



ISSN 2410- 5155 (Online), ISSN 2311- 4495 (Print)

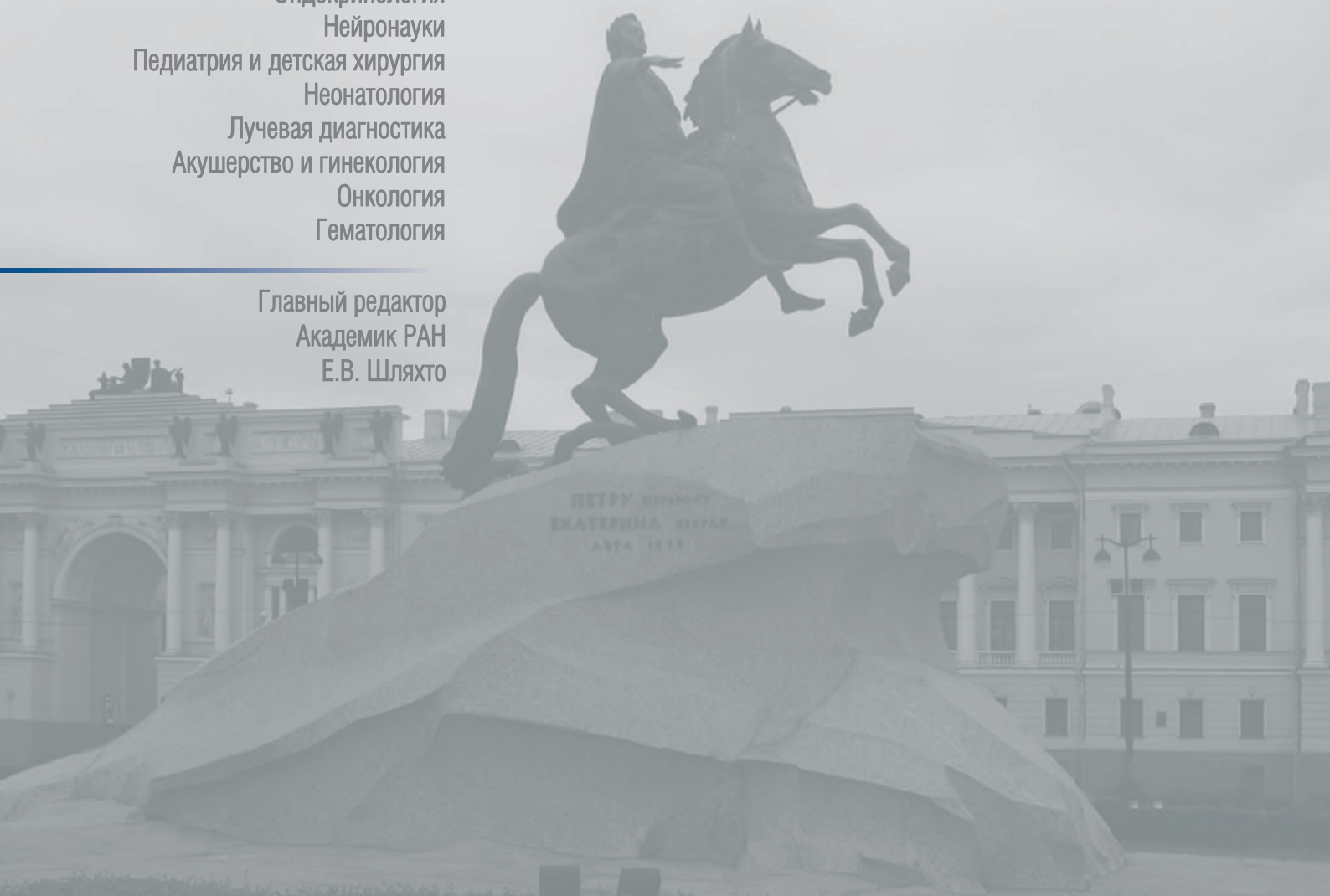
Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 7 №5 / 2020

Фундаментальная медицина
Сердечно-сосудистые заболевания
Эндокринология
Нейронауки
Педиатрия и детская хирургия
Неонатология
Лучевая диагностика
Акушерство и гинекология
Онкология
Гематология

Главный редактор
Академик РАН
Е.В. Шляхто





ISSN 2410-5155 (Online), ISSN 2311-4495 (Print)

Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 7 №5 / 2020

Фундаментальная медицина
Сердечно-сосудистые заболевания
Эндокринология
Нейронауки
Педиатрия и детская хирургия
Неонатология
Лучевая диагностика
Акушерство и гинекология
Онкология
Гематология

Главный редактор
Академик РАН
Е.В. Шляхто

**Национальный медицинский
исследовательский центр им. В. А. Алмазова
Министерства здравоохранения Российской Федерации**



ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Е. В. Шляхто

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

А. О. Конради

М. М. Галагудза

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР

Н. А. Смолина

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ

С. В. Анисимов (Санкт-Петербург)
Е. И. Баранова (Санкт-Петербург)
Е. Р. Баранцевич (Санкт-Петербург)
Т. В. Вавилова (Санкт-Петербург)
А. В. Васильев (Москва)
М. Л. Гордеев (Санкт-Петербург)
Е. Н. Гринёва (Санкт-Петербург)
А. А. Жлоба (Санкт-Петербург)
А. Ю. Зарицкий (Санкт-Петербург)
Э. Э. Звартау (Санкт-Петербург)
Д. О. Иванов (Санкт-Петербург)

М. А. Карпенко (Санкт-Петербург)
Э. В. Комличенко (Санкт-Петербург)
А. А. Костарева (Санкт-Петербург)
Д. С. Лебедев (Санкт-Петербург)
Ю. Б. Лишманов (Томск)
О. М. Моисеева (Санкт-Петербург)
А. О. Недошивин (Санкт-Петербург)
И. Л. Никитина (Санкт-Петербург)
Е. В. Пармон (Санкт-Петербург)
Д. В. Рыжкова (Санкт-Петербург)

**ЧЛЕНЫ МЕЖДУНАРОДНОГО
РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА**

Ж. Бакс (Нидерланды)
Р. Феррари (Италия)
Р. Хельманн (Германия)
Г. Ханссон (Швеция)
Д. Керр (США)
Ж. Массард (Франция)
Б. Ольшанский (США)
М. Орлов (США)
Т. Сейерсен (Швеция)
Г. Сёберг (Швеция)
О. Содер (Швеция)
Т. Сили-Торок (Нидерланды)
Я. Вааге (Норвегия)
Э. К. Айламазян (Санкт-Петербург)
В. Н. Анисимов (Санкт-Петербург)
В. Г. Баиров (Санкт-Петербург)
В. С. Баранов (Санкт-Петербург)
О. А. Беркович (Санкт-Петербург)
Л. А. Бокерия (Москва)
В. Н. Васильев (Санкт-Петербург)
Т. Д. Власов (Санкт-Петербург)
А. Я. Гудкова (Санкт-Петербург)
Е. З. Голухова (Москва)
И. В. Гурьева (Москва)
А. С. Галявич (Казань)
С. Л. Дземешкевич (Москва)
Д. В. Дупляков (Самара)
И. Е. Зазерская (Санкт-Петербург)
Е. В. Заклязьминская (Москва)
А. М. Караськов (Новосибирск)
Р. С. Карпов (Томск)
В. М. Кутузов (Санкт-Петербург)
В. В. Ломиворотов (Новосибирск)
Ю. М. Лопатин (Волгоград)
В. А. Мазурок (Санкт-Петербург)
А. С. Максимов (Санкт-Петербург)
Л. Н. Маслов (Томск)
А. Л. Маслянский
(Санкт-Петербург)
Г. А. Мельниченко (Москва)
В. М. Моисеенко
(Санкт-Петербург)
И. А. Наркевич (Санкт-Петербург)
И. В. Поддубный (Москва)
Е. А. Покушалов (Новосибирск)
В. П. Пузырёв (Томск)
В. А. Ткачук (Москва)
С. В. Сидоркевич
(Санкт-Петербург)
Г. Н. Салогуб (Санкт-Петербург)
В. В. Фадеев (Москва)
В. А. Цырлин (Санкт-Петербург)

Журнал зарегистрирован в Государственном комитете РФ по печати.
Свидетельство о рег. ПИ № ФС77–56793 от 29.01.2014 г.
Журнал включен в Российский индекс научного цитирования

Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации в «Перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук».

Периодичность — 6 выпусков в год. Тираж — 1100 экземпляров.

Тематическая рассылка по специалистам.

Верстка — Л. П. Попова. Корректра — А. А. Попова

18+

Издательство «ФОНД АЛМАЗОВА»

Адрес: 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

Телефон издательства: +7(812)702–37–16

Подача рукописей и переписка с авторами, размещение рекламы и подписка —
e-mail: bulletin@almazovcentre.ru

Подписка по каталогу агентства «Роспечать»: подписной индекс 57996

Архив номеров: http://www.almazovcentre.ru/?page_id=20396
http://elibrary.ru/title_about.asp?id=50986

Все права защищены. © 2020.

Полное или частичное воспроизведение материалов, опубликованных в журнале, допускается только с письменного разрешения редакции.

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов

**V. A. Almazov National
Medical Research Centre
Ministry of Health of the Russian Federation**

**EDITOR-IN-CHIEF**

E. Shlyakheto

VICE-EDITORS

A. Konradi

M. Galagudza

TECHNICAL EDITOR

N. Smolina

EDITORIAL BOARD

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| S. Anisimov (Saint-Petersburg) | M. Karpenko (Saint-Petersburg) |
| E. Baranova (Saint-Petersburg) | E. Komlichenko (Saint-Petersburg) |
| E. Barancevich (Saint-Petersburg) | A. Kostareva (Saint-Petersburg) |
| T. Vavilova (Saint-Petersburg) | D. Lebedev (Saint-Petersburg) |
| A. Vasiliev (Moscow) | Yu. Lishmanov (Tomsk) |
| M. Gordeev (Saint-Petersburg) | O. Moiseeva (St. Petersburg) |
| E. Grineva (Saint-Petersburg) | A. Nedoshivin (Saint-Petersburg) |
| A. Zhloba (Saint-Petersburg) | I. Nikitina (Saint-Petersburg) |
| A. Zaritskiy (Saint-Petersburg) | E. Parmon (Saint-Petersburg) |
| E. Zvartau (Saint-Petersburg) | D. Ryzhkova (Saint-Petersburg) |
| D. Ivanov (Saint-Petersburg) | |

MEMBERS**OF THE INTERNATIONAL
EDITORIAL BOARD**

- J. Bax (Netherlands)
R. Ferrari (Italy)
R. Hehlmann (Germany)
G. Hansson (Sweden)
K. David (USA)
G. Massard (France)
B. Olshansky (USA)
M. Orlov (USA)
T. Sejersen (Sweden)
G. Sjöberg (Sweden)
O. Söder (Sweden)
T. Szili-Torok (Netherlands)
J. Vaage (Norway)
E. Aylamazyan (Saint-Petersburg)
V. Anisimov (Saint-Petersburg)
V. Bairov (Saint-Petersburg)
V. Baranov (Saint-Petersburg)
O. Berkovich (Saint-Petersburg)
L. Bokeria (Moscow)
V. Vasiliev (Saint-Petersburg)
T. Vlasov (Saint-Petersburg)
A. Gudkova (Saint-Petersburg)
E. Golukhova (Moscow)
I. Gurieva (Moscow)
A. Galyavich (Kazan)
S. Dzemeshevich (Moscow)
D. Duplyakov (Samara)
I. Zazerskaya (Saint-Petersburg)
E. Zaklyazminskaya (Moscow)
A. Karaskov (Novosibirsk)
R. Karpov (Tomsk)
V. Kutuzov (Saint-Petersburg)
V. Lomivorotov (Novosibirsk)
Yu. Lopatin (Volgograd)
V. Mazurok (Saint-Petersburg)
A. Maksimov (Saint-Petersburg)
L. Maslov (Tomsk)
A. Maslyanskiy (Saint-Petersburg)
G. Melnichenko (Moscow)
V. Moiseenko (Saint-Petersburg)
I. Narkevich (Saint-Petersburg)
I. Poddubniy (Moscow)
E. Pokushalov (Novosibirsk)
V. Puzyrev (Tomsk)
V. Tkachuk (Moscow)
S. Sidorkevich (Saint-Petersburg)
G. Sologub (Saint-Petersburg)
V. Fadeev (Moscow)
V. Tsyrlin (Saint-Petersburg)

Journal is registered in State Committee for Publishing of the Russian Federation.
Certificate of registration. ПИ № ФС77-56793 on 29.01.2014
The Journal is included in the Russian Citation Index

The journal is listed among Russian peer-reviewed scientific journals approved
by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education
and Science for the publication of major scientific results of theses
for academic degrees of Doctor and Candidate of Sciences.

Periodicity — 6 issues per year. Edition 1100 copies.

Distribution to specialists.

18+

Make-up — L. P. Popova. Proofreader — A. A. Popova

Publisher «ALMAZOV FOUNDATION»

Address: 197341, Saint-Petersburg, Akkuratova str. 2

Tel.: +7(812)702-37-16

Manuscript submission and correspondence with authors,
advertising and subscription —

e-mail: bulleten@almazovcentre.ru

Subscription on catalogue of Rospechat agency: index 57996

Archive: http://www.almazovcentre.ru/?page_id=20396
http://elibrary.ru/title_about.asp?id=50986

All rights reserved. © 2020.

Full or partial reproduction of materials printed in journal is allowed by the written
permission of publisher.

Editors accept no responsibility for the content of advertising materials.

СОДЕРЖАНИЕ

СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

6 Бондаренко Б. Б., Григорьева А. В., Соколова Л. А., Барт В. А., Горлова И. А., [Иванов С. Ю.], Омельченко М. Ю.
ВОЗМОЖНОСТИ ПРЕДОПЕРАЦИОННОГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕЦИДИВОВ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ ПОСЛЕ РАДИОЧАСТОТНОЙ АБЛАЦИИ ЛЕГОЧНЫХ ВЕН

17 Щава С. П., Степанов Е. В., Сорокин В. А.
РОЛЬ ЭКЗОСОМ В ПАТОГЕНЕЗЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

НЕВРОЛОГИЯ

29 Алексеева Т. М., Топузова М. П., Чайковская А. Д., Панина Е. Б., Вавилова Т. В., Поспелова М. Л., Васильева Е. Ю., Симаков К. В., Сергеева Т. В.
НОВЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ ИШЕМИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ МОЗГА

43 Рожченко Л. В., Дрягина Н. В.
НОВЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ АРТЕРИОВЕНОЗНЫХ МАЛЬФОРМАЦИЙ

ЭНДОКРИНОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

53 Перминова А. А., Митрофанова Л. Б., Баиров В. Г., Сухоцкая А. А., Рыжкова Д. В.
ПАТОМОРФОЛОГИЯ АТИПИЧНОЙ ФОРМЫ ВРОЖДЕННОГО ГИПЕРИНСУЛИНИЗМА НА ПРИМЕРЕ ТРЕХ КЛИНИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ

62 Никитина И. Л., Юхлина Ю. Н., Саракаева Л. Р., Плаксина А. О., Байрамов А. А.
СОВРЕМЕННАЯ КОНЦЕПЦИЯ НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СТАРТА ПУБЕРТАТА И ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ. ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНОЙ СИСТЕМЫ КИССПЕПТИНА KISS/KISS1R

CONTENT

CARDIOVASCULAR MEDICINE

6 Bondarenko B. B., Grigoryeva A. V., Sokolova L. A., Bart V. A., Gorlova I. A., [Ivanov S. Yu.], Omelchenko M. Yu.
FORECASTING OF RECURRENT ATRIAL FIBRILLATION AFTER RADIOFREQUENCY ABLATION OF PULMONARY VEINS USING PREOPERATIVE CHARACTERISTICS

17 Schava S. P., Stepanov E. V., Sorokin V. A.
THE EXOSOMES ROLE IN PATHOGENESIS OF CARDIOVASCULAR DISEASES

NEUROLOGY

29 Alekseeva T. M., Topuzova M. P., Chaykovskaya A. D., Panina E. B., Vavilova T. V., Pospelova M. L., Vasilieva E. Yu., Simakov K. V., Sergeeva T. V.
NEW DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC BIOMARKERS OF THE ISCHEMIC BRAIN DAMAGE

43 Rozhchenko L. V., Dryagina N. V.
MODERN APPROACHES TO TREATMENT OF COMPLEX CEREBRAL ARTERIOVENOUS MALFORMATIONS

METABOLIC DISEASES

53 Perminova A. A., Mitrofanova L. B., Bairov V. G., Sukhotskaya A. A., Ryzhkova D. V.
PATHOMORPHOLOGY OF THE ATYPICAL FORM OF CONGENITAL HYPERINSULINISM ON THE EXAMPLE OF THREE CLINICAL CASES

62 Nikitina I. L., Yuchlina Y. N., Sarakaeva L. R., Plaksina A. O., Bayramov A. A.
MODERN CONCEPT OF NEUROENDOCRINE AND EPIGENETIC REGULATION OF THE ONSET OF PUBERTY AND SEXUAL DEVELOPMENT. TRANSLATIONAL STUDIES ON THE ROLE OF THE KISS/KISS1R SYSTEM

