018820917869. doi: 10.1177/2042018820917869
12. Руюткина Л.А., Руюткин Д.С. Субклинический гипотиреоз и метаболический синдром: основания для медикаментозного вмешательства. *Ожирение и метаболизм.* 2020;17(1):41–47. doi: 10.14341/omet12282
13. Воевода С.М., Щербакова Л.В., Денисова Д.В., Шахтшнейдер Е.В., Рагино Ю.И., Стахнёва Е.М., Рымар О.Д. Связь атеросклероз-ассоциированных кардиоваскулярных факторов риска с разным уровнем пролактина у женщин репродуктивного возраста. *Атеросклероз.* 2018;14(4):67–72. doi: 10.15372/ATER20180407
14. Levin A., Stevens P.E. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: Behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. *Kidney Int.* 2014;85:49–61. doi: 10.1038/ki.2013.444
15. Мамедов М.Н. Консенсус Международной Федерации Диабета по определению метаболического синдрома: факты и комментарии. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии.* 2009;5(6):47–50. doi: 10.20996/1819-6446-2009-5-6-47-50
16. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285:2486–2497. doi: 10.1001/jama.285.19.2486
17. Островская Е.В., Романцова Т.И., Герасимов А.Н., Новоселова Т.Е. Распространенность метаболически здорового ожирения по данным выборки Московского региона. *Ожирение и метаболизм.* 2017;14(4):51–56.
18. Мустафина С.В., Винтер Д.А., Щербакова Л.В., Малютина С.К., Рагино Ю.И., Рымар О.Д. Половозрастные особенности распространенности

метаболически здорового фенотипа ожирения. *Бюл. сиб. мед.* 2020;19(1):76–84. doi: 10.20538/1682-0363-2020-1-76–84

19. Echouffo-Tcheugui J.B., Short M.I., Xanthakis V., Field P., Sponholtz T.R., Larson M.G., Vasan R.S. Natural history of obesity subphenotypes: dynamic changes over two decades and prognosis in the framingham heart study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019;104(3):738–752. doi: 10.1210/jc.2018-01321

20. van Vliet-Ostapchouk J.V., Nuotio M.L., Slagter S.N., Doiron D., Fischer K., Foco L., Gaye A., Gögele M., Heier M., Hiekkalinna T., ... Wolffenbuttel B.H.. The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies. *BMC Endocr. Disord.* 2014;14:9. doi: 10.1186/1472-6823-14-9

21. Бояринова М.А., Ротарь О.П., Ерина А.М., Паскарь Н.А., Алиева А.С., Могучая Е.В., Колесова Е.П., Конради А.О. Метаболически здоровое ожирение: предикторы трансформации в нездоровый фенотип в популяции жителей Санкт-Петербурга (по данным исследования ЭССЕ-РФ). *Артериал. гипертензия.* 2021;27(3):279–290. doi:10.18705/1607-419X-2021-27-3-279-290

22. Чулков В.С., Синицкий А.И., Вереина Н.К., Гаврилова Е.С., Чулков Вл.С., Мартынов С.А., Ткаченко П.Е. Факторы кардиометаболического риска при различных фенотипах ожирения в молодом возрасте. *Соврем. пробл. науки и образ.* 2020;6:181. doi: 10.17513/spno.30438

23. Gijón-Conde T., Graciani A., Guallar-Castillón P., Aguilera M.T., Rodríguez-Artalejo F., Bane-gas J.R. Leptin Reference values and cutoffs for identifying cardiometabolic abnormalities in the spanish population. *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed.)*. 2015;68(8):672–679. doi: 10.1016/j.rec.2014.08.015

24. Романцова Т.И., Островская Е.В. Метаболически здоровое ожирение: дефиниции, протективные факторы, клиническая значимость. *Альм. клин. мед.* 2015;S1:75–87. doi: 10.18786/2072-0505-2015-1-75-86

## References

1. Drapkina O.M., Eliashevich S.O., Shepel R.N. Obesity as a risk factor for chronic non-communicable diseases. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology.* 2016;(6):73–79. [In Russian]. doi: 10.15829/1560-4071-2016-6-73-79

2. Sims E.A. Are there persons who are obese, but metabolically healthy? *Metabolism.* 2001;50(12):1499–1504. doi: 10.1053/meta.2001.27213