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENT

ЛУЧЕВАЯ ДИАГНОСТИКА И ТЕРАПИЯ

RADIOLOGY

- 81** Фокин А. В., Семенова Е. С.,
Выshedkevich Е. Д., Шелепова Е. С., Романов Г. Г.,
Труфанов Г. Е., Машченко И. А.
**МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ
ПЛАЦЕНТЫ: СИСТЕМАТИЗИРОВАННЫЙ
ПОДХОД К ОПИСАНИЮ ПЛАЦЕНТЫ**

- 81** Fokin A. V., Semenova E. S.,
Vyshedkevich E. D., Shelepova E. S., Romanov G. G.,
Trufanov G. E., Mashchenko I. A.
**MAGNETIC RESONANCE IMAGING OF THE
PLACENTA: A SYSTEMATIC APPROACH TO
THE DESCRIPTION OF NORMAL PLACENTA**

ИСТОРИЯ МЕДИЦИНЫ

HISTORY OF MEDICINE

- 91** Мосоян М. С., Федоров Д. А.
**СОВРЕМЕННАЯ РОБОТОТЕХНИКА
В МЕДИЦИНЕ**

- 91** Mosoyan M. S., Fedorov D. A.
MODERN ROBOTICS IN MEDICINE

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL STUDIES

- 109** Голубева И. Ю., Тихонравов Д. Л.,
Войтенков В. Б., Пашков А. Ю., Первунина Т. М.
**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ФОРМИРОВАНИЯ ПОНЯТИЙ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАЛЬНЫХ
ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ФИГУР И КОНТУРНЫХ
ИЗОБРАЖЕНИЙ В КАЧЕСТВЕ СТИМУЛОВ
У ДЕТЕЙ В ВОЗРАСТЕ 4–5 ЛЕТ**

- 109** Golubeva I. U., Tikhonravov D. L.,
Voitenkov V. B., Pashkov A. Y., Pervunina T. M.
**COMPARATIVE STUDY OF THE FORMATION
OF CONCEPTS USING REAL GEOMETRIC
FIGURES AND CONTOUR IMAGES AS STIMULI
IN CHILDREN AT THE AGE OF 4 TO 5 YEARS**

- 119** Тютина К. В., Гушин Я. А., Макарова М. Н.,
Макаров В. Г.
**ОЦЕНКА КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА
В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

- 119** Tyutina K. V., Gushchin Y. A., Makarova M. N.,
Makarov V. G.
**EVALUATION OF BONE MARROW IN
PRECLINICAL STUDIES**

ВОЗМОЖНОСТИ ПРЕДОПЕРАЦИОННОГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕЦИДИВОВ ФИБРИЛЛЯЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ ПОСЛЕ РАДИОЧАСТОТНОЙ АБЛАЦИИ ЛЕГОЧНЫХ ВЕН

Бондаренко Б. Б.¹, Григорьева А. В.², Соколова Л. А.¹, Барт В. А.³,
Горлова И. А.¹, Иванов С. Ю.¹, Омельченко М. Ю.¹

Контактная информация:

Горлова Ирина Александровна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: gorlova_ia@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 26.05.2020
и принята к печати 12.10.2020.

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
Ленинградской области «Гатчинская клиническая межрайонная
больница», Гатчина, Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Актуальность. Фибрилляция предсердий (ФП) — наиболее распространенное нарушение ритма. Метод катетерной радиочастотной абляции (РЧА) легочных вен (ЛВ) не гарантирует сохранение синусового ритма. Определение предикторов рецидивов ФП диктует необходимость использования системного подхода с учетом демографических и клинично-инструментальных характеристик больных. **Цель.** Определение предоперационных предикторов рецидива ФП в течение 3 лет после РЧА ЛВ. **Материалы и методы.** В исследование включены 89 больных (50 мужчин и 39 женщин, средний возраст 58 и 62 года соответственно), наблюдавшихся после РЧА ЛВ в течение 3 лет. С аналитической целью применялись методы главных компонент и дискриминантного анализа. **Результаты.** Рецидив ФП был отмечен у 43 больных (48 %): в течение первого года наблюдения — у 18 (43 %), на втором — у 16 (37 %), на третьем — у 9 (20 %) пациентов. Путем последовательного использования методов описательной и многомерной статистики выделена совокупность показателей, отличающих пациентов с рецидивами ФП, перенесших РЧА ЛВ. К ним относятся давность ФП, снижение сократительной функции миокарда, наличие ишемической болезни сердца (ИБС), кардиоверсии в анамнезе, патологии щитовидной железы. Установлен и вклад модифицируемых факторов риска: уровня систолического артериального давления, индекса массы тела, табакокурения. **Заключение.** Использование методов многомерной статистики позволяет определить дооперационные характеристики, учет которых актуален с позиций оптимизации ведения больных с ФП.

Ключевые слова: кардиоверсия, катетерная радиочастотная абляция легочных вен, модифицируемые факторы риска, предикторы рецидива, прогностические предикторы рецидива, фибрилляция предсердий.

Для цитирования: Бондаренко Б.Б., Григорьева А.В., Соколова Л.А. и др. Возможности предоперационного прогнозирования рецидивов фибрилляции предсердий после радиочастотной абляции легочных вен. Трансляционная медицина. 2020; 7 (5): 6-16. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-6-16

FORECASTING OF RECURRENT ATRIAL FIBRILLATION AFTER RADIOFREQUENCY ABLATION OF PULMONARY VEINS USING PREOPERATIVE CHARACTERISTICS

Bondarenko B. B.¹, Grigoryeva A. V.², Sokolova L. A.¹, Bart V. A.¹, Gorlova I. A.¹, Ivanov S. Yu.¹, Omelchenko M. Yu.¹

¹Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

²Gatchina Clinical Hospital, Saint Petersburg, Russia

³Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Gorlova Irina A.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: gorlova_ia@almazovcentre.ru

Received 26 May 2020; accepted 12 October 2020.

Abstract

Background. Atrial fibrillation (AF) is the most frequent arrhythmia. The method of catheter radiofrequency ablation (CRA) of pulmonary veins (PV) does not guarantee the preservation of sinus rhythm. Determination of predictors of AF relapses dictates the need in systemic approach taking into account demographic and clinical-instrumental characteristics of patients. **Objective.** Determination of preoperative predictors of AF recurrence within 3 year after follow-up CRA PV.

Design and methods. The study included 89 patients (50 men, 39 women; mean age 58 and 62 years respectively) followed during 3 years after CRA PV. The methods of principal components and discriminant analysis were used for analytical purposes. **Results.** The recurrence of AF was observed in 43 patients (48 %): during the first year — in 18 (43 %), during the second — in 16 (37 %), during the third — in 9 (20 %) cases. By consistently using the methods of descriptive and multivariate statistics a set of the preoperative indicators has been identified that distinguishes patients with AF relapses undergone CRA PV. It consists of the longevity of AF, the state of contractive myocardial function, the presence of ICD, cardioversion in the past and thyroid pathology. The contribution of modified risk factors: SBP level, BMI, tobacco smoking also are valued. **Conclusion.** Using of multivariate statistics allows to determine preoperative characteristics, which provide optimization of management of patients with AF.

Key words: atrial fibrillation, cardioversion, catheter radiofrequency ablation of pulmonary veins, modificative risk factors, predictive factors of recurrence

For citation: Bondarenko BB, Grigoryeva AV, Sokolova LA, et al. Forecasting of recurrent atrial fibrillation after radiofrequency ablation of pulmonary veins using preoperative characteristics. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020;7(5):6-16. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-6-16

Список сокращений: ААТ — антиаритмическая терапия, ДФ — дискриминантная функция, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМТ — индекс массы тела, ЛВ — легочные вены, РЧА — радиочастотная абляция, ФП — фибрилляция предсердий, ФР — факторы риска, ЧСС — частота сердечных сокращений.

Введение

Фибрилляция предсердий (ФП) относится к числу наиболее распространенных нарушений

ритма сердца, ее частота в общей популяции составляет 1–2 %. При этом численность пациентов с ФП в Европе достигает 6 миллионов, а в целом в мире насчитывается до 30 миллионов человек [1, 2]. Возрастно-зависимый характер данной патологии предопределяет увеличение числа больных с ФП в ближайшие 50 лет вдвое на фоне неуклонного старения населения [3–5]. В ходе эпидемиологических исследований у 1,4 % населения в возрасте старше 65 лет выявляется бессимптомная форма ФП, исключая вероятность ее ранней

диагностики при том, что она характеризуется высоким риском возникновения тромбоэмболических осложнений [2, 4, 6].

Предметом дискуссий до сих пор остается и выбор между принятыми на современном этапе развития кардиологии стратегиями лечения ФП — восстановления и контроля синусового ритма и контроля частоты сердечных сокращений (ЧСС) при сохраняющейся ФП [1, 4, 7–9]. Это относится, прежде всего, к больным старших возрастных групп со свойственной им множественной коморбидностью [1, 4, 7, 8]. По мере накопления мирового опыта нашло подтверждение представление, согласно которому стратегия контроля ритма предпочтительнее контроля ЧСС, если она обеспечивается не с помощью антиаритмической терапии (ААТ), а путем интервенционных вмешательств [10]. В настоящее время преимущества выполнения с этой целью радиочастотной абляции (РЧА) устьев легочных вен (ЛВ) общепризнаны [1, 2, 5, 7]. Однако, как и медикаментозная ААТ, выполнение РЧА не гарантирует сохранения синусового ритма. Рецидивы ФП, по литературным данным, регистрируются в 20–50 % случаев при условии учета принятых в настоящее время принципов отбора пациентов для проведения данного вмешательства и технологии его выполнения и последующего контроля [1, 3, 5, 7, 8, 11].

В свете этого сохраняется актуальность вопроса о факторах риска (ФР) и предикторах рецидива ФП после РЧА ЛВ и их прогностической информативности [1, 12, 13].

Использование системного подхода, признава-

емого определяющим при решении прогностических задач, предполагает возможность выделения наиболее информативных показателей и их совокупностей. При этом важным условием признается, наряду с исходным объемом наблюдений и числом включаемых в исследование признаков, временной диапазон прогноза — его долгосрочность. Многофакторность генеза и эволюции ФП обосновывает необходимость использования для анализа прогнозирования ее исходов (в том числе и результатов лечебных воздействий) адекватных методов многомерной статистики [14, 15].

Перечисленные принципы медицинской прогностики не всегда соблюдаются, что определяет неоднозначность результатов исследований прогноза биомедицинских явлений, ограничивает возможности их сопоставления.

Цель настоящего пилотного исследования — определение предоперационных предикторов рецидивов ФП в течение 3 лет после РЧА ЛВ.

Материалы и методы

В исследование включены 89 больных с неклапанной ФП (50 мужчин и 39 женщин, средний возраст 58 и 62 года соответственно), которым в первом квартале 2015 года была произведена в НМИЦ им. В. А. Алмазова РЧА устьев ЛВ. Критериями невключения были: наличие клапанной формы ФП, возраст старше 80 лет, фракция выброса левого желудочка меньше 35 %.

Исходя из цели исследования, по завершении трехлетнего последующего наблюдения осуществлялась группировка больных, учитывающая раз-

Таблица 1. Перечень, значения и встречаемость показателей в сопоставляемых группах

Признаки	I группа (n = 43)	II группа (n = 46)	P
1. Пол, возраст			
1.1. Мужской	20 (47 %)	30 (65 %)	нз
1.2. Женский	23 (53 %)	16 (35 %)	нз
1.3. Возраст на момент возникновения ФП (лет)	52 [32; 73]	55 [27; 71]	нз
1.4. Возраст на момент РЧА (лет)	61 [35; 78]	60,5 [28; 74]	нз
1.5. Время с момента возникновения ФП (лет)	5 [1; 20]	4 [1; 15]	нз
2. Гипертоническая болезнь			
2.1. Наличие ГБ (количество пациентов)	32 (74 %)	29 (63 %)	нз
2.2. САД (мм рт. ст.)	124,7 ± 11,1	128,6 ± 10,1	нз
2.3. ДАД (мм рт. ст.)	78,4 ± 9,2	79,8 ± 6,1	нз

2.4. Стадии ГБ (баллы)	1 2 3 4	1 (16 %) 5 (12 %) 20 (46 %) 11 (26 %)	7 (15 %) 4 (9 %) 22 (48 %) 13 (28 %)	нз
3. Наличие ИБС (количество пациентов)		6 (14 %)	15 (33 %)	0,04
4. Наличие СД 2 тип (количество пациентов)		5 (12 %)	9 (20 %)	нз
5. Патология щитовидной железы (количество пациентов)		26 (61 %)	17 (37 %)	0,03
5.1. Эутиреоз		10 (23 %)	7 (15 %)	нз
5.2. Гипотиреоз		3 (7 %)	4 (9 %)	нз
5.3. Гипертиреоз		11 (26 %)	7 (15 %)	нз
5.4. Гормонозаместительная терапия		3 (7 %)	3 (7 %)	нз
6. ИМТ (кг/м ²)		28,7 [20,6; 39,1]	29,7 [21,4; 47,1]	нз
7. Курение (количество пациентов)		15 (35 %)	16 (35 %)	нз
8. Злоупотребление алкоголем (количество пациентов)		3 (7 %)	1 (2 %)	нз
9. Характеристики ФП (формы ФП) (количество пациентов)				
9.1. Пароксизмальная		35 (81 %)	29 (63%)	нз
9.2. Персистирующая		5 (12 %)	13 (28 %)	0,05
9.3. Длительно персистирующая		2 (5 %)	2 (4 %)	нз
9.4. Бессимптомная		1 (2%)	1 (2 %)	нз
9.4. Тахисистолическая		35 (81 %)	38 (83 %)	нз
8.5. Нормосистолическая		8 (19 %)	8 (17 %)	нз
9.6. Брадисистолическая		0 (0 %)	0 (0 %)	нз
9.7. Градация по шкале EHRA (баллы)	1 2 3 4	4 (9 %) 32 (74 %) 7 (16 %) 0 (0 %)	3 (7 %) 37 (80 %) 5 (11 %) 1 (2 %)	нз
10. Анамнестические данные (количество пациентов)				
10.1. Перенесенный инфаркт миокарда		0 (0 %)	2 (1 %)	нз
10.2. Нарушение мозгового кровообращения (включая ТИА) в прошлом		8 (19 %)	0 (0 %)	0,006
10.3. Кардиоверсия в анамнезе		14 (36 %)	22 (48 %)	нз
10.4. РЧА в прошлом		5 (12 %)	16 (35 %)	0,013
11. Эхокардиографические показатели				
11.1. Фракция выброса (% по Simpson)		61,9 ± 6,6	62,6 ± 5,3	нз
11.2. Диаметр левого предсердия (мм)		42,6 ± 4,7	41,8 ± 5,1	нз
11.3. Толщина задней стенки левого желудочка (мм)		10,4 ± 1,5	10,7 ± 1,6	нз
12. ЭКГ ширина комплекса QRS (мсек)		96 [80; 140]	99 [80; 140]	нз

Примечания: ФП — фибрилляция предсердий, РЧА — радиочастотная абляция, ГБ — гипертоническая болезнь, САД — систолическое артериальное давление, ДАД — диастолическое артериальное давление, ИБС — ишемическая болезнь сердца, СД — сахарный диабет, ИМТ — индекс массы тела, ТИА — транзиторная ишемическая атака, EHRA — шкала симптомов ФП, ЭКГ — электрокардиограмма, QRS — ширина комплекса QRS.

витие рецидива ФП или его отсутствие. Больные с рецидивом ФП ($n = 43$; 48,3 %) составили I группу, без него ($n = 46$; 51,7 %) — II группу. Из числа больных I группы у 18 (43 %) рецидивы ФП возникли в течение первого года наблюдения, у 16 (37 %) — второго, у 9 (20 %) — третьего. Предоперационные характеристики пациентов включали 34 показателя, перечень которых, встречаемость и значения в сопоставляемых группах суммированы в таблице 1. Из общего числа признаков 10 количественные, 22 дихотомические и 2 порядковые.

При описании данные представлены в виде: среднее $\pm$ стандартное отклонение; медиана [минимум; максимум]. К асимметричным показателям применялось логарифмирование значений. Для сравнения групп использован однофакторный дисперсионный анализ ANOVA для количественных признаков, критерий Манна–Уитни для порядковых значений и точный тест Фишера для дихотомических. Применялись следующие методы многомерной статистики: корреляционный анализ, метод главных компонент, пошаговый дискриминантный анализ в рамках общей линейной модели. В корреляционном анализе и факторном использован коэффициент корреляции Пирсона; порядковые признаки подвергнуты ранжированию (тест Спирмена). Статистический уровень значимости различий $p > 0,05$ считался клинически незначимым (нз). Использован пакет прикладных программ STATISTICA 10.

Результаты

Сопоставляемые группы больных существенно различаются по шести показателям:

1. Наличие ишемической болезни сердца ($p = 0,04$).
2. Наличие патологии щитовидной железы ($p = 0,03$).
3. Злоупотребление алкоголем ($p = 0,05$).
4. Персистирующая форма ФП ($p = 0,05$).
5. Нарушение мозгового кровообращения (в том числе ТИА) в прошлом ($p = 0,006$).
6. РЧА в прошлом ($p = 0,013$).

У больных с рецидивами ФП по сравнению с больными II группы значимо реже констатировалось наличие ишемической болезни сердца (ИБС), персистирующей ФП и РЧА в прошлом при более частой встречаемости остальных трех показателей.

Оценка сходства/различия сопоставляемых групп осуществлялась по результатам корреляционного анализа, выявившего, что статистически значимое отличие от нуля в группах I и II для коэффициента корреляции обеспечивают уровни $|r| > 0,30$ и $|r| > 0,29$ соответственно. Всего в группе I

насчитывалось 34 значимые корреляции, а в группе II — 37. При этом в I группе абсолютное значение r не превышало 0,4 у 70 % всех значимых корреляций, а во II группе — у 75 %, что отражает резкий спад в обеих группах общего количества связей между всеми исследуемыми признаками при достаточно низком по силе уровне этих связей. Такого рода спад позволяет предполагать наличие большого количества мелких и различных по смыслу и способу измерения причин рецидивов ФП. Тем не менее, при этом не исключается вероятность получения более сложного по структуре дифференциального прогностического индекса.

Данное заключение легло в основу использования метода главных компонент — варианта многомерного анализа, по сути аналогичного процессу синдромологической диагностики на основе выделенных оптимальных совокупностей признаков [16].

Осуществлению данного этапа исследования предшествовала коллегиальная переоценка исходно отобранных для анализа признаков с целью исключения заведомо наименее информативных из-за их редкой встречаемости в обеих группах больных. В число исключенных показателей вошло и «нарушение мозгового кровообращения», несмотря на то, что при сравнении групп он имеет наименьший уровень статистической значимости различия ($p = 0,006$, точный критерий Фишера). Последнее определило обоснованность его включения в дальнейшем в общую линейную модель дискриминантной функции. Однако его нулевая выборочная дисперсия во II группе исключает его применение при корреляционном и факторном анализе данных по группам. Указанный подход был предпринят в том числе и для оптимизации соотношения между числом наблюдений и показателями для увеличения в какой-то мере «статистической мощности» исследования.

В итоге для анализа методом главных компонент было отобрано 23 показателя. Как следует из представленных в таблице 2 результатов, в обеих группах 70 % общей дисперсии исследуемых показателей, которое считается диагностически достаточным, обеспечивается вкладом 8 факторов (F). При этом для обеих категорий больных оказались одинаково низкими вклады информативности F_1 (по 14,5 %) и идентичными доли в общей дисперсии остальных одноименных факторов при соотношениях F_1/F_8 менее 2,7 (рис. 1).

С позиций оценки структуры факторов в сопоставляемых группах следует отметить, что первые три фактора включают почти все исследуемые показатели: соответственно F_1 — 10 и 12 признаков,

Таблица 2. Факторные веса характеристик больных исследуемых групп

Признаки	Группа без рецидивов								Группа с рецидивами							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Возраст появления ФП	0,50	-0,38	-0,25	-0,18	0,24	-0,18	-0,08	-0,07	-0,26	-0,05	-0,20	-0,41	0,03	-0,17	0,15	0,12
Lg длительности	0,20	0,21	0,49	-0,25	-0,35	-0,06	0,44	-0,24	0,35	0,06	0,49	0,41	-0,07	0,29	-0,22	-0,14
Пол	0,48	-0,56	0,28	-0,19	-0,12	0,19	-0,01	0,16	0,65	-0,22	-0,04	-0,16	0,13	0,15	0,06	-0,35
Персистирующая ФП	-0,61	0,31	-0,03	-0,52	0,37	0,21	0,02	-0,01	-0,39	0,59	0,47	-0,05	0,21	0,17	-0,09	-0,05
Параксизмальная ФП	0,56	-0,36	0,17	0,44	-0,35	-0,14	-0,04	-0,09	0,38	-0,54	-0,51	0,00	-0,25	-0,06	0,13	-0,26
Тахикардия	0,11	0,29	0,36	0,19	0,01	0,46	0,02	0,50	0,31	-0,08	0,03	0,39	0,32	-0,55	0,27	0,03
EHRA	0,61	0,20	0,19	0,21	0,08	-0,17	0,17	-0,18	0,34	0,18	0,03	-0,44	-0,58	-0,06	-0,35	0,01
Наличие ГБ	0,75	0,23	0,01	-0,05	0,06	-0,11	-0,02	0,13	0,55	0,27	0,09	0,22	-0,21	-0,30	0,49	0,02
Стадия ГБ	0,54	0,45	-0,11	-0,12	-0,12	-0,17	-0,16	0,22	0,55	0,39	0,14	-0,29	-0,37	-0,17	-0,09	0,07
Систолическое АД	0,26	0,45	-0,26	0,46	0,20	0,38	-0,19	-0,10	0,33	0,40	-0,30	-0,36	0,53	0,20	0,06	-0,07
Диастолическое АД	0,22	0,38	-0,08	0,43	0,03	0,57	0,08	-0,11	0,27	0,42	-0,31	-0,33	0,54	0,03	0,22	0,11
Наличие ИБС	0,32	0,33	-0,37	-0,30	-0,30	0,15	0,39	0,01	-0,04	0,02	0,20	-0,24	0,06	-0,39	-0,20	-0,73
Патология ПЖ	0,40	0,09	0,29	-0,38	0,53	-0,01	-0,16	0,14	0,65	0,08	0,36	0,07	0,01	-0,13	-0,10	0,24
Гипертиреоз	0,40	-0,03	0,36	-0,22	0,38	0,16	-0,25	-0,41	0,55	0,15	0,38	0,07	0,16	-0,27	-0,15	0,19
Lg ИМТ	0,21	0,06	-0,41	-0,37	-0,37	0,34	-0,17	0,20	0,21	0,61	-0,43	0,12	-0,05	0,15	-0,18	-0,38
Наличие СД	0,34	-0,10	-0,30	-0,15	0,36	0,20	0,40	-0,40	0,16	0,29	-0,08	0,37	-0,13	0,39	0,39	-0,27
Курение	-0,04	0,72	0,11	0,06	0,02	-0,30	-0,22	-0,20	-0,40	0,07	-0,19	0,19	-0,41	-0,14	0,16	-0,08
Фракция выброса	0,07	0,33	-0,06	-0,25	-0,09	-0,32	0,41	0,11	0,03	-0,49	-0,10	0,18	0,43	-0,08	-0,48	-0,05
ТЗС	0,32	0,23	-0,41	-0,06	0,18	-0,40	-0,24	0,32	0,00	0,26	-0,49	0,37	0,11	-0,37	-0,32	-0,05
ДЛП	0,12	0,06	-0,57	-0,27	-0,31	0,23	-0,19	-0,29	-0,16	0,62	-0,23	0,38	-0,11	0,09	-0,20	0,14
Lg QRS	0,18	-0,30	0,34	-0,40	-0,29	0,28	-0,37	-0,05	-0,28	0,14	0,34	-0,44	-0,07	-0,13	0,16	-0,11
Кардиоверсия	-0,18	0,48	0,23	-0,08	-0,39	-0,17	-0,43	-0,35	-0,44	0,13	0,61	0,16	0,19	-0,19	0,18	-0,31
рЧА в анамнезе	-0,02	0,42	0,55	-0,16	-0,02	0,16	0,13	0,15	0,42	-0,41	0,31	0,02	0,06	0,46	0,06	-0,04
Объясненная доля дисперсии	3,33	2,75	2,26	1,88	1,68	1,63	1,38	1,23	3,34	2,68	2,40	1,86	1,79	1,49	1,30	1,22
Накопленная доля дисперсии, %	14,5	26,4	36,3	44,5	51,8	58,8	64,8	70,2	14,5	26,2	36,6	44,7	52,5	58,9	64,6	69,9

Примечания: ячейки затупеваны по правилу $1/3 < |r| < 2/3$ — серый, $2/3 < |r| < 1$ — черный; ФП — фибрилляция предсердий; Lg — десятичный логарифм; EHRA — шкала симптомов ФП; ГБ — гипертоническая болезнь; АД — артериальное давление; ИБС — ишемическая болезнь сердца; ПЖ — шитовидная железа; ИМТ — индекс массы тела; СД — сахарный диабет; ТЗС — толщина задней стенки левого желудочка; ДЛП — диаметр левого предсердия; QRS — ширина комплекса QRS; рЧА — радиочастотная абляция.

F_2 — 10 и 9, F_3 — 9 и 9. Наряду с этим имеются и различия, наиболее явные при рассмотрении F_1 и F_2 (табл. 2).

В частности, F_1 в I и II группах при общих признаках, характеризующих «пол», формы ФП, «наличие и стадии гипертонической болезни», «патологию щитовидной железы», различаются по вкладу признаков «возраст на момент появления ФП», «ЕНРА градация ФП», «кардиоверсия» и «РЧА в анамнезе». Последние два признака вошли в структуру F_2 больных II группы. Вклад признака «табакокурение» в структуру F_2 больных I группы (с весом 0,72) и F_1 больных II группы (с весом -0,4) представляет особый с прогностических позиций интерес, поскольку он считается одним из основных модифицируемых кардиоваскулярных ФР и в нашем случае входит в F_1 и F_2 в сопоставляемых группах с разными знаками.

Результаты использования метода главных компонент, дополняя представление о структуре соотношений исследуемых характеристик больных обеих групп, подтверждает их потенциальную, хотя и слабую, прогностическую значимость. Однако при этом следует признать, что при объёмах анализируемых выборок больных и особенностях исследуемых показателей (по их вкладам в структуры факторов) нельзя рассчитывать на обеспе-

чение высокой точности индивидуального прогнозирования. Тем не менее, полученные данные обосновывают выбор в качестве следующего этапа исследования использование возможностей дискриминантного анализа.

При реализации пошагового (с включением) дискриминантного анализа (общая линейная модель) была построена дискриминантная функция (ДФ) с уровнем значимости различий $p < 0,001$ (рис. 2). Характеристики ДФ, дифференцирующей сопоставляемые группы, представлены в таблице 3. В их число вошли 12 признаков, вклад которых в ДФ приводится по убывающей. Максимальная факторная нагрузка свойственна фактору «кардиоверсия в анамнезе», наименьшая — «табакокурение». Точность выборочной классификации, определенной в итоге настоящего исследования ДФ, составляет 80 %. Чувствительность решающего правила, определяемого ДФ, составляет 82 %, специфичность — 79 %; отношение шансов $OR = 16,5$; 95 %-ый доверительный интервал для OR : $CI = [4,66; 58,37]$.

Обсуждение

РЧА с изоляцией ЛВ все шире внедряется в клиническую практику на фоне роста числа пациентов с ФП по мере старения населения планеты [1, 3, 17]. Параллельно увеличивается и численность

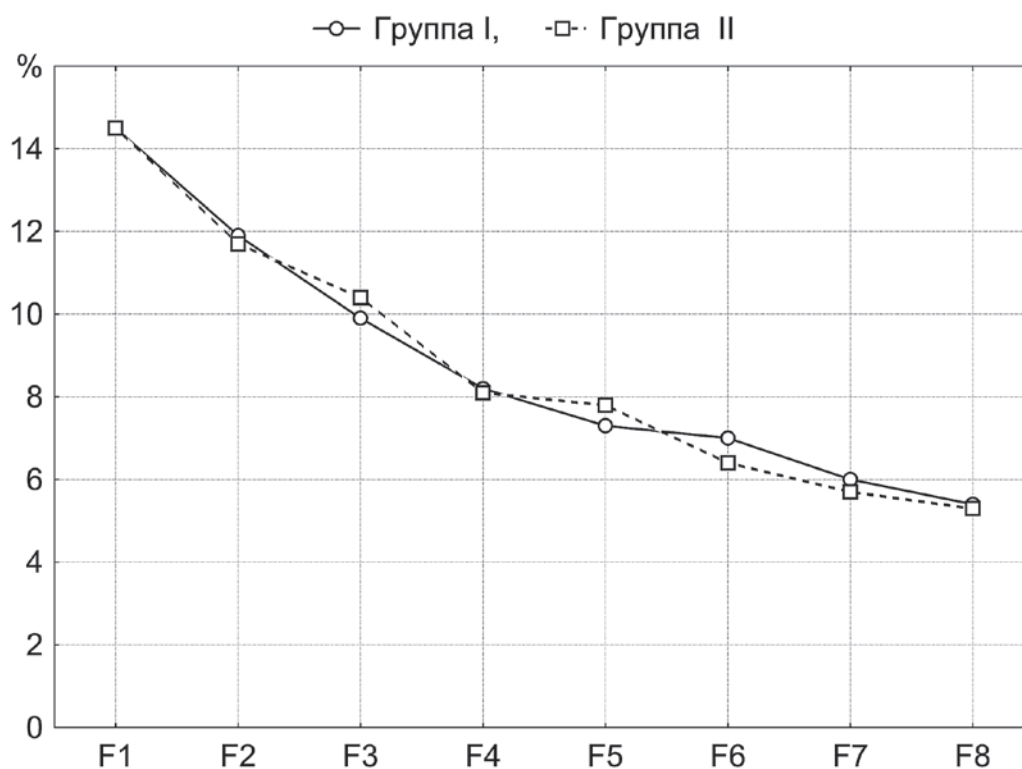


Рис. 1. Диаграмма вкладов в объясненную дисперсию первых восьми факторов при анализе главных компонент в группах I и II

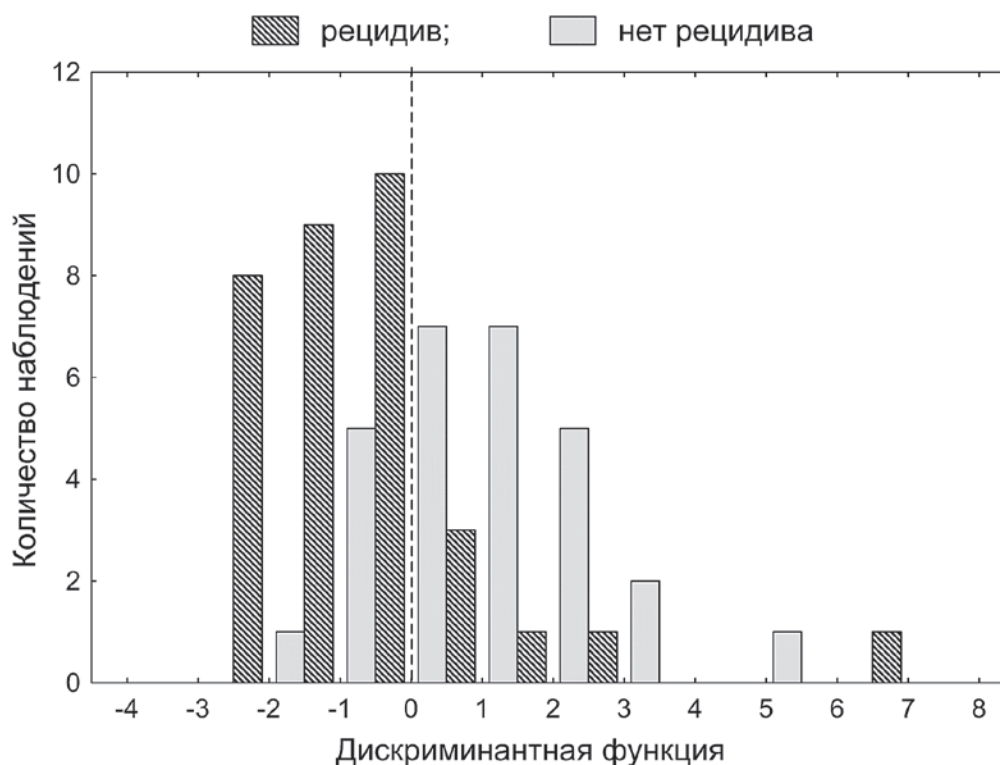


Рис. 2. Гистограмма значений дискриминантной функции для исследуемых групп

больных, с сохраняющимся синусовым ритмом, с восстановлением которого обоснованно связывается уменьшение/ликвидация клинических проявлений ФП, модификация аритмогенного субстрата, прекращение дальнейшего ремоделирования миокарда и возможная его регрессия. Высказываются предположения, что больные с рецидивами ФП составляют особую категорию, которую характеризуют особенности процессов фибрирования и апоптоза [7, 13]. Важным предметом обсуждения признается и зависимость риска рецидива ФП от глубины повреждения миокарда в условиях интервенционного воздействия, несвоевременности его выполнения [18]. В этом плане клиническую значимость приобретают исследования, посвященные распознаванию пациентов с риском рецидивов ФП, то есть их предикторов. Последние условно могут быть разделены на дооперационные и ассоциированные с интервенционным вмешательством. Данный подход соответствует реализуемой с середины прошлого века концепции факторов риска неинфекционных заболеваний, ставшей основой успешного развития современной профилактической медицины. Вероятная точность клинического прогнозирования связывается с многочисленными особенностями пациентов, патологического процесса, характером лечебно-профилактических воздействий, их осложнений, учет которых в ходе

наблюдения за больными способен отражаться на предиктивности совокупностей показателей, регистрировавшихся ранее [15, 16]. В настоящей работе предметом исследования были выбраны дооперационные предикторы рецидива ФП у больных, которым РЧА была выполнена в течение трехмесячного периода 2015 года (февраль–апрель), и которые в последующем наблюдались на протяжении 3 лет. Интервенционное вмешательство осуществлялось одной бригадой специалистов НИО аритмологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России (заведующий — д.м.н., профессор Д. С. Лебедев).

Возможные ограничения настоящего исследования были очевидны исходно при планировании работы и определялись, в первую очередь, численностью группы больных с возникшими в указанный период рецидивами ФП. В частности, это не позволило ввиду снижающейся при этом «статистической мощности» исследования разделить больных II группы с рецидивом ФП на подгруппы с целью оценки высказанного Kim M.N., et al. (2014) положения о различиях предикторов рецидивов в зависимости от сроков их возникновения [19].