3. Karelis A.D., Brochu M., Rabasa-Lhoret R., Garrel D., Poehlman E.T. Clinical markers for the identification of metabolically healthy but obese individuals. *Diabetes Obes. Metab.* 2004;6(6):456–457. doi: 10.1111/j.1462-8902.2004.00377.x

4. Mustafina S.V., Shcherbakova L.V., Kozupeva D.A., Malyutina S.K., Ragino Yu.I., Rymar O.D. The prevalence of metabolically healthy obesity: data from the epidemiological survey in of Novosibirsk. *Ozhireniye i metabolism = Obesity and Metabolism.* 2018;15(4):31–37. [In Russian]. doi:10.14341/omet9615

5. Phillips C.M. Metabolically healthy obesity across the life course: epidemiology, determinants, and implications. *Ann. NY Acad. Sci.* 2017;1391(1):85–100. doi: 10.1111/nyas.13230

6. Kosygina A.V. Adipocytokines in scientific and clinical practice. *Ozhireniye i metabolism = Obesity and Metabolism.* 2011;8(1):32–39. [In Russian]. doi: 10.14341/2071-8713-5189

7. Chan J.L., Heist K., DePaoli A.M., Veldhuis J.D., Mantzoros C.S. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J. Clin. Invest.* 2003;111:1409–1421. doi: 10.1172/JCI17490

8. Farr O.M., Gavrieli A., Mantzoros C.S. Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity? *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2015;22(5):353–359. doi: 10.1097/MED.000000000000184

9. Jamar G., Caranti D.A., de Cassia Cesar H., Masquio D.C.L., Bandoni D.H., Pisani L.P. Leptin as a cardiovascular risk marker in metabolically healthy obese: Hyperleptinemia in metabolically healthy obese. *Appetite.* 2017;108:477–482. doi: 10.1016/j.appet.2016.11.013

10. Farkhondeh T., Llorens S., Pourbagher-Shahri A.M., Ashrafizadeh M., Talebi M., Shaki-baei M., Samarghandian S. An overview of the role of adipokines in cardiometabolic diseases. *Molecules.* 2020;25(21):5218. doi: 10.3390/molecules25215218

11. Teixeira P.F.D.S., dos Santos P.B., Pazos-Moura C.C. The role of thyroid hormone in metabolism and metabolic syndrome. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 2020;11:2042018820917869. doi: 10.1177/2042018820917869

12. Ruyatkina L.A., Ruyatkin D.S. Subclinical hypothyroidism and metabolic syndrome: reasons for drug intervention. *Ozhireniye i metabolism = Obesity and Metabolism.* 2020;17(1):41–47. [In Russian]. doi: 10.14341/omet12282

13. Voevoda S.M., Shcherbakova L.V., Denisova D.V., Shakhtshneyder E.V., Ragino Yu.I., Stakhneva E.M., Rymar O.D. Association of atherosclerosis-associated cardiovascular risk factors at different levels of prolactin in women of reproductive age. *Ateroskleroz = Atherosclerosis.* 2018;14(4):67–72. [In Russian]. doi: 10.15372/ATER20180407

14. Levin A., Stevens P.E. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: Behind the scenes, need for

guidance, and a framework for moving forward. *Kidney Int.* 2014;85:49–61. doi: 10.1038/ki.2013.444

15. Mamedov M.N. International diabetes federation consensus on definition of the metabolic syndrome: facts and comments. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii = Rational Pharmacotherapy in Cardiology.* 2009;5(6):47–50. [In Russian]. doi: 10.20996/1819-6446-2009-5-6-47-50

16. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285:2486–2497. doi: 10.1001/jama.285.19.2486

17. Ostrovskaya E.V., Romantsova T.I., Gerasimov A.N., Novoselova T.E. The prevalence of metabolically healthy obesity according to the sample of the Moscow region. *Ozhireniye i metabolism = Obesity and Metabolism.* 2017;14(4):51–56. [In Russian]. doi: 10.14341/OMET2017451-56

18. Mustafina S.V., Vinter D.A., Shcherbakova L.V., Malyutina S.K., Ragino Yu.I., Rymar O.D. The gender-specific features prevalence of the metabolic healthy obesity phenotype. *Byulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine.* 2020;19(1):76–84. [In Russian]. doi: 10.20538/1682-0363-2020-1-76-84