Исходно в исследование было включено 34 показателя с последующим определением различий их вклада в характеристику больных обеих групп. В итоге с учетом частоты встречаемости призна-

Таблица 3. Характеристики дискриминантной функции

Показатели	Факторные нагрузки	Коэффициенты дискриминантной функции
Кардиоверсия в анамнезе	0,32	1,86
ИБС	0,25	1,17
Возраст возникновения ФП	0,24	0,05
Патология щитовидной железы	-0,21	-1,00
Фракция выброса	0,20	0,05
НМК/ТИА	-0,15	-2,04
Систолическое АД	0,12	0,04
Размер левого предсердия	0,11	0,08
ИМТ	0,09	0,06
Пол	-0,08	-1,32
Тахисистолия	-0,06	-1,45
Табакокурение	-0,05	-1,67
Constant	—	119,41

Примечания: ИБС — ишемическая болезнь сердца, ФП — фибрилляция предсердий, НМК/ТИА — нарушение мозгового кровообращения/транзиторная ишемическая атака, АД — артериальное давление, ИМТ — индекс массы тела.

ков, результатов корреляционного анализа — сопоставления плеяд парных корреляций, число потенциально значимых признаков уменьшилось до 23, которые были подвергнуты исследованию методами многомерной статистики. В качестве основного приема был выбран метод главных компонент, обеспечивающий выделение совокупности признаков (симптомокомплексы) — факторов, представляющих новый независимый признак с упорядоченными по информативности корреляционными связями [14, 16]. Установленная значимая, хотя и низкая теснота связей большинства исследуемых показателей сочетается в обеих группах с исходно низкой предиктивной информативностью факторов, судя по их вкладам, при том, что первые три из них, различаясь по структуре, включают практически все анализируемые признаки. Такого рода результаты предполагают, что прогностический индекс риска рецидива ФП после РЧА ЛВ должен быть сложным по структуре, определяемой особенностями включаемых в исследование показателей, что убедительно подтверждается данными Долгиной С. И. и др. (2006) [20].

Использование общей линейной модели дискриминантного анализа закономерно считается основным завершающим этапом исследования оптимальных дифференциально-диагностических симптомов / симптомокомплексов. Предшеству-

ющие этапы анализа с применением различных подходов осуществлялись с целью формирования оптимальных в количественном и качественном отношении групп больных и их характеристик.

Построенная дискриминантная функция (по 12 из 23 признаков) статистически значимо разделила исследуемые группы с точностью классификации 80 %. Величины факторных нагрузок ДФ позволяют считать, что для прогнозирования рецидива ФП по дооперационным показателям наиболее актуальны: проаритмическая уязвимость миокарда, отражением которой являются кардиоверсия в прошлом, применявшаяся для купирования пароксизмов, наличие ИБС, патологии щитовидной железы, возраст, в котором возникла (была выявлена) ФП, состояние сократительной функции миокарда. С клинических позиций заслуживает внимания и то, что в структуру ДФ вошли и 3 модифицируемых признака [уровень АД (САД), индекс массы тела (ИМТ) и табакокурение], эффект которых по отдельности, даже незначительный по сравнению с другими характеристиками, в совокупности с ними значимо увеличивает риск рецидива ФП. Иллюстрацией сказанному является то, что среди курящих пациентов, перенесших ранее кардиоверсию, риск рецидива, как следует из анализа таблиц сопряженности, увеличивается втрое.

Таким образом, результаты выполненного клинико-математического анализа демонстрируют реальность и перспективность разработки прогностического индекса риска возникновения рецидивов ФП после РЧА с изоляцией легочных вен и планирования мероприятий по снижению их возникновения. В связи с безусловной практической значимостью решения обсуждаемой проблемы такого рода исследование, результаты которого могут быть внедрены в короткие сроки, заслуживает проведения в многоцентровых условиях по единому протоколу, с учетом, в том числе, параметров РЧА, особенностей системы навигации, глубины повреждения миокарда и других.

Выводы

1. Трехлетнее наблюдение за больными, перенесшими РЧА с изоляцией ЛВ, выявило развитие рецидива ФП в 48 % случаев. Из них на первом году рецидив развился у 43 % больных, на втором — у 37 %, на третьем — у 20 %.

2. На основании клинико-математического анализа исследуемых дооперационных потенциально прогностических показателей в качестве оптимального информативного прогностического индекса выделена совокупность признаков, включающая: кардиоверсию в анамнезе; длительность наличия ФП, фракцию выброса левого желудочка, наличие патологии щитовидной железы, ИБС, уровень АД, индекс массы тела, табакокурение.

3. С учетом значимости проблемы интервенционного лечения больных с ФП обосновано мнение о безусловной клинической целесообразности организации отечественного многоцентрового исследования с единым протоколом, единым аналитическим аппаратом, отвечающего требованиям «медицины, основанной на доказательствах».

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Diagnosis and treatment of atrial fibrillation. Rossijskij kardiologicheskij zhurnal= Russian Journal of Cardiology. 2013; 4 (102): 5–100. In Russian [Диагностика и лечение фибрилляции предсердий. Российский кардиологический журнал. 2013; 4 (102): 5–100].
2. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, et al. ESC guidelines for the management of atrial fibrillation patients developed in collaboration with EACTS. Rossijskij kardiologicheskij zhurnal=Russian Journal of Cardiology. 2017; 7 (147): 7–86. In Russian [Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D и др. Рекомендации ESC по лечению пациентов с фибрилляцией предсердий, разработанные со-

вместно с EACTS. Российский кардиологический журнал. 2017; 7 (147): 7–86].

3. Schlachto EV. Cardiology: national leaders. M.: GEOTAR-media, 2019. p. 472. In Russian [Шляхто Е.В. Кардиология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. с. 472].

4. Oganov RG, Denisov IN, Simanenkova VI, et al. Comorbidities in practice. Clinical guidelines. Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika=Cardiovascular Therapy and Prevention. 2017; 16 (6): 5–56. In Russian [Оганов Р.Г., Денисов И.Н., Симаненков В.И. и др. Коморбидная патология в клинической практике. Клинические рекомендации. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2017; 16 (6): 5–56].

5. Ardashev AV, Zhelkov EG, Dolgushina EA, et al. Radiofrequency ablation of chronic atrial fibrillation by combined isolation of pulmonary veins and anatomical modification of substrate of arrhythmia. Cardiology. 2008; 12: 41–48. In Russian [Ардашев А.В., Желяков Е.Г., Долгушина Е.А. и др. Радиочастотная катетерная абляция хронической формы фибрилляции предсердий методом изоляции легочных вен и анатомической модификации субстрата аритмии. Кардиология. 2008; 12: 41–48].

6. Oral H, Pappone C, Chugh A, et al. Circumferential pulmonary-vein ablation for chronic atrial fibrillation. N Engl J Med. 2006; 354 (9): 934–941.

7. Roy D, Talajic M, Dorian P et al. Amiodarone to prevent recurrence of atrial fibrillation. Canadian trial of atrial fibrillation investigators. N Engl J Med 2000; 342: 913–920.

8. Revishvili AS, Rzayev FG, Dishekov MR, et al. Distant results of treatment of patients with tahi-bradycardia syndrome. Byulleten' NCSSKH im. A. N. Bakuleva RAMN. Serdechno-sosudistye zabolovaniya=Bulletin of A. N. Bakulev SCCVD RAMS. Cardiovascular diseases. 2008; 9 (S6): 94. In Russian [Ревишвили А.Ш., Рзаев Ф.Г., Дишеков М.Р. и др. Отдаленные результаты лечения больных с синдромом тахи-брадикардии. Бюллетень НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН. Сердечно-сосудистые заболевания. 2008; 9 (S6): 94].

9. Rogers ChA, Angelini GD, Cllliford LA, et al. Coronary surgery in patients with preexisting chronic atrial fibrillation: early and midterm clinical outcome. Ann Thorac Surg. 2006; 81: 1676–1682.

10. Haissaguerre M, Hocini M, Sanders P, et al. Catheter ablation of long-lasting persistent atrial fibrillation: clinical outcome and mechanisms of subsequent arrhythmias. J Cardiovasc Electrophysiol. 2005; 16 (11): 1138–1147.

11. Chernyavsky AM, Rahmonov SS, Park IA, et al. Evaluation of the effectiveness of epicardial radiofrequency ablation of anatomical zones of left atrial ganglion plexus in patients with ischemic heart disease and atrial fibrillation. Patologiya krovoobrashcheniya i kardiohirurgiya=Circulatory pathology and cardiac surgery. 2014; 18 (1): 14–19. In Russian [Чернявский А.М., Рахмонов С.С., Пак И.А. и др. Оценка эффективности эпикардальной радиочастотной абляции анатомических зон ганглионарных сплетений левого предсердия у больных ишемической болезнью сердца и фибрилляцией предсердий. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2014; 18 (1): 14–19].

12. Ngaage DL, Schaff HV, Mullany CJ, et al. Does preoperative atrial fibrillation influence early and late outcomes of coronary artery bypass grafting? J Thorac Cardiovasc Surg. 2007; 133 (1): 182–189.

13. Hindricks G, Piorkowski C, Tanner H, et al. Perception of atrial fibrillation before and after radiofrequency catheter ablation: relevance of asymptomatic arrhythmia recurrence. *Circulation*. 2005; 112 (3): 307–313.

14. Bart AG. Analysis of medical and biological systems: method of partially reverse functions. SPb.: University SPB, 2002. с. 280. In Russian [Барт А. Г. Анализ медико-биологических систем: метод частично обратных функций. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. с. 280].

15. Alekseeva NP, Gorlova IA, Bondarenko BB. Forecasting hypertension risk based on the method of projective classification. *Arterial hypertension*. 2017; 23 (5): 472–480. In Russian [Алексеева Н.П., Горлова И.А., Бондаренко Б.Б. Возможности прогнозирования возникновения артериальной гипертензии на основе метода проективной классификации. *Артериальная гипертензия*. 2017; 23 (5): 472–480].

16. Bondarenko BB, Bart VA, Demchenko EA, et al. Current aspects of clinical and statistical analysis methodology. In: Shlyakhto EV, ed. *Clinical and experimental cardiology*. SPb.: Academic Medical Center, 2005: 136–148. In Russian [Бондаренко Б. Б., Барт В. А., Демченко Е. А. и др. Актуальные аспекты методологии клинко-статистического анализа. В кн.: Шляхто Е.В. Клиническая и экспериментальная кардиология. СПб.: Академический медицинский центр, 2005. С. 136–148].

17. Chugh SS, Rothly GA, Gillum RF. Global burden of atrial fibrillation in developed and developing nations. *Glob Heart*. 2014; 9 (1): 113–119.

18. January CT, Wann LS, Calkins H, et al. 2019 AHA/ACC/HRS Focused Update of the 2014 AHA/ACC/HRS Guideline for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American college of cardiology/American heart association task force on clinical practice guidelines and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol*. 2019; 74 (1): 104–132.

19. Kim M-N, Lee JJ, Kim S-A, et al. The difference of predictors for recurrence after catheter ablation of non-paroxysmal atrial fibrillation according to follow-up period. *Int Heart J*. 2014; 55 (4): 312–318.

20. Dolginina SI, Garkina SV, Khokhlunov SM, et al. Modelling of patient prognosis after interventional treatment of atrial fibrillation considering possible predictors of arrhythmia recurrence. *Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine*. 2016; 3 (2): 17–22. In Russian. [Долгинина С.И., Гарькина С.В., Хохлунов С.М. и др. Моделирование прогноза пациентов после интервенционного лечения фибрилляции предсердий с учетом возможных предикторов рецидива аритмии. *Трансляционная медицина*. 2016; 3 (2): 17–22].

Информация об авторах:

Бондаренко Борис Борисович, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник НИЛ профилактической кардиологии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Григорьева Александра Валерьевна, врач-кардиолог, ГБУЗ ЛО «Гатчинская КМБ»;

Соколова Людмила Андреевна, д.м.н., профессор, профессор, ведущий научный сотрудник НИЛ профилактической кардиологии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Барт Виктор Александрович, к.ф.-м.н., доцент кафедры общей математики и информатики, Санкт-Петербургский государственный университет;

Горлова Ирина Александровна, к.м.н., научный сотрудник НИЛ профилактической кардиологии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Иванов Сергей Юрьевич, к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ профилактической кардиологии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Омельченко Марина Юрьевна, к.м.н., научный сотрудник НИЛ профилактической кардиологии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Bondarenko Boris B., Dr. Sc., Professor, Chief Researcher, Department of Preventive Cardiology, Almazov National Medical Research Centre;

Grigoryeva Alexandra V., Cardiologist, Gatchina Clinical Hospital;

Sokolova Lyudmila A., Dr. Sc., Professor, Leading researcher, Department of Preventive Cardiology, Almazov National Medical Research Centre;

Bart Victor A., PhD, Associated Professor, Department of General Mathematics and Informatics, Saint Petersburg State University;

Gorlova Irina A., PhD, Researcher Department of Preventive Cardiology, Almazov National Medical Research Centre;

Ivanov Sergey Yu., PhD, Senior Researcher, Department of Preventive Cardiology, Almazov National Medical Research Centre;

Omelchenko Marina Yu., PhD, researcher, Department of Preventive Cardiology, Almazov National Medical Research Centre.

РОЛЬ ЭКЗОСОМ В ПАТОГЕНЕЗЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Щава С. П.^{1,2}, Степанов Е. В.¹, Сорокин В. А.^{1,2}

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет», Медицинский центр, о. Русский, Владивосток, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Владивосток, Россия

Контактная информация:

Щава Сергей Петрович,
ФГАОУ ВО ДВФУ,
п. Аякс, д. 10, о. Русский, г. Владивосток,
Россия, 690922.
E-mail: sergey_schava@yahoo.com

Статья поступила в редакцию 18.05.2020
и принята к печати 11.10.2020.

Резюме

Согласно Всемирной организации здравоохранения, от болезней сердца и сосудов в современном мире ежегодно умирает 17,5 млн человек. Вследствие этого изучение молекулярных механизмов патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний имеет критическое значение для разработки новых диагностических и терапевтических стратегий. Одной из стратегий в данном направлении является исследование роли малых внеклеточных везикул, или экзосом, в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Изучение экзосомальной транспортной и сигнальной систем в развитии таких патологий, как острый коронарный синдром, стабильная стенокардия, клапанные пороки сердца, гипертрофическая кардиомиопатия, атеросклеротическое поражение периферических артерий является актуальной задачей.

К экзосомам относят сферические везикулы эндосомального происхождения размером 30–100 нм, экспрессируемые практически всеми клетками человеческого организма. Их цитоплазматическая мембрана представляет собой липидный бислой, содержащий в качестве маркеров тетраспанины CD9, CD63, CD81 и CD82. Активное содержимое в виде различных микроРНК, мРНК, цитокинов и факторов роста, клеточных мембранных рецепторов позволяет экзосомам выступать в роли эффекторов в межклеточной коммуникации и выполнять транспортную функцию.

В настоящей работе представлен анализ данных литературы о роли экзосомальной сигнализации в развитии основных кардиологических синдромов, а также перспективах использования экзосом в клинической практике.

Ключевые слова: ангиогенез, апоптоз, внеклеточные везикулы, ишемия, микроРНК, цитопротекция, экзосомы.

Для цитирования: Щава С.П., Степанов Е.В., Сорокин В.А. Роль экзосом в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Трансляционная медицина. 2020; 7 (5):17-28. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-17-28

THE EXOSOMES ROLE IN PATHOGENESIS OF CARDIOVASCULAR DISEASES

Schava S. P.^{1,2}, Stepanov E. V.¹, Sorokin V. A.^{1,2}

¹Far Eastern Federal University Medical Center, Russky Island, Vladivostok, Russia

²Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

Corresponding author:

Schava Sergey P.,
Far Eastern Federal University Medical Center,
Settlement Ajax 10, Russky Island,
Vladivostok, Russia, 690922.
E-mail: sergey_schava@yahoo.com

Received 18 May 2020; accepted 11 October 2020.

Abstract

According to World Health Organization, annually cardiovascular diseases cause 17,5 billion deaths in the developed world. This is the reason why the study of molecular mechanisms of these pathologies has a huge importance for the development of new diagnostic and therapeutic strategies. One of the strategies on this matter is the research of the small extracellular vesicles or exosomes and its role in pathogenesis of cardiovascular diseases. Exploring their transporting and signaling functions in the development of acute coronary syndrome, stable angina, heart valve diseases, hypertrophic cardiomyopathy, vascular atherosclerosis has a great importance.

Exosomes are spherical vesicles of 30–100 nm, expressed by almost all human cells. Their cytoplasmic membrane has lipid bilayer structure with tetraspanins CD9, CD63, CD81 and CD82 as the markers. Exosomes act as effectors transferring microRNA, mRNA, cytokines and growth factors between various cells.

The aim of this review is to analyze the literature data of exosomal role in the development of main cardiovascular syndrome's and evaluation of existed literature on exosomes potential as therapeutic target.

Key words: angiogenesis, apoptosis, cytoprotection, exosomes, extracellular vesicles, ischemia, miRNA, mRNA.

For citation: Schava SP, Stepanov EV, Sorokin VA. The exosomes role in pathogenesis of cardiovascular diseases. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020 ;7 (5):17-28. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-17-28

Список сокращений: ИК — искусственное кровообращение, КСК — кардиальные стволовые клетки, МСК — мезенхимальные стволовые клетки, ПОКД — послеоперационная когнитивная дисфункция, ЭСК — эмбриональные стволовые клетки.

Введение

Изучение молекулярных механизмов патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний имеет фундаментальное значение для разработки новых терапевтических стратегий. Одним из ключевых факторов межклеточной коммуникации являются экзосомы, малые внеклеточные везикулы эндосомального происхождения, участвующие в широком спектре физиологических и патологических процессов.

В настоящее время активно изучается регуляторная роль экзосом кардиоваскулярной системы

в развитии острой миокардиальной ишемии, реперфузионного синдрома, коронарного атеросклероза, ремоделирования миокарда при кардиомиопатиях и хронической сердечной недостаточности, клапанной патологии сердца, ответе организма на анестезию и искусственное кровообращение во время кардиохирургических операций [1–8].

Механизмы формирования и физиология экзосом

Впервые термин «экзосома» был применен в 1981 году при описании синтезируемых клетками липидсодержащих частиц субмикронного размера [9]. В последующем этот термин использовался применительно к частицам, имеющим диаметр около 50 нм, содержащим рецепторы трансферрина и происшедшим от созревающих ретикулоцитов [10]. В настоящее время принято считать, что эк-

зосомы представляют собой пул самых маленьких внеклеточных везикул, имеющих средний размер 30–100 нм, сферическую форму, эндосомальное происхождение и неспособных к самовоспроизведению [11–14]. Для сравнения основные виды внеклеточных везикул и их краткая характеристика приведены в таблице 1.

На данный момент известно, что, помимо кардиомиоцитов [15], экзосомы могут синтезироваться практически во всех клетках сердечно-сосудистой системы. Доказан синтез экзосом в эндотелиальных и гладкомышечных клетках, перикардах, фибробластах и иммунокомпетентных клетках крови [16–20]. Особое место занимают экзосомы стволовых клеток, таких как мезенхимальные, кардиальные прогениторные *Scal+*, либо резидентные кардиальные *c-kit+*, *WT1+*, *W8B2+*, выраженная паракринная активность которых во многом обусловлена именно синтезом экзосом [21–25].

Цитоплазматическая мембрана экзосом представляет собой липидный бислой толщиной около 5 нм, состоящий преимущественно из фосфатидилхолина, а также фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина, церамида и сфингоми-

елина, и обогащенный снаружи сахарами маннозой, полилактозамином, альфа-2,6-салициловой кислотой и N-связанными гликанами [26]. Отмечается, что благодаря своей биохимической композиции, мембрана способна защищать содержимое экзосом от разрушающего влияния РНКаз, трипсина и других энзимов [27, 28]. Основными мембранными маркерами экзосом считаются отвечающие за клеточную миграцию и сигналинг тетраспанины CD9, CD63, CD81, CD82 (рис. 1), а также белки трансмембранного транспорта аннексыны, флотиллин, гидролазы и белки теплового шока Hsp 70, Hsp 90 [29–31]. Помимо вышеупомянутых маркеров, в экзосомах детектируются интегрины, белки, отвечающие за адгезию частиц с целевыми клетками, и белки семейства Rab, участвующие во внутриклеточной сборке и везикулярном транспорте экзосом, а также протеины, участвующие в межклеточной коммуникации, такие как тромбоспондин, MFGE8, CD55, CD 59 и комплексы, отвечающие за биогенез мультивезикулярных эндосом Alix и TSG101 [32–34].

К нуклеиновым кислотам, содержащимся в экзосомах, относят митохондриальную ДНК и раз-

Таблица 1. Сравнительная характеристика основных видов внеклеточных везикул

Название	Размер, нм	Способ образования	Основные маркеры	Биологические функции
Экзосомы	30–100	Посредством формирования мультивезикулярных эндосом, секрецией непосредственно с поверхности клетки	CD9, CD63, CD81, CD82, Alix, Hsp 70, Hsp 90, Alix, TSG101	Стимуляция неоангиогенеза, протекция тканей при ишемии и реперфузии, участие в дифференцировке сосудистой сети эмбриона, формирование иммунного статуса новорожденного, презентация антигена и модуляция иммунного ответа, участие в дифференцировке стволовых клеток
Микровезикулы	160–1000	Путем блеббинга — высвобождения частиц непосредственно с поверхности материнской клетки	фосфатидилсерин, аннексин V, флотиллин-2, CD40	Стимуляция неоангиогенеза, прокоагуляционное действие, участие в костной минерализации, участие в опухолевом росте, участие в прогрессировании нейродегенеративных процессов
Апоптотные тельца	1000–5000	Образуются в финальной стадии клеточной фрагментации в результате апоптоза	ДНК, гистоны, аннексин V, тромбоспондин, белок C3b	Участие в формировании антибактериального иммунного ответа, участие в отторжении трансплантированных органов, стимуляция роста эндотелиоцитов, передача антигенов антигенпрезентирующим клеткам

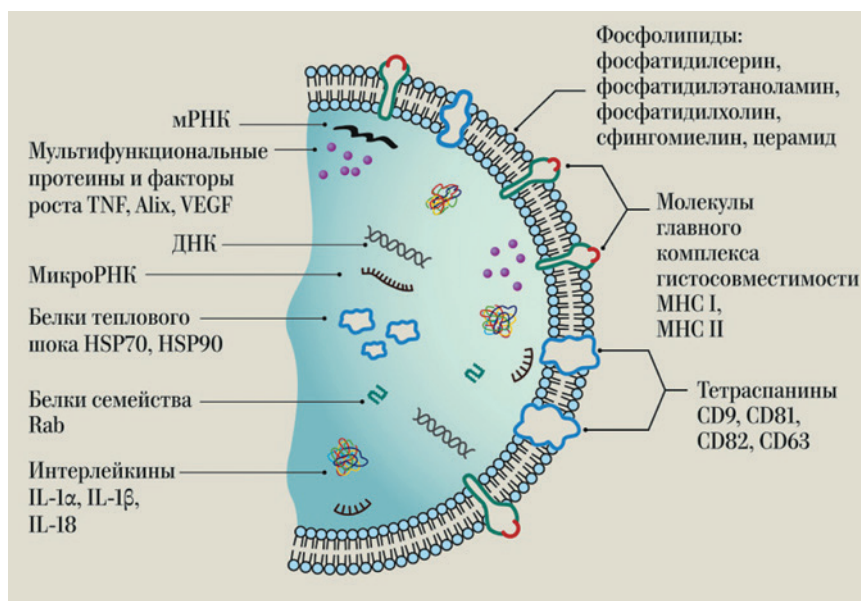


Рис. 1. Композиционный состав экзосомы

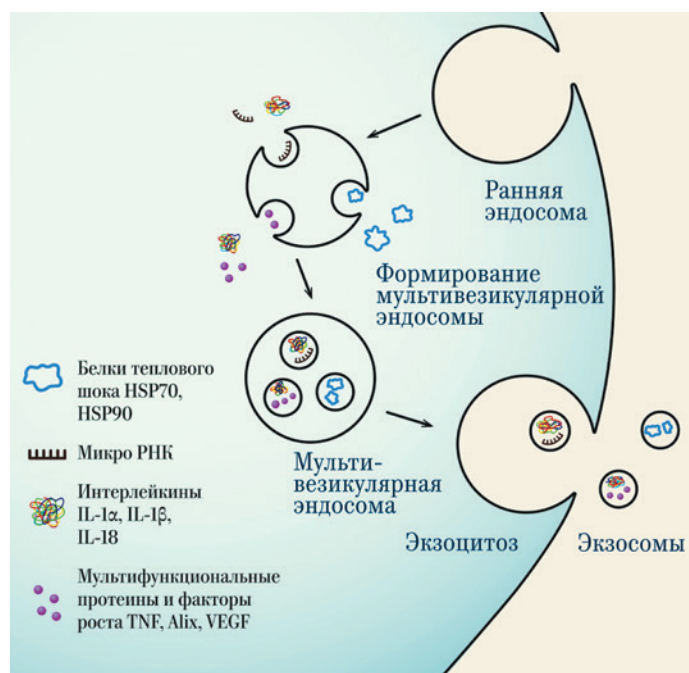


Рис. 2. Схема образования экзосом

личные формы РНК, такие как микроРНК, мРНК и ее фрагменты, рРНК и ее фрагменты, тРНК, длинные и короткие некодирующие РНК [35–38]. Особое значение имеют микроРНК, транспорт которых из экзосом в целевые клетки способен изменять биологические функции последних путем регуляции экспрессии в них таргетных генов [39]. Экзосомальные, как и клеточные микроРНК, являются некодирующими нуклеиновыми кислотами, транскрибируемыми в материнской клетке в виде длинных первичных микроРНК с помощью

РНК-полимеразы II и затем укорачивающихся под воздействием энзима Dicer до последовательности в 17–24 нуклеотидов [40, 41]. Последующая избирательная загрузка РНК из цитоплазмы материнской клетки происходит на этапе формирования мультивезикулярных эндосом благодаря аффинности определенных участков нуклеиновых кислот к рафтоподобным областям наружной мембраны эндосомы, состоящим из холестерина, гликофинголипидов, сфингомиелина и фосфатидилхолина [42]. Поступив в целевую клетку, микроРНК эк-

зосом связываются с комплементарными 3'-НТО мРНК, ингибируя тем самым их трансляцию [43].

Экзосомы синтезируются путем инвагинации материнской клеточной части цитоплазматической мембраны и формирования структуры, называемой ранней эндосомой (рис. 2). Затем процесс повторяется — мембрана ранней эндосомы инвагинируется и образует везикулы около 30–100 нм в диаметре, заполненные активным содержимым, собственно будущие экзосомы, а сама эндосома размером 250–1000 нм становится таким образом мультивезикулярной [44, 45]. Последующий процесс слияния мембран мультивезикулярной эндосомы и материнской клетки посредством кальций-зависимого экзоцитоза с участием актина, миозинов, микротрубочек и белков группы SNARE высвобождает экзосомы во внеклеточную среду [46–48]. Определяющую роль в формировании мультивезикулярных эндосом и секреции экзосом играют эндосомальные транспортные сортирующие комплексы ESCRT и белки семейства Rab, тогда как инициация их синтеза обуславливается путем активации рецепторов клетки к различным

выступающим в качестве стимулов факторам роста [21, 49–51].

Связь экзосом с сердечно-сосудистой патологией

Ишемическая болезнь сердца

Одной из компенсаторных реакций миокарда, развивающихся в ответ на его ишемическое и реперфузионное повреждение, является экспрессия экзосом кардиомиоцитами, эндотелиальными и гладкомышечными клетками, стволовыми клетками сердца и фибробластами [52–55]. Экзосомальный синтез имеет паракринную функцию и направлен на обеспечение межклеточного взаимодействия в пределах зоны ишемии, обуславливая кардиопротекцию и промотируя неоангиогенез. Кроме того, функционально активные экзосомы присутствуют в перикардиальной жидкости, моче и системном кровотоке, выполняя эндокринные функции и обеспечивая межорганную коммуникацию [56].

Так, в плазме пациентов, перенесших острый инфаркт миокарда, детектируется значительное по-

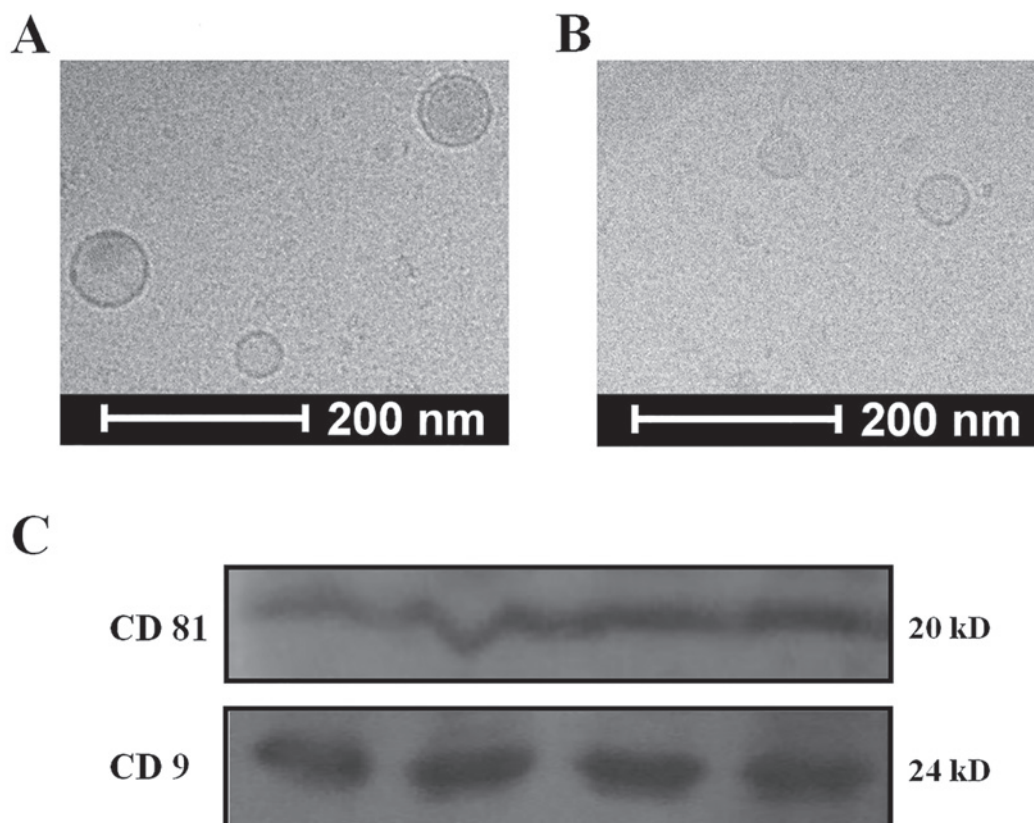


Рис. 3. Экзосомы, выделенные из плазмы пациента, перенесшего острый инфаркт миокарда (А), и пациента со стабильной стенокардией напряжения (В), электронная микроскопия, масштаб 200 нм. Вестерн-блоттинг (С) выявил наличие в экзосомах маркеров CD9 (24 kDa) и CD81 (20 kDa) [57] (с разрешения Molecular and Cellular Proteomics © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology)

вышение CD9- и CD81-позитивных экзосом, в сравнении с плазмой пациентов, имеющих стабильную стенокардию напряжения (рис. 3). Безмаркерный количественный протеомный анализ показывает наличие в экзосомах белков системы комплемента C1Q (A, B, C, R), C (2, 3, 5, 6), C8 (A, B, G), C9, CFH, и CFI, участвующих в постинфарктном метаболизме липопротеинов, тромбоцитарной активации и снижении уровня фибриногена [57]. Экзосомы перикардиальной жидкости содержат микроРНК-208 и способны при воздействии на культуру сосудистых эндотелиальных клеток, содержащихся в условиях гипоксии, стимулировать ангиогенез, ингибируя апоптоз и ускоряя клеточную пролиферацию и формирование капиллярноподобной клеточной сети. Так же установлено, что через семь дней после введения перикардиальных экзосом в мышечные ткани конечности мыши, в которой предварительно хирургическим путем редуцируется кровоток, снижается частота развития ишемического некроза и увеличивается плотность капиллярной сети ишемизированных мышц [58].

К паракринным эффектам синтезированных экзосом относят усиление пролиферации, миграции эндотелиоцитов и снижение процессов апоптоза в зоне гипоксии [59]. Повышение проницаемости эндотелиального слоя, предшествующее миграции эндотелиоцитов, обеспечивается экзосом-опосредованным угнетением синтеза в них протеинов плотных межклеточных контактов ZO-1 и Клаудина-5 [60]. Последующие процессы неоангиогенеза связаны с действием экзосомальных микроРНК, в частности микроРНК-939-5p, и регуляцией экспрессии в эндотелиальных клетках нитрооксидсинтаз iNOS и eNOS, факторов VEGF и HIF-1 α , ангиопоэтина-1 [61]. Так, проангиогенные свойства экзосом, полученных из коронарного кровотока пациентов с хронической ишемией миокарда, подтверждались в экспериментах *in vitro* при совместной их инкубации с человеческими эндотелиальными клетками и *in vivo* на модели ишемии конечности мыши. Отмечалось дозозависимое увеличение общей длины микротрубочек и плотности капиллярной сети в ишемизированных тканях в сравнении с группой контроля, где использовались экзосомы здоровых доноров [62].

При реперфузионном повреждении экзосомы оказывают протективное действие на миокард, с помощью собственных молекул протеинов теплового шока HSP70 связываясь с рецепторами кардиомиоцитов TLR4 и стимулируя тем самым фосфорилирование в них другого протеина этого же семейства, HSP27, увеличивающего устойчивость кардиомиоцитов к оксидативному стрессу и апоптозу. При

этом нейтрализация HSP70 в экзосомах прекращает их кардиопротективные свойства [63]. Подобный механизм наблюдается также и при действии на миокард ингаляционных анестетиков. Так, фибробласты миокарда новорожденных крыс в присутствии изофлюрана увеличивают синтез CD63+-позитивных экзосом, содержащих белки HSP/HSC70 [8].

В последние годы большой объем исследований посвящен экзосомам различных стволовых клеток, таких как мезенхимальные (МСК), кардиальные (КСК), эмбриональные (ЭСК) и гемопоэтические, и их влиянию на миокард при его ишемическом повреждении. Отмечается, что гипоксия как пусковой фактор приводит к увеличению экспрессии в стволовых клетках нейтральной сфингомиелиназы 2, отвечающей за экзосомальную секрецию [22]. Так, при введении в ишемизированный миокард крысы экзосом, синтезированных содержащимися в условиях гипоксии МСК и содержащих микроРНК-210, отмечалось уменьшение количества апоптотических кардиомиоцитов, снижение кардиального фиброза и улучшение систолической функции левого желудочка через 4 недели после инфаркта миокарда [64]. Кроме того, отмечается, что МСК костного мозга, содержащие фактор GATA-4, продуцируют экзосомы, не только замедляющие апоптоз и увеличивающие плотность капиллярной сети в зоне ишемии, но и стимулирующие дифференцировку самих МСК в кардиомиоцитоподобные клетки [65].