19. Echouffo-Tcheugui J.B., Short M.I., Xanthakis V., Field P., Sponholtz T.R., Larson M.G., Vasan R.S. Natural history of obesity subphenotypes: dynamic changes over two decades and prognosis in the framingham heart study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019;104(3):738–752. doi: 10.1210/jc.2018-01321

20. van Vliet-Ostapchouk J.V., Nuotio M.L., Slagter S.N., Doiron D., Fischer K., Foco L., Gaye A.,

Gögele M., Heier M., Hiekkalinna T., ... Wolffenbuttel B.H.. The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies. *BMC Endocr. Disord.* 2014;14:9. doi: 10.1186/1472-6823-14-9

21. Boyarinova M.A., Rotar O.P., Erina A.M., Paskar N.A., Alieva A.S., Moguchaia E.V., Kolesova E.P., Konradi A.O. Metabolically healthy obesity: predictors of transformation to unhealthy phenotype in St Petersburg population (according to the ESSE-RF study). *Arterial'naya gipertenziya = Arterial Hypertension.* 2021;27(3):279–290. [In Russian]. doi: 10.18705/1607-419X-2021-27-3-279-290

22. Chulkov V.S., Sinitskiy A.I., Vereina N.K., Gavrilova E.S., Chulkov V.I.S., Martynov S.A., Tkachenko P.E. Factors of cardiometabolic risk in various phenotypes of obesity in the young. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education.* 2020;6:181. [In Russian]. doi: 10.17513/spno.30438

23. Gijón-Conde T., Graciani A., Guallar-Castillón P., Aguilera M.T., Rodríguez-Artalejo F., Banegas J.R. Leptin Reference values and cutoffs for identifying cardiometabolic abnormalities in the spanish population. *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed.).* 2015;68(8):672–679. doi: 10.1016/j.rec.2014.08.015

24. Romantsova T.I., Ostrovskaya E.V. Metabolically healthy obesity: definitions, protective factors, clinical relevance. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine.* 2015;S1:75–87. [In Russian]. doi: 10.18786/2072-0505-2015-1-75-86

#### Сведения об авторах:

**Влада Игоревна Алфёрова**, ORCID: 0000-0002-1645-5523; e-mail: lady.alfyorova2009@yandex.ru  
**Светлана Владимировна Мустафина**, д.м.н., ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4716-876X, e-mail: svetlana3548@gmail.com  
**Оксана Дмитриевна Рymar**, д.м.н., ORCID: 0000-0003-4095-0169, e-mail: orymar23@gmail.com  
**Светлана Михайловна Воевода**, ORCID: 0000-0002-2908-002X, e-mail: sm.voevoda@mail.ru  
**Лилия Валерьевна Щербакова**, ORCID: 0000-0001-9270-9188, e-mail: 9584792@mail.ru  
**Екатерина Михайловна Стахнёва**, к.б.н., ORCID: 0000-0003-0484-6540; e-mail: stahneva@yandex.ru  
**Диана Вахтанговна Денисова**, д.м.н., ORCID: 0000-0002-2470-2133, e-mail: denisovadiana@gmail.com

#### Information about the authors:

**Vlada I. Alferova**, ORCID: 0000-0002-1645-5523; e-mail: lady.alfyorova2009@yandex.ru  
**Svetlana V. Mustafina**, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0003-4716-876X, e-mail: svetlana3548@gmail.com  
**Oksana D. Rymar**, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0003-4095-0169, e-mail: orymar23@gmail.com  
**Svetlana M. Voevoda**, ORCID: 0000-0002-2908-002X, e-mail: sm.voevoda@mail.ru  
**Liliya V. Shcherbakova**, ORCID: 0000-0001-9270-9188, e-mail: 9584792@mail.ru  
**Ekaterina M. Stakhneva**, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0003-0484-6540; e-mail: stahneva@yandex.ru  
**Diana V. Denisova**, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-2470-2133, e-mail: denisovadiana@gmail.com

Поступила в редакцию 19.10.2022  
Принята к публикации 11.01.2023

Received 19.10.2022  
Accepted 11.01.2023

## Дивертикулярная болезнь сигмовидной кишки, осложненная трубчатым кишечным свищом передней брюшной стенки и рубцовой стриктурой сигмовидной кишки (клиническое наблюдение)

М.Н. Климентов<sup>1,2</sup>, С.В. Сысоев<sup>1,2</sup>, М.С. Чупина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Ижевская государственная медицинская академия Минздрава России*  
426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281

<sup>2</sup> *Первая республиканская клиническая больница Минздрава Удмуртской Республики*  
426039, г. Ижевск, ул. Воткинское шоссе, 57

### Резюме

Цель исследования – рассмотреть клинический случай дивертикулярной болезни сигмовидной кишки, осложненной трубчатым кишечным свищом передней брюшной стенки и рубцовой стриктурой сигмовидной кишки. **Материал и методы.** Больная Б., 76 лет, поступила в проктологическое отделение с жалобами на наличие свища передней брюшной стенки в области операционного рубца. Предоперационное обследование в объеме МРТ, колоноскопии, фистулографии позволило выявить дивертикулярную болезнь сигмовидной кишки, осложненную трубчатым кишечным свищом передней брюшной стенки и стриктурой сигмовидной кишки на уровне внутреннего отверстия свища. **Результаты.** Выполнена операция в следующем объеме – иссечение свища, резекция сигмовидной кишки, несущей свищ, с анастомозом «конец в конец» на участке без дивертикулов.

**Ключевые слова:** дивертикулярная болезнь ободочной кишки, осложненный дивертикулит, кишечный свищ.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Чупина М.С., e-mail: chupina.margarita@yandex.ru

**Для цитирования:** Климентов М.Н., Сысоев С.В., Чупина М.С. Дивертикулярная болезнь сигмовидной кишки, осложненная трубчатым кишечным свищом передней брюшной стенки и рубцовой стриктурой сигмовидной кишки (клиническое наблюдение). *Сибирский научный медицинский журнал*. 2023;43(1):124–127. doi: 10.18699/SSMJ20230113

## Diverticular disease of the sigmoid colon, complicated by a tubular intestinal fistula of the anterior abdominal wall and cicatricial stricture of the sigmoid colon (case report)

M.N. Klimentov<sup>1,2</sup>, S.V. Sysoev<sup>1,2</sup>, M.S. Chupina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Izhevsk State Medical Academy of Minzdrav of Russia*  
426034, Izhevsk, Kommunarov str., 281

<sup>2</sup> *First Republican Clinical Hospital of Health Care of the Udmurt Republic*  
426039, Izhevsk, Votkinskoe hwy, 57

### Abstract

Aim of the study was to consider a clinical example of diverticular disease of the sigmoid colon, complicated by a tubular intestinal fistula of the anterior abdominal wall and cicatricial stricture of the sigmoid colon. **Material and methods.** Patient B., 76 years old, was admitted to the proctology department with complaints of the presence of a fistula with purulent discharge in the area of the surgical scar. Preoperative examination with MRI, colonoscopy, fistulography revealed diverticular disease of the sigmoid colon, complicated by a tubular intestinal fistula of the anterior abdominal

wall and stricture of the sigmoid colon at the level of the internal opening of the fistula. **Results.** The operation was performed in the following volume - excision of the fistula, resection of the sigmoid colon bearing the fistula, with end-to-end anastomosis in the area without diverticula.

**Key words:** diverticular disease of the colon, complicated diverticulitis, intestinal fistula, fistula excision.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Correspondence author:** Chupina M.S., e-mail: chupina.margarita@yandex.ru

**Citation:** Klimentov M.N., Sysoev S.V., Chupina M.S. Diverticular disease of the sigmoid colon, complicated by a tubular intestinal fistula of the anterior abdominal wall and cicatricial structure of the sigmoid colon (case report). *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(1):124–127. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230113

## Введение

В последние годы в хирургической практике мы все чаще стали встречаться с осложнениями дивертикулярной болезни ободочной кишки. В развитых странах ее часто сравнивают с «эпидемией» [1–4]. По-видимому, скоро такая ситуация возникнет и у нас. В прямой кишке дивертикулы практически не встречаются, отсюда напрашивается суждение, что более оправдана такая дефиниция заболевания, как «дивертикулярная болезнь ободочной кишки» (ДБОК), тем более что это название принято в англоязычной литературе (colonic diverticular disease) [3–5].