Введение в зону ишемии экзосом ЭСК, обогащенных кластером микроРНК-290-295, в частности микроРНК-294, стимулирует процессы неоангиогенеза, повышает устойчивость кардиомиоцитов к гипоксии и редуцирует фиброз. Указанные благоприятные эффекты сохраняются в течение 8 недель после введения, что связывается с дополнительным влиянием экзосом на c-kit⁺ КСК ишемизированного сердца [66]. Помимо стимулирующего влияния на целевые клетки, экзосомы одних стволовых клеток интернализуются другими стволовыми клетками, усиливая тем самым активность последних. Так, КСК, вводимые после их предварительной инкубации с CD29-, CD44- и CD90-позитивными экзосомами мезенхимального происхождения в миокард крысы через 48 часов после лигирования передней нисходящей артерии, приводят к значимому, согласно ЭхоКГ, приросту фракции выброса левого желудочка, а также дозозависимому увеличению плотности капиллярной сети и снижению кардиального фиброза [67]. Эти эффекты также связываются со снижением СаМКII-зависимого оксидативного повреждения самих КСК, регулируемого посредством микроРНК-214 экзосом МСК [68].

Поражение клапанов сердца

У пациентов с гемодинамически значимыми клапанными пороками сердца также наблюдается увеличение концентрации экзосом в плазме крови, очевидно в ответ на развившуюся хроническую сердечную недостаточность, с последующим снижением после хирургической коррекции порока. Так, при исследовании образцов крови 135 пациентов, страдающих стенозом аортального клапана, отмечалось снижение концентрации экзосом через 3 месяца после протезирования клапана биологическим протезом, либо после замены клапана в сочетании с аортокоронарным шунтированием. Однако в 15 случаях пациент-протезного несоответствия по размеру наблюдалось увеличение концентрации экзосом в сравнении с предоперационными показателями [69]. При этом повышенное содержание в крови малых внеклеточных везикул коррелировало с сывороточными уровнями креатинина и лактатдегидрогеназы, а также высоким гематокритом, указывая на возможное эритроцитарное происхождение экзосом [70]. Кроме того, отмечается, что микроРНК-210-, микроРНК-132- и микроРНК-146a-3p-позитивные экзосомы прогениторных клеток, полученные из ткани ушка предсердия во время операции по замене сердечного клапана и введенные впоследствии в зону инфаркта миокарда крысы, улучшали систолическую функцию левого желудочка, замедляли процессы апоптоза кардиомиоцитов и стимулировали неогенез в ишемизированной зоне [71].

При миксоматозной дегенерации митрального клапана, сопровождающейся фрагментацией и лизисом коллагеновых и эластиновых волокон его створок и хордального аппарата с последующим развитием митральной регургитации и ремоделированием камер сердца, также наблюдаются устойчивые изменения как экспрессии определенных типов микроРНК, так и экзосомального транспорта [72]. Так, на модели собаки с пролапсом и выраженной дисфункцией митрального клапана с развитием сердечной недостаточности высокого функционального класса установлено значительное увеличение концентраций экзосомальных микроРНК-181c, микроРНК-495, микроРНК-9 и снижение концентрации микроРНК-599 в сравнении со здоровыми особями [5].

Участие экзосом отмечено в регенерации поврежденных клапанных тканей. Так, в эксперименте *in vitro* установлено, что помимо стимуляции пролиферации эндотелиальных клеток, малые внеклеточные везикулы значительно ускоряли клеточную репопуляцию на предварительно децеллюляри-

рованных створках свиного клапана с помощью стволовых клеток жировой ткани [73].

Кардиомиопатии

В настоящее время широко обсуждается влияние экзосомального транспорта микроРНК на развитие гипертрофической кардиомиопатии. Так, традиционно считается, что фибробласты, составляющие до 70 % всей клеточной массы сердца, участвуют в кардиальном моделировании и ремоделировании за счет своей пролиферативной активности и синтеза коллагенов и фибронектина, входящих в состав внеклеточного матрикса [74]. Однако паракринные механизмы влияния фибробластов на кардиомиоциты до сих пор неясны. В опыте *in vitro* установлено, что в присутствии фибробластов в культуре кардиомиоцитов отмечается усиление последними синтеза виментина и тяжелых цепей миозина, сопровождающиеся гипертрофией и выраженным снижением контрактильности кардиомиоцитов [75]. Одним из таких паракринных механизмов может являться синтез кардиальными фибробластами экзосом, содержащих микроРНК-21. Влияние экзосом, содержащих микроРНК-21, на кардиомиоциты заключается в угнетении в последних экспрессии протеинов саркоплазмы SORBS2 и PDLIM5, что ведет к клеточной гипертрофии [76]. Участие в ремоделировании сердца также косвенно подтверждается наличием микроРНК-21 в перикардиальной жидкости мышей, страдающих гипертрофической кардиомиопатией [77].

В модели кардиального фиброза крысы отмечена повышенная экспрессия кардиомиоцитами экзосом, обогащенных микроРНК-208a. В культуре фибробластов эти экзосомы усиливали клеточную пролиферацию и дифференцировку в миофибробласты, а интрамиокардиальное введение экзосом здоровым крысам приводило к повышенному содержанию мРНК, кодирующих синтез коллагенов I, III типов и α -актина, и в целом ухудшало систолическую функцию левого желудочка [78].

В модели дилатационной кардиомиопатии мышам, страдающим мышечной дистрофией Дюшенна, интрамиокардиально вводились экзосомы миогенных прогениторных клеток. Уже на второй день после инъекции отмечалось восстановление синтеза дистрофина в кардиомиоцитах, сопровождающееся в последствии значимым приростом фракции выброса левого желудочка [4].

Кардиохирургические вмешательства

Ответ организма на действие искусственного кровообращения (ИК) во время кардиохирургиче-

ских операций выражается в развитии системной воспалительной реакции, а на микроциркуляторном уровне — в нарушении эндотелиального барьера и сосудистой проницаемости [79–81]. Одним из компенсаторных механизмов, направленных на смягчение указанных неблагоприятных эффектов, является экзосомальная экспрессия различными клетками сердечно-сосудистой системы.

Так, установлено, что применение аппарата ИК сопровождается увеличением концентраций в плазме интерлейкинов IL-1, IL-6, IL-8 и TNF α через 2, 4 и 24 часа после операции. Пиковая концентрация IL-6 и IL-8 наблюдается через 4 часа и снижается к концу первых суток. При этом значимое увеличение концентрации эритроцитарных и тромбоцитарных экзосом, содержащих микроРНК-223, наблюдается через 4 часа после операции и коррелирует со снижением провоспалительных цитокинов. В этой связи предполагается, что микроРНК-223 ингибирует синтез интерлейкинов и протеинового комплекса NLRP3 в моноцитах, тем самым снижая воспалительную реакцию организма в ответ на искусственное кровообращение [82].

Через 24 и 48 часов после операции коронарного шунтирования в условиях ИК в плазме пациентов также обнаруживалось значительное увеличение количества циркулирующих экзосом и микроРНК. При этом увеличение концентраций микроРНК-1, микроРНК-24, микроРНК-133а, микроРНК-133b и микроРНК-210 четко коррелировало с повышением уровня тропонина-I [83]. Также отмечается, что уровни митохондриальной и ядерной ДНК, транспортируемых экзосомами и микровезикулами, достигают максимума в плазме к 20 минуте ИК. Предполагается, что указанные изменения обусловлены в том числе и хирургической травмой и направлены на тромбоцитарную и лейкоцитарную активацию [84].

У пациентов с неврологическими нарушениями после операций на открытом сердце отмечается усиление экзосомальной экспрессии кольцевых РНК. Так, у 12 пациентов из 35, не имевших сопутствующей неврологической патологии в анамнезе, после выполнения коронарного шунтирования на работающем сердце регистрировалось повышение в плазме экзосомальной фракции circRNA_089763, сопровождающееся развитием послеоперационной когнитивной дисфункции (ПОКД). Сообщается, что, в отличие от маркеров, содержащихся в цереброспинальной жидкости, экзосомы, транспортирующие кольцевые РНК, свободно проникают через гематоэнцефалический барьер и могут быть использованы для дифферен-

циальной диагностики неврологических нарушений без применения люмбальной пункции [85].

В модели ПОКД *in vivo* после проведения ИК у крыс отмечались выраженные нарушения нейрональной цитоархитектоники гиппокампа. При этом интраперитонеальное введение экзосом мезенхимальных стволовых клеток перед процедурой искусственного кровообращения сопровождалось значительным снижением уровней сывороточных IL-1 β , IL-6 и TNF, а также имело цитопротективный эффект в виде уменьшения нейронального апоптоза и дегенерации [7].

Перспективы использования экзосом в клинической практике

Тканевая специфичность экзосом, целевая направленность их синтеза, быстрый ответ на патологические стимулы и присутствие в системном кровотоке делает перспективным применение экзосом в первую очередь в диагностике сердечно-сосудистых заболеваний.

Так, активно исследуются возможности оценки динамики содержания внеклеточных везикул в плазме пациентов с острым инфарктом миокарда методом проточной цитометрии с последующей автоматической обработкой полученных данных [86]. Изучается количественная динамика экзосомальных микроРНК как маркеров острой и хронической ишемии миокарда. Установлено, что в пренекротическую фазу острого инфаркта миокарда в кровотоке пациентов детектируется значительное увеличение микроРНК-133а и микроРНК-1, на несколько часов опережая повышение уровня тропонина Т. При этом в эксперименте *in vivo* обнаружена высокая концентрация экзосом, содержащих микроРНК-133а в зоне инфаркта [87]. При обследовании 159 пациентов с коронарной формой атеросклероза выявлено значительное снижение в крови экзосом, содержащих длинную некодирующую РНК (lncRNA) SOCS2-AS1, в том числе и у пациентов со стенозами коронарных артерий менее 50 %. Полученные данные позволяют рассматривать lncRNA SOCS2-AS1 как высокочувствительный маркер для диагностики ишемической болезни сердца, в особенности ранних ее стадий [3]. Кроме того, отмечается, что выбор источника забора крови (артерия или вена) для оценки РНК, транспортируемых внеклеточными везикулами, не влияет на конечный результат [88]. Количественные изменения содержания экзосом и экспрессии микроРНК-155 также наблюдаются и в моче пациентов с симптомным атеросклеротическим поражением коронарных артерий, что подтверждает межсистемность экзосомального транспорта [89].

Исследование микроРНК внеклеточных везикул крови также может быть использовано для дифференциальной диагностики инсультов. Так, достоверные различия в экспрессии 25 видов микроРНК были установлены у пациентов с геморрагическим и ишемическим инсультами [90].

Изучение применения экзосом в терапии сердечно-сосудистых заболеваний сфокусировано в настоящее время на их цитопротективном и проангиогенном действии, а также разработке способов доставки экзосом в целевую область и модификации их РНК-содержимого. При системном введении экзосом терапевтический эффект достигается в случае многократного повторения процедур. Так, у крыс с индуцированным миокардиальным фиброзом внутривенное введение экзосом, содержащих микроРНК-146a-5p, на 5, 11 и 19 день терапии значительно увеличивало фракцию выброса левого желудочка [91]. Разрабатываются платформы для пролонгированного высвобождения экзосом непосредственно в области применения. Например, введение пептидного гидрогеля, содержащего экзосомы мезенхимальных стволовых клеток, в краевую зону острого инфаркта миокарда крысы снижало воспалительную реакцию и уменьшало апоптоз кардиомиоцитов, а в долгосрочной перспективе стимулировало неоангиогенез и улучшало систолическую функцию левого желудочка [92]. Кроме того, использование экзосом, экспрессируемых стволовыми клетками, вместо собственно стволовых клеток, является альтернативой клеточным технологиям, имеющим побочные действия, например тератогенный эффект или аутоиммунные реакции. Исследуется комбинированная терапия острого инфаркта миокарда с помощью мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и их экзосом [93], а также способы модификации цитоплазматической мембраны экзосом стволовых клеток кардиосфер для усиления их захвата кардиомиоцитами [94]. Перспективным направлением является разработка методов селективной загрузки в экзосомы активного содержимого. Так, трансфекция микроРНК-21 в экзосомы человека и последующее их введение мышам, перенесшим инфаркт миокарда, приводило к значительному угнетению экспрессии фосфатазы PTEN в кардиомиоцитах, эндотелиоцитах и сосудистых гладкомышечных клетках и в дальнейшем модулировало кардиальный фиброз [95].

Заключение

Таким образом, дальнейшее изучение специфики межклеточной и межорганной коммуникации, опосредуемой экзосомами, является перспектив-

ным в части разработки современных методов диагностики и лечения патологий сердечно-сосудистой системы. Однако в настоящее время применение экзосом ограничено рядом нерешенных задач. Одним из вопросов является идентификация клеточного происхождения экзосом и стандартизация протоколов их выделения из биологических жидкостей в условиях клинических лабораторий. Так, дальнейшая разработка методов экспресс-идентификации циркулирующих в крови кардиомиоцит-специфичных экзосом позволит использовать их в качестве биомаркеров для диагностики острого инфаркта миокарда. Это, несомненно, ускорит постановку диагноза и расширит терапевтическое окно оказания помощи пациентам с острым коронарным синдромом.

Стабильность экзосом в кровеносном русле и межклеточном пространстве, низкая иммуногенность, а также их возможность транспортировать активное содержимое в таргетные клетки имеет большой потенциал для создания новых лекарственных форм в терапии сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, защиты миокарда от оксидативного стресса при реперфузионном повреждении, стимуляции неоангиогенеза в ишемизированных тканях. Однако вопрос целевой направленности экзосом и их таргетная активность требует дополнительного изучения. Также не разработана продукция пула узконаправленных экзосом вне организма. Решение данной задачи позволит использовать экзосомы для доставки лекарственных препаратов непосредственно к клеткам-мишеням.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Biemmi V, Milano G, Ciullo A, et al. Inflammatory extracellular vesicles prompt heart dysfunction via TLR4-dependent NF- κ B activation. *Theranostics*. 2020; 10 (6): 2773–2790.
2. Cheng M, Yang J, Zhao X, et al. Circulating myocardial microRNAs from infarcted hearts are carried in exosomes and mobilise bone marrow progenitor cells. *Nat Commun*. 2019; 10 (1): 959.
3. Liang C, Zhang L, Lian X, et al. Circulating exosomal SOCS2-AS1 acts as a novel biomarker in predicting the diagnosis of coronary artery disease. *Biomed Res Int*. 2020: 9182091.
4. Su X, Jin Y, Shen Y, et al. Exosome-derived dystrophin from allograft myogenic progenitors improve cardiac function in Duchenne muscular dystrophic mice. *J Cardiovasc Transl Res*. 2018; 11 (5): 412–419.