## Материал и методы

В проктологическом отделении Первой республиканской клинической больницы Минздрава Удмуртской Республики в 2020 г. на лечении находились 37 больных с ДБОК, 30 из них поступили с клинической картиной кишечного кровотечения. При обследовании у данных пациентов обнаружены дивертикулы сигмовидной кишки с признаками воспаления. Из оставшихся семерых четверо госпитализированы с острым дивертикулитом, трое – с кишечными свищами. У двух больных сформировался кишечно-пузырный свищ, у одного – наружный трубчатый свищ передней брюшной стенки. Такая форма свища при ДБОК бывает очень редко. Вот на этом клиническом примере, способах диагностики и тактики лечения нам хотелось бы остановиться.

## Клиническое наблюдение

Больная Б., 76 лет, поступила в проктологическое отделение с жалобами на наличие свища передней брюшной стенки в области операционного рубца, со скудным кишечным отделяемым. Год назад была оперирована по экстренным показаниям в дежурной городской больнице с диагнозом «Тубоовариальный абсцесс слева. Распространенный гнойный перитонит». Выполнена

лапаротомия, тубоовариоэктомия, санация и дренирование брюшной полости. Через сутки санационная релапаротомия. Через два месяца после операции появились боли в нижней трети операционного рубца. Пациентку госпитализировали в хирургическое отделение, где был вскрыт абсцесс передней брюшной стенки. После очищения раны от гноя выписана на амбулаторное лечение. В последующем через рану стали выделяться гной и кишечное содержимое в небольшом количестве, сформировался кишечный свищ. Выполнена МРТ. Результаты исследования: в передней брюшной стенке, в проекции операционного рубца, определяется образование неправильной округлой формы с достаточно толстой капсулой, общими размерами 48×45×35 мм, с жидкостным (вероятно, гнойным) содержимым, в полости образования и по ходу свища выявляется газ. Образование соединяется с петлей сигмовидной кишки ходом шириной до 9–10 мм. В стенке сигмовидной кишки многочисленные дивертикулы.

Проведено лечение ДБОК рифаксимином, назначались растворимые пищевые волокна, пробиотики. При этом больная не отмечала нарушения пассажа кишечного содержимого. После стихания воспалительного процесса пациентке выполнена колоноскопия. Подготовка: двухэтапная схема препаратом Фортранс. При колоноскопии: в средней трети сигмовидной кишки просвет циркулярно сужен до 1,0 см, при инсуффляции воздухом не расправляется, для эндоскопа непроходим. В дистальном отделе сигмовидной кишки (ниже сужения) определяются устья дивертикулов до 4,0 мм в диаметре.

Состояние удовлетворительное, артериальное давление 165/100 мм рт. ст., частота сердечных сокращений 16 в минуту. Живот мягкий, безболезненный. Стул регулярный, кашицеобразный, без примеси крови, слизи. По средней линии передней брюшной стенки имеется операционный рубец, в нижнем углу которого свищ 1,0 × 1,0 см с умеренным гнойным отделяемым. При фистулографии визуализируется свищевой ход, прохо-

димый для контрастного препарата, контраст поступает в просвет сигмовидной кишки.

При диагнозе «ДБОК, трубчатый кишечный свищ передней брюшной стенки, рубцовая стриктура сигмовидной кишки» больной предложено оперативное лечение в следующем объеме – иссечение свища с резекцией участка сигмовидной кишки, несущей свищ.

Во время операции свищ выделен из спаек до сигмовидной кишки, длина его до 15 см, диаметр до 2,0 см (рисунок). Сигмовидная кишка, несущая свищ, мобилизована на протяжении 8 см, резецирована, наложен двухрядный сигмо-сигмоанастомоз «конец в конец» вне зоны дивертикулов. Макропрепарат: участок резецированной сигмовидной кишки до 8 см, со стороны просвета имеются единичные дивертикулы и внутреннее отверстие свища до 0,7 см, на уровне внутреннего отверстия свища просвет кишки сужен до 1,0 см. Морфологическая картина соответствует дивертикулиту.

Послеоперационный период протекал без осложнений. Выписана в удовлетворительном состоянии на амбулаторное лечение. Рекомендовано диспансерное наблюдение у гастроэнтеролога.