5. Yang VK, Loughran KA, Meola DM, et al. Circulating exosome microRNA associated with heart failure secondary to myxomatous mitral valve disease in a naturally occurring canine model. *J Extracell Vesicles*. 2017; 6 (1): 1350088.
6. Sharma M, Liu W, Perincheri S, et al. Exosomes expressing the self-antigens myosin and vimentin play an important role in syngeneic cardiac transplant rejection induced by antibodies to cardiac myosin. *Am J Transplant*. 2018; 18 (7): 1626–1635.
7. Yang C, Sun S, Zhang Q, et al. Exosomes of antler mesenchymal stem cells improve postoperative cognitive dysfunction in cardiopulmonary bypass rats through inhibiting the TLR2/TLR4 signaling pathway. *Stem Cells Int*. 2020: 2134565.
8. Kraemer S, Beckers C, Stoppe C, et al. Exosomes in cardiac preconditioning with isoflurane and hypoxia. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2015; 63: ePP23.
9. Trams EG, Lauter CJ, Salem Jr N, et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1981; 645 (1): 63–70.
10. Pan BT, Teng K, Wu C, et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*. 1985; 101 (3): 942–948.
11. Van der Pol E, Böing AN, Harrison P, et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*. 2012; 64 (3): 676–705.
12. Ibrahim A, Marban E. Exosomes: fundamental biology and roles in cardiovascular physiology. *Annu Rev Physiol*. 2016; 78: 67–83.
13. Mentkowski KI, Snitzer JD, Rusnak S, et al. Therapeutic potential of engineered extracellular vesicles. *AAPS J*. 2018; 20 (3): 50.
14. Jan AT, Rahman S, Khan S, et al. Biology, pathophysiological role, and clinical implications of exosomes: a critical appraisal. *Cells*. 2019; 8 (2): 99.
15. Ottaviani L, Juni RP, Halkein J, et al. Cardiomyocyte-derived exosomes mediate pathological cardiac microvascular remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2018; 120: 45.
16. Davidson SM, Riquelme JA, Zheng Y, et al. Endothelial cells release cardioprotective exosomes that may contribute to ischaemic preconditioning. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 15885.
17. Heo J, Yang HC, Rhee WJ, et al. Vascular smooth muscle cell-derived exosomal microRNAs regulate endothelial cell migration under PDGF stimulation. *Cells*. 2020; 9 (3): 639.
18. Yuan X, Wu Q, Wang P, et al. Exosomes derived from pericytes improve microcirculation and protect blood–spinal cord barrier after spinal cord injury in mice. *Front Neurosci*. 2019; 13: 319.
19. Han K-Y, Chang J-H, Azar DT. MMP14-containing exosomes cleave VEGFR1 and promote VEGFA-induced migration and proliferation of vascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019; 60 (6): 2321–2329.
20. Genschmer KR, Russell DW, Lal C, et al. Activated PMN exosomes: pathogenic entities causing matrix destruction and disease in the lung. *Cell*. 2019; 176 (1–2): 113–126.
21. Ma J, Zhao Y, Sun L, et al. Exosomes derived from AKT-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells improve cardiac regeneration and promote angiogenesis via activating platelet-derived growth factor D. *Stem Cells Transl Med*. 2017; 6 (1): 51–59.
22. Zhu J, Lu K, Zhang N, et al. Myocardial reparative functions of exosomes from mesenchymal stem cells are enhanced by hypoxia treatment of the cells via transferring microRNA-210 in an nSMase2-dependent way. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018; 46 (8): 1659–1670.
23. Maring JA, Lodder K, Mol E, et al. Cardiac progenitor cell-derived extracellular vesicles reduce infarct size and associate with increased cardiovascular cell proliferation. *J Cardiovasc Transl Res*. 2019; 12 (1): 5–17.
24. Li S, Jiang J, Yang Z, et al. Cardiac progenitor cell-derived exosomes promote H9C2 cell growth via Akt/mTOR activation. *Int J Mol Med*. 2018; 42 (3): 1517–1525.
25. Saha P, Sharma S, Korutla L, et al. Circulating exosomes derived from transplanted progenitor cells aid the functional recovery of ischemic myocardium. *Sci Transl Med*. 2019; 11 (493): eaau1168.
26. Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes: current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res*. 2017; 66: 30–41.
27. Subra C, Grand D, Laulagnier K, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res*. 2010; 51 (8): 2105–2120.
28. Koga Y, Yasunaga M, Moriya Y, et al. Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. *J Gastrointest Oncol*. 2011; 2 (4): 215–222.
29. Xu M-Y, Ye Z-S, Song X-T, et al. Differences in the cargos and functions of exosomes derived from six cardiac cell types: a systematic review. *Stem Cell Res Ther*. 2019; 10 (1): 194.
30. Li Y, Yu S, Li L, et al. KLF4-mediated upregulation of CD9 and CD81 suppresses hepatocellular carcinoma development via JNK signaling. *Cell Death Dis*. 2020; 11 (4): 299.
31. Wang X, Gu H, Huang W, et al. Hsp20-mediated activation of exosome biogenesis in cardiomyocytes improves cardiac function and angiogenesis in diabetic mice. *Diabetes*. 2016; 65 (10): 3111–3128.
32. Atay S, Wilkey DW, Milhem M, et al. Insights into the proteome of gastrointestinal stromal tumors-derived exosomes reveals new potential diagnostic biomarkers. *Mol Cell Proteomics*. 2018; 17 (3): 495–515.
33. Diaz-Varela M, de Menezes-Neto A, Perez-Zsolt D, et al. Proteomics study of human cord blood reticulocyte-derived exosomes. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 14046.
34. Miksa M, Wu R, Dong W, et al. Immature dendritic cell-derived exosomes rescue septic animals via milk fat globule epidermal growth factor-factor VIII. *J Immunol*. 2009; 183 (9): 5983–5990.
35. Batagov AO, Kurochkin IV. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biol Direct*. 2013; 8: 12.
36. Manterola L, Guruceaga E, Gallego Perez-Larraya J, et al. A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. *Neuro Oncol*. 2014; 16 (4): 520–527.
37. Pérez-Boza J, Lion M, Struman I. Exploring the RNA landscape of endothelial exosomes. *RNA*. 2018; 24 (3): 423–435.
38. Kondratov K, Nikitin Y, Fedorov A, et al. Heterogeneity of the nucleic acid repertoire of plasma

- extracellular vesicles demonstrated using high-sensitivity fluorescence-activated sorting. *J Extracell Vesicles*. 2020; 9 (1): 1743139.
39. Mensa E, Guescini M, Giuliani A, et al. Small extracellular vesicles deliver miR-21 and miR-217 as pro-senescence effectors to endothelial cells. *J Extracell Vesic*. 2020; 9 (1): 1725285.
40. Meijer HA, Smith EM, Bushell M. Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans*. 2014; 42 (2): 1135–1140.
41. Dai W, Su L, Lu H, et al. Exosomes-mediated synthetic Dicer substrates delivery for intracellular Dicer imaging detection. *Biosens Bioelectron*. 2020; 151: 111907.
42. Janas T, Janas T. The selection of aptamers specific for membrane targets. *Cell Mol Biol Lett*. 2011; 16 (1): 25–39.
43. Koyano K, Bahn JH, Xiao X. Extracellular microRNA 3' end modification across diverse body fluids. *bioRxiv*. March 25, 2020.
44. Janas AM, Sapoń K, Janas T, et al. Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1858 (6): 1139–1151.
45. Bebelman MP, Bun P, Huveneers S, et al. Real-time imaging of multivesicular body–plasma membrane fusion to quantify exosome release from single cells. *Nat Protoc*. 2020; 15 (1): 102–121.
46. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011; 2: 282.
47. Hoshino D, Kirkbride KC, Costello K, et al. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Rep*. 2013; 5 (5): 1159–1168.
48. Hyenne V, Apaydin A, Rodriguez D, et al. RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *J Cell Biol*. 2015; 211 (1): 27–37.
49. Wollert T, Hurler JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*. 2010; 464 (7290): 864–869.
50. Basma H, Johanson AN, Dhar K, et al. TGF- β induces a heart failure phenotype via fibroblasts exosome signaling. *Heliyon*. 2019; 5 (10): e02633.
51. Ortega FG, Roefs MT, de Miguel Perez D, et al. Interfering with endolysosomal trafficking enhances release of bioactive exosomes. *Nanomedicine*. 2019; 20: 102014.
52. Wang L, Zhang J. Exosomal lncRNA AK139128 derived from hypoxic cardiomyocytes promotes apoptosis and inhibits cell proliferation in cardiac fibroblasts. *Int J Nanomed*. 2020; 15: 3363–3376.
53. Tian C, Gao L, Zimmerman MC, et al. Myocardial infarction-induced microRNA-enriched exosomes contribute to cardiac Nrf2 dysregulation in chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018; 314 (5): H928–H939.
54. Działo E, Rudnik M, Koning RI, et al. WNT3a and WNT5a transported by exosomes activate WNT signaling pathways in human cardiac fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (6): 1436.
55. Ju C, Shen Y, Ma G, et al. Transplantation of cardiac mesenchymal stem cell-derived exosomes promotes repair in ischemic myocardium. *J Cardiovasc Transl Res*. 2018; 11 (5): 420–428.
56. Cheng Y, Wang X, Yang J, et al. A translational study of urine miRNAs in acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2012; 53 (5): 668–676.
57. Cheow ESH, Cheng WC, Lee CN, et al. Plasma-derived extracellular vesicles contain predictive biomarkers and potential therapeutic targets for myocardial ischemic (MI) injury. *Mol Cell Proteomics*. 2016; 15 (8): 2628–2640.
58. Beltrami C, Besnier M, Shantikumar S, et al. Human pericardial fluid contains exosomes enriched with cardiovascular-expressed microRNAs and promotes therapeutic angiogenesis. *Mol Ther*. 2017; 25 (3): 679–693.
59. Minghua W, Zhijian G, Chahua H, et al. Plasma exosomes induced by remote ischaemic preconditioning attenuate myocardial ischaemia/reperfusion injury by transferring miR-24. *Cell Death Dis*. 2018; 9 (3): 320.
60. Lin Y, Zhang C, Xiang P, et al. Exosomes derived from HeLa cells break down vascular integrity by triggering endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. *J Extracell Ves*. 2020; 9 (1): 1722385.
61. Chen Q, Huang M, Wu J, et al. Exosomes isolated from the plasma of remote ischemic conditioning rats improved cardiac function and angiogenesis after myocardial infarction through targeting Hsp70. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12 (4): 3682–3693.
62. Li H, Liao Y, Gao L, et al. Coronary serum exosomes derived from patients with myocardial ischemia regulate angiogenesis through the miR-939-mediated nitric oxide signaling pathway. *Theranostics*. 2018; 8 (8): 2079–2093.
63. Vicencio JM, Yellon DM, Sivaraman V, et al. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015; 65 (15): 1525–1536.
64. Cheng H, Chang S, Xu R, et al. Hypoxia-challenged MSC-derived exosomes deliver miR-210 to attenuate post-infarction cardiac apoptosis. *Stem Cell Res Ther*. 2020; 11 (1): 224.
65. He J-G, Li H-R, Han J-X, et al. GATA-4-expressing mouse bone marrow mesenchymal stem cells improve cardiac function after myocardial infarction via secreted exosomes. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 9047.
66. Khan M, Nickoloff E, Abramova T, et al. Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circ Res*. 2015; 117 (1): 52–64.
67. Zhang Z, Yang J, Yan W, et al. Pretreatment of cardiac stem cells with exosomes derived from mesenchymal stem cells enhances myocardial repair. *J Am Heart Assoc*. 2016; 5 (1): e002856.
68. Wang Y, Zhao R, Liu D, et al. Exosomes derived from miR-214-enriched bone marrow-derived mesenchymal stem cells regulate oxidative damage in cardiac stem cells by targeting CaMKII. *Oxid Med Cell Longev*. 2018: 4971261.
69. Weber A, Cardone L, Liu SS, et al. Evaluating of circulating exosomes to predict emerging valve prosthesis-patient mismatches after surgical aortic valve replacement. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2018; 66 (S 01): S1–S110.
70. Weber A, Liu SS, Cardone L, et al. The course of circulating small extracellular vesicles in patients undergoing surgical aortic valve replacement. *Biomed Res Int*. 2020: 6381396.
71. Barile L, Lionetti V, Cervio E, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after

myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2014; 103 (4): 530–541.

72. Chen Y-T, Wang J, Wee ASY, et al. Differential microRNA expression profile in myxomatous mitral valve prolapse and fibroelastic deficiency valves. *Int J Mol Sci.* 2016; 17 (5): 753.

73. Leitolis A, Suss PH, Roderjan JG, et al. Human heart explant-derived extracellular vesicles: characterization and effects on the in vitro recellularization of decellularized heart valves. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (6): 1279.

74. van Amerongen MJ, Engel FB. Features of cardiomyocyte proliferation and its potential for cardiac regeneration. *J Cell Mol Med.* 2008; 12 (6A): 2233–2244.

75. LaFramboise WA, Scalise D, Stoodley P, et al. Cardiac fibroblasts influence cardiomyocyte phenotype in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292 (5): C1799–C1808.

76. Bang C, Batkai S, Dangwal S, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest.* 2014; 124 (5): 2136–2146.

77. Queirós AM, Eschen C, Fliegner D, et al. Sex- and estrogen-dependent regulation of a miRNA network in the healthy and hypertrophied heart. *Int J Cardiol.* 2013; 169 (5): 331–338.

78. Yang J, Yu X, Xue F, et al. Exosomes derived from cardiomyocytes promote cardiac fibrosis via myocyte-fibroblast cross-talk. *Am J Transl Res.* 2018; 10 (12): 4350–4366.

79. Clive Landis R, Brown JR, Fitzgerald D, et al. Attenuating the systemic inflammatory response to adult cardiopulmonary bypass: a critical review of the evidence base. *J Extra Corpor Technol.* 2014; 46 (3): 197–211.

80. Dekker NAM, van Leeuwen ALI, van Strien WWJ, et al. Microcirculatory perfusion disturbances following cardiac surgery with cardiopulmonary bypass are associated with in vitro endothelial hyperpermeability and increased angiopoietin-2 levels. *Crit Care.* 2019; 23 (1): 117.

81. Fujii Y. Evaluation of inflammation caused by cardiopulmonary bypass in a small animal model. *Biology (Basel).* 2020; 9 (4): 81.

82. Poon K-S, Palanisamy K, Chang S-S, et al. Plasma exosomal miR-223 expression regulates inflammatory responses during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 10807.

83. Emanuelli C, Shearn AIU, Laftah A, et al. Coronary artery-bypass-graft surgery increases the plasma concentration of exosomes carrying a cargo of cardiac microRNAs: an example of exosome trafficking out of the human heart with potential for cardiac biomarker discovery. *PLoS One.* 2016; 11 (4): e0154274.

84. Baysa A, Fedorov A, Kondratov K, et al. Release of mitochondrial and nuclear DNA during on-pump heart surgery: kinetics and relation to extracellular vesicles. *J Cardiovasc Transl Res.* 2019; 12 (3): 184–192.

85. Wang M, Su P, Liu Y, et al. Abnormal expression of circRNA_089763 in the plasma exosomes of patients with post-operative cognitive dysfunction after coronary artery bypass grafting. *Mol Med Rep.* 2019; 20 (3): 2549–2562.

86. Gasecka A, van der Pol E, Coumans F, et al. Identification of extracellular vesicles as biomarkers for myocardial infarction by flow cytometry and automated data processing. *J Extracell Vesicles.* 2019; 8 (1): 1593587.

87. Kuwabara Y, Ono K, Horie T, et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of

patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011; 4 (4): 446–454.

88. Hermann S, Buschmann D, Kirchner B, et al. Transcriptomic profiling of cell-free and vesicular microRNAs from matched arterial and venous sera. *J Extracell Vesicles.* 2019; 8 (1): 1670935.

89. Fitzsimons S, Oggerob S, Mahon N, et al. Urinary extracellular vesicle concentration, microRNA-155 expression and inflammatory surface marker expression are altered in patients with symptomatic coronary artery disease. *J Extracell Vesicles.* 2019; 8 (1): 1593587.

90. Kalani MYS, Alsop E, Meechoovet B, et al. Extracellular microRNAs in blood differentiate between ischaemic and haemorrhagic stroke subtypes. *J Extracell Vesicles.* 2020; 9 (1): 1713540.

91. Milano G, Biemmi V, Lazzarini E et al. Intravenous administration of cardiac progenitor cell-derived exosomes protects against doxorubicin/trastuzumab-induced cardiac toxicity. *Cardiovasc Res.* 2020; 116 (2): 383–392.

92. Han C, Zhou J, Liang C, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell derived exosomes encapsulated in functional peptide hydrogels promote cardiac repair. *Biomater Sci.* 2019; 7 (7): 2920–2933.

93. Huang P, Wang L, Li Q, et al. Combinatorial treatment of acute myocardial infarction using stem cells and their derived exosomes resulted in improved heart performance. *Stem Cell Res Ther.* 2019; 10 (1): 300.

94. Mentkowski KI, Lang JK. Exosomes engineered to express a cardiomyocyte binding peptide demonstrate improved cardiac retention in vivo. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 10041.

95. Kang J-Y, Park H, Kim H, et al. Human peripheral blood-derived exosomes for microRNA delivery. *Int J Mol Med.* 2019; 43 (6): 2319–2328.

Информация об авторах:

Щава Сергей Петрович, к.м.н., сердечно-сосудистый хирург Центра кардиохирургии и сосудистой хирургии Медицинского центра ФГАОУ ВО ДВФУ; научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России;

Степанов Евгений Викторович, врач рентгенэндоваскулярных методов диагностики и лечения Центра кардиохирургии и сосудистой хирургии Медицинского центра ФГАОУ ВО ДВФУ;

Сорокин Виталий Александрович, д.м.н., заведующий Центром кардиохирургии и сосудистой хирургии Медицинского центра ФГАОУ ВО ДВФУ; профессор Института хирургии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России.

Author information:

Schava Sergey P., PhD, Cardiovascular Surgeon, Cardiac and Vascular Surgery Department, Far Eastern Federal University Medical Center; Researcher at the Central Research Laboratory Pacific State Medical University;

Stepanov Evgeny V., Interventional Cardiologist, Cardiac and Vascular Surgery Department, Far Eastern Federal University Medical Center;

Sorokin Vitaly A., PhD, MD, Head of Cardiac and Vascular Surgery Department, Far Eastern Federal University Medical Center; Professor of Institute of Surgery, Pacific State Medical University.

НОВЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ ИШЕМИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ МОЗГА

Алексеева Т. М.¹, Топузова М. П.¹, Чайковская А. Д.¹,
Панина Е. Б.¹, Вавилова Т. В.¹, Поспелова М. Л.¹,
Васильева Е. Ю.¹, Симаков К. В.¹, Сергеева Т. В.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия
²Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение
здравоохранения «Городская больница Святой преподобномученицы
Елизаветы», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Топузова Мария Петровна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: topuzova_mp@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 15.09.2020
и принята к печати 12.10.2020.