## Заключение

Предложенная тактика лечения пациентки старшей возрастной группы (76 лет), с ДБОК, осложненной перфорацией дивертикула, потребовавшей лапаротомии по поводу распространенного гнойного перитонита, с последующим формированием абсцесса передней брюшной стенки, трубчатого кишечного свища передней брюшной стенки и стриктуры сигмовидной кишки, на фоне возраст-ассоциированных заболеваний (гипертоническая болезнь 3 стадия, риск 3, хроническая сердечная недостаточность 2а) предполагала длительную противовоспалительную терапию и минимальный объем резекции ободочной кишки с дальнейшим восстановлением непрерывности кишки.

## Список литературы

1. Ивашкин В.Т., Шельгин Ю.А., Ачкасов С.И., Васильев С.В., Григорьев Е.Г., Дудка В.В., Жуков Б.Н., Карпукhin О.Ю., Кузьминов А.М., Куликовский В.Ф., ... Яновой В.В. Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению взрослых больных дивертикулярной болезнью ободочной кишки. *Рос. ж. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* 2016;26(1):65–80.



*Выделенный до сигмовидной кишки трубчатый свищ  
Tubular fistula isolated to the sigmoid colon*

2. Шельгин Ю.А., Ачкасов С.И., Москалев А.И. Классификация дивертикулярной болезни. *Колопроктология.* 2014;4(50):5–13.

3. Буторова Л.И. Дивертикулярная болезнь толстой кишки: клинические формы, диагностика и лечение. Пособие для врачей. М.: 4ТЕ Арт, 2011. 48 с.

4. Голованова Е.В. Циклическая терапия симптоматической дивертикулярной болезни рифаксимином и растворимыми пищевыми – эффективная профилактика осложнений. *Мед. сов.* 2019;3:98–107. doi: 10.21518/2079-701X-2019-3-98-107

5. Климентов М.Н., Сысоев С.В., Чупина М.С., Останина К.А. Дивертикулярная болезнь сигмовидной кишки, осложненная дивертикулитом, параколическим абсцессом, псоас-абсцессом с затеком по левому паховому каналу в мошонку. *Мед. вестн. Башкортостана.* 2020;15(3):119–122.

## References

1. Ivashkin V.T., Shelygin Yu.A., Achkasov S.I., Vasilyev S.V., Grigoryev Ye.G., Dudka V.V., Zhukov B.N., Karpukhin O.Yu., Kuzminov A.M., Kulikovskiy V.F., ... Yanovoy V.V. Diagnostics and treatment of diverticular disease of the colon: guidelines of the Russian Gastroenterological Association and Russian Association of Coloproctology. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2016;26(1):65–80 [In Russian].

2. Shelygin Yu.A., Achkasov S.I., Moskalev A.I. Classification of diverticular disease. *Koloproktologiya = Coloproctology.* 2014;4(50):5–13 [In Russian].

3. Butorova L.I. Diverticular disease of the colon: clinical forms, diagnosis and treatment. Manual for doctors. Moscow: 4TE Art, 2011. 48 p. [In Russian].

4. Golovanova E.V. Cyclic rifaximin and soluble dietary fiber therapy for symptomatic diverticular disease: effective prevention of complications. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*. 2019;3:98–107. [In Russian]. doi: 10.21518/2079-701X-2019-3-98-107

5. Klimentov M.N., Sysoev S.V., Chupina M.S., Ostanina K.A. Diverticular disease of the sigmoid colon, complicated by diverticulitis, paracolic abscess, psoas-abscess pathological exudate flowing through the left inguinal canal into the scrotum. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana = Medical Herald of Bashkortostan*. 2020;15(3):119–122. [In Russian].

#### **Сведения об авторах:**

**Михаил Николаевич Климентов**, к.м.н., ORCID: 0000-0002-0005-7686, e-mail: klimentov52@mail.ru

**Сергей Валентинович Сысоев**, к.м.н., ORCID: 0000-0002-6678-0834

**Маргарита Сергеевна Чупина**, ORCID: 0000-0003-1283-5390, e-mail: chupina.margarita@yandex.ru

#### **Information about the authors:**

**Mikhail N. Klimentov**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-0005-7686, e-mail: klimentov52@mail.ru

**Sergey V. Sysoev**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-6678-0834

**Margarita S. Chupina**, ORCID: 0000-0003-1283-5390, e-mail: chupina.margarita@yandex.ru

*Поступила в редакцию 23.08.2022*

*После доработки 30.11.2022*

*Принята к публикации 16.12.2022*

*Received 23.08.2022*

*Revision received 30.11.2022*

*Accepted 16.12.2022*