Резюме

Актуальность. Для определения оптимального подхода к ведению пациентов в остром периоде инсульта продолжается поиск биомаркеров, которые смогут повысить ценность уже существующих методов диагностики. **Цель исследования:** уточнить значение уровней нейрон-специфической енолазы (НСЕ), глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ), NR2-антител в сыворотке крови (СК) у пациентов в остром периоде ишемического инсульта (ИИ) в динамике, определить их взаимосвязь с тяжестью неврологических нарушений и краткосрочным исходом. **Материалы и методы.** Обследовано 40 пациентов в остром периоде ИИ, средний возраст $72,6 \pm 1,9$ лет. Уровни биомаркеров определяли в СК в первые 72 часа ИИ и на 10–14 день. **Результаты.** Концентрация НСЕ и ГФКБ у больных с ИИ в первые 72 часа превышала референсные значения и значительно уменьшалась к 10–14 дню ($34,9 \pm 5,9 \rightarrow 17,7 \pm 1,1$; $p = 0,007$ и $0,4 \pm 0,1 \rightarrow 0,2 \pm 0,005$; $p = 0,22$ соответственно). Уровень NR2-антител референсных значений не превысил ($1,01 \pm 0,3$), а в динамике к 10–14 дню было отмечено нарастание показателя ($1,1 \pm 0,3$), $p = 0,007$. У пациентов, имевших более тяжелую симптоматику, концентрация НСЕ, ГФКБ и NR2-антител к 10–14 дню была выше. Пациенты, имевшие неблагоприятный краткосрочный исход, к 10–14 дню имели более высокий уровень НСЕ, ГФКБ и NR2-антител. **Заключение.** Исследованные вещества могут быть использованы в качестве биомаркеров при ИИ для контроля степени повреждения мозговой ткани, мониторинга усугубления патологического процесса, а также с прогностической целью.

Ключевые слова: биомаркеры инсульта, глиальный фибриллярный кислый белок, инсульт, ишемический инсульт, краткосрочный исход, нейрон-специфическая енолаза, прогноз NR2-антитела, N-метил-D-аспаратат рецепторы.

Для цитирования: Алексеева Т.М., Топузова М.П., Чайковская А.Д. и др. Новые диагностические и прогностические биомаркеры ишемических поражений мозга. Трансляционная медицина. 2020; 7 (5): 29-42. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-29-42

NEW DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC BIOMARKERS OF THE ISCHEMIC BRAIN DAMAGE

Alekseeva T. M.¹, Topuzova M. P.¹, Chaykovskaya A. D.¹,
Panina E. B.¹, Vavilova T. V.¹, Pospelova M. L.¹, Vasilieva E. Yu.¹,
Simakov K.V.¹, Sergeeva T. V.²

¹Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

²Holy Martyr Elizabeth City Hospital, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Topuzova Mariya P.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: topuzova_mp@almazovcentre.ru

Received 15 September 2020; accepted
12 October 2020.

Abstract

Background. To determine the optimal approach to managing patients in the acute period of stroke, the search for biomarkers that can increase value of existing diagnostic methods continues. **Objective:** to clarify the significance of the levels of neuron-specific enolase (NSE), glial fibrillar acid protein (GFAP), NR2-antibodies in the blood serum (BS) of patients in the acute period of ischemic stroke (IS) in dynamics, determine their relationship with the severity of neurological disturbances and short-term outcome. **Design and methods.** 40 patients were examined in the acute period of IS, mean age 72.6 ± 1.9 years. The levels of biomarkers were determined in the BS in the first 72 hours of IS and on days 10–14. **Results.** The concentration of NSE and GFAP in patients with IS in the first 72 hours exceeded the reference values and significantly decreased by 10–14 days ($34.9 \pm 5.9 \rightarrow 17.7 \pm 1.1$; $p = 0.007$ and $0.4 \pm 0.1 \rightarrow 0.2 \pm 0.005$, $p = 0.22$ respectively). The level of NR2 antibodies did not exceed of the reference values (1.01 ± 0.3), and in dynamics, by 10–14 days, an increase in the indicator was noted (1.1 ± 0.3), $p = 0.007$. In patients with more severe symptoms, the concentration of NSE, GFAP and NR2 antibodies was higher by 10–14 days. Patients who had an unfavorable short-term outcome by 10–14 days had a higher level of NSE, GFAP and NR2 antibodies. **Conclusion.** The investigated substances can be used as biomarkers in IS to control the degree of damage to the brain tissue, monitor the worsening of the pathological process, as well as for prognostic purposes.

Keywords: stroke, stroke biomarker, neuron-specific enolase, glial fibrillary acidic protein, NR2-antibodies, N-methyl-D-aspartate receptors, short-term outcome, prognosis.

For citation: Alekseeva TM, Topuzova MP, Chaykovskaya AD, et al. New diagnostic and prognostic biomarkers of the ischemic brain damage. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020; 7 (5): 29-42. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-29-42

Список сокращений: NMDA-рецепторы — N-метил-D-аспартат рецепторы, ВББ — вертебрально-базиллярный бассейн, ГФКБ — глиальный фибриллярный кислый белок, ГЭБ — гематоэнцефалический барьер, ИИ — ишемический инсульт, КБ — каротидный бассейн, НСЕ — нейрон-специфическая енолаза, СК — сыворотка крови, ТИА — транзиторная ишемическая атака, ЦНС — центральная нервная система, ЦСЖ — цереброспинальная жидкость.

Введение

В современном мире инсульт является ведущей причиной тяжелой инвалидизации [1], а поиск новых возможностей, способных улучшить диагностику, особенно в первые часы от начала симптомов, является чрезвычайно актуальным направлением, поскольку играет ведущую роль в выборе дифференцированной терапии в острейшем периоде [2]. С этой целью при инсульте изучаются несколько категорий биомаркеров — физические и клинические

маркеры, маркеры визуализации, электрофизиологические, гистологические, генетические, биохимические и нейрональные маркеры [3].

По-прежнему в клинической практике нередки случаи, когда результаты нейровизуализации при наличии инсульта не отражают свежих очагов в головном мозге или являются двусмысленными [3], а клиническая картина может быть неявной, особенно при ишемическом инсульте (ИИ). В этих условиях может быть перспективным использование биохимических маркеров — веществ, которые можно измерить в биологических жидкостях организма, а определение их концентрации способно отражать стадии заболевания, при которых они исследуются [4]. Диагностическая перспектива состоит в том, чтобы определить, каким образом эти маркеры могут повысить ценность существующих и регулярно используемых данных. Эти вещества, высвобождающиеся в периферическую кровь и цереброспинальную жидкость (ЦСЖ) во время церебрального повреждения, могут являться индикаторами динамики процесса, происходящего в мозге, и могут не только помочь в идентификации и дифференциальной диагностике инсульта, но и быть полезными для установления стадии и объема ишемического поражения. Например, они могут быть использованы в качестве маркеров некроза мозгового вещества и потенциально жизнеспособной ткани, соответствующей полутени. Определение уровня этих биомаркеров у пациентов с ИИ может быть важно для прогнозирования исходов заболевания, в том числе на фоне применяемой терапии (например, увеличение объема поражения, мониторинг терапевтического ответа и возможных побочных эффектов, связанных с лечением) [3, 5]. Ухудшение состояния пациентов с инсультом в первые часы после появления симптомов является частым явлением, что, несомненно, требует поиска новых возможностей улучшения их раннего выявления.

В последние годы проводится большое количество исследований по поиску биомаркеров, которые могли бы быть использованы в остром периоде инсульта. Однако данная проблема все еще остается на стадии исследований, и до сих пор не найдены вещества, которые можно было бы использовать в качестве быстро определяемых, доступных и информативных биомаркеров в клинической практике.

Поиск биомаркеров инсульта сталкивается с определенными трудностями. Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) замедляет высвобождение глиальных и нейрональных белков мозговой ткани в кровь и ЦСЖ после инсульта. Нарушение ГЭБ при ИИ является двухфазным явлением и зависит от реперфузии, возникающей после повреждения.

В течение первых 24 часов повышается проницаемость ГЭБ в результате внеклеточной ферментативной активации, и дальнейшее более значительное повреждение происходит через 48–72 часа после развития инфаркта [4]. Многие потенциальные маркеры церебральной ишемии обнаруживаются и при других состояниях, которые протекают с повреждением мозговой ткани. Кроме того, объем поврежденной ткани может не соответствовать клиническим проявлениям, так, например, маленький очаг повреждения в «стратегически» важной области мозга может привести к более инвалидизирующему дефициту, чем большой очаг в другой части мозга [6]. Поэтому поиск биомаркера, который сможет отражать объем повреждения мозговой ткани, весьма интересен для дальнейших исследований в этой области. Также с целью предотвращения инвалидизации и проведения адекватных реабилитационных мероприятий необходимо использовать инструменты, прогнозирующие исход в постинсультном состоянии. Известно, что своевременное прогнозирование исхода инсульта позволяет при назначении корректного лечения избежать летального исхода и уменьшить неврологический дефицит.

Проанализировав источники литературы, мы выбрали белки, представляющие значительный интерес для дальнейшего изучения в качестве биомаркеров ИИ — нейрон-специфическая енолаза (НСЕ) [7], глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) [8] и NR2-антитела [9]. В результате проведенного анализа стало ясно, что уровни данных биомаркеров позволяют определить степень повреждения ткани мозга, что можно также использовать для оценки течения заболевания в динамике, контроля ухудшения патологических процессов в мозге, в том числе связанных с увеличением размера очага. Это может способствовать раннему предотвращению осложнений и определению персонализированных подходов к терапии. Ценной видится возможность использования этих биомаркеров для мониторинга эффективности проводимой терапии и определения прогноза восстановления неврологических функций.

Нейрон-специфическая енолаза

НСЕ — это димерный изофермент гликолитического фермента енолазы, локализующегося преимущественно в нейронах и клетках нейроэндокринного происхождения [3]. В нормальном состоянии организма НСЕ обнаруживается лишь в незначительном количестве в периферической крови [плазме или сыворотке крови (СК)] и ЦСЖ [2, 3]. В СК концентрация НСЕ составляет $8,7 \pm 3,9$

нг/мл (женщины $8,3 \pm 4,0$; мужчины $8,9 \pm 3,9$), причем не выявляется какой-либо зависимости друг от друга уровней НСЕ в СК и ЦСЖ, а также от возраста и пола [10].

В процессе повреждения нейронов при различных патологических процессах, в том числе и при инсульте, НСЕ высвобождается в кровоток [11].

Глиальный фибриллярный кислый белок

ГФКБ представляет собой мономерный белок промежуточной нити астроглиального скелета, присутствующий в астроцитах и в меньшей степени в эпендимальных клетках головного мозга, где он функционирует как часть цитоскелета. ГФКБ обнаруживается в белом и сером веществе центральной нервной системы (ЦНС) и считается мозгоспецифичным [12, 13]. Существует гетерогенность экспрессии ГФКБ в астроцитах, она выше в белом веществе по сравнению с астроцитами серого вещества [14]. В физиологических условиях ГФКБ практически не обнаруживается ни в крови, ни в ЦСЖ [13], тогда как при повреждении ткани мозга ГФКБ быстро высвобождается в кровь, и в ЦСЖ [14]. Таким образом, повышение концентрации ГФКБ в крови и в ЦСЖ может свидетельствовать о нарушении целостности ГЭБ, а также является показателем гибели нейрональных клеток. Динамическое определение концентрации данного белка может быть использовано для определения степени повреждения ткани мозга.

NR2-антитела при инсульте

Известно, что церебральная ишемия приводит к каскаду молекулярных событий, которые запускаются вследствие снижения мозгового кровотока и последующей энергетической недостаточности. Эта энергетическая недостаточность приводит к метаболическим нарушениям с изменениями уровня кислорода, метаболизма глюкозы и истощением энергетических запасов, что в свою очередь вызывает высвобождение глутамата [15].

Высвобождение глутамата происходит, когда кровоснабжение нейронов уменьшается ниже порогового уровня (ниже 20 мл / 100 г / мин) [16]. Следует отметить, что некроз нейронов возникает при кровотоке 17 мл / 100 г / мин, поддерживаемом в течение 180 минут и более [17]. Гибель нейронов в клеточной культуре происходит при концентрации глутамата выше 10 мкмоль [18]. Длительная и чрезмерная стимуляция глутаматергических рецепторов происходит, когда внеклеточный глутамат приближается к 100 мкмоль [19].

Это состояние обозначается как эксайтотоксичность — длительная и чрезмерная (токсическая)

стимуляция глутаматных рецепторов [20]. Когда запасы клеточной энергии падают, повышенное высвобождение и нарушение поглощения глутамата опосредуют токсическое накопление внеклеточного глутамата, что приводит к чрезмерной стимуляции рецепторов глутамата и, как следствие, к гибели нейронов [21]. Глутамат-опосредованная эксайтотоксичность является основным механизмом, который запускается при многих видах острых и хронических патологических процессов в мозге [22, 23].

N-метил-D-аспартат рецепторы (NMDA-рецепторы) являются основными рецепторами в ЦНС, которые контролируют синаптическую пластичность [24].

Существует несколько типов глутаматных рецепторов, и все они активируются глутаматом [25]. В эксперименте церебральной ишемии было выявлено повышение экспрессии субъединицы NR2 [26].

При возникновении условий недостаточности кровоснабжения мозга активируется каскад нейротоксичности, приводящей к повреждению ГЭБ, потеря целостности которого приводит к повреждению нейронов и глии. Кроме того, активированные тромбином сериновые протеазы вызывают расщепление синаптических NMDA-рецепторов [27], в результате повышенные концентрации пептидов могут попасть в кровоток. Аномально высокие концентрации этих пептидных фрагментов, которые действуют как чужеродные антигены после выхода из мозга, инициируют иммунный ответ и выработку аутоантител [28]. Было установлено, что концентрация NR2-антител в СК здоровых добровольцев составляет в среднем 0,33 нг/мл (0,02–1,15 нг/мл) [29].

Цель исследования: уточнить значение уровней НСЕ, ГФКБ и NR2-антител в СК у пациентов в остром периоде ИИ в динамике, определить их взаимосвязь с тяжестью неврологических нарушений и краткосрочным исходом.

Материалы и методы

Исследование проведено кафедрой неврологии и психиатрии и неврологическим отделением № 2 для лечения больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения НМИЦ им. В. А. Алмазова (Санкт-Петербург, Россия) в сотрудничестве с региональным сосудистым центром СПб ГБУЗ «Елизаветинская больница» в период с марта по декабрь 2019 года. Информированное согласие было получено от пациентов или ближайших родственников до включения в исследование.

Обследовано 40 пациентов в остром периоде ИИ (26 женщин и 14 мужчин), диагноз «инсульт»

был установлен клинически и подтвержден нейровизуализационно с помощью компьютерной или магнитно-резонансной томографии, средний возраст составил $72,6 \pm 1,9$ лет.

Пациенты с транзиторной ишемической атакой (ТИА), геморрагическим инсультом, инфарктом миокарда, клинически значимой дисфункцией почек и печени, опухолями мозга, недавней травмой головы были исключены из исследования.

Образцы крови для определения уровней НСЕ, ГФКБ и NR2-антител были забраны в первые 72 часа от начала симптомов ИИ (точка 1) и на 10–14 день заболевания (точка 2). СК отделяли центрифугированием, хранили при -80°C . Уровни НСЕ, ГФКБ и NR2-антител определяли на автоматическом электрохемилюминесцентном анализаторе Cobas e 411 (Roche Diagnostics GmbH, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителя, референсные значения считали для НСЕ $< 16,30$ нг/мл, для ГФКБ $< 0,25$ нг/мл, для NR2-антител $\leq 2,0$ нг/мл. Общая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Тяжесть неврологических нарушений оценивали по шкале инсульта Национального института здоровья (NIHSS), краткосрочный результат оце-

нивали по модифицированной шкале Rankin (mRS) и индексу повседневной активности и независимости жизнедеятельности Barthel при поступлении (первые 72 часа) и в динамике (на 10–14 день). Подтипы ИИ определяли согласно классификации, основанной на этиологии Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) [30].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA 10.0. При сравнении двух групп применяли непараметрические критерии Манна–Уитни и Вилкоксона. Для установления зависимости между признаками использовали корреляционный анализ Спирмена. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ ошибка среднего ($M \pm m$). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В общей выборке концентрация НСЕ у больных с ИИ в точке 1 ($n = 40$) значительно превышала референсные значения ($16,3$ нг/мл) и значимо уменьшалась в динамике ($34,9 \pm 5,9 \rightarrow 17,7 \pm 1,1$; $p = 0,007$) к 10–14 дню. У 28 (67 %) человек уровень НСЕ был повышен в первые 72 часа ИИ, у 29 (69 %) было отмечено снижение уровня к 10–14 дню, при

Таблица 1. Общая характеристика пациентов

Показатель		Пациенты (n = 40)
Возраст, годы ($M \pm m$)		$72,6 \pm 1,9$
Пол, n (%)	Женщины	26 (65)
	Мужчины	14 (35)
ИИ, n (%)	Первичный	28 (70)
	Повторный	12 (30)
Сосудистый бассейн, n (%)	Каротидный	34 (85)
	Вертебрально-базилярный	6 (15)
Этиология ИИ по критериям TOAST, n (%)	Атеротромботический	18 (45)
	Кардиоэмболический	14 (35)
	Лакунарный	4 (10)
	Неуточненный	4 (10)
Курение, n (%)		3 (7,5)
Сахарный диабет 2 типа, n (%)		8 (20)
Артериальная гипертензия, n (%)		28 (70)
Мерцательная аритмия, n (%)		14 (35)
Дислипидемия, n (%)		14 (35)
Индекс массы тела, $M \pm m$		$28,1 \pm 0,8$

Таблица 2. Уровни НСЕ, ГФКБ, NR2-антител, тяжесть неврологических нарушений, краткосрочный результат и индекс повседневной активности в динамике в зависимости от пола

Показатель M ± m	Мужчины (n = 14)	Женщины (n = 26)	p
НСЕ (нг/мл) в точке 1	26,7 ± 5,4	39,4 ± 8,6	0,313
НСЕ (нг/мл) в точке 2	15,7 ± 1,7	18,8 ± 1,4	0,193
ГФКБ (нг/мл) в точке 1	0,49 ± 0,23	0,33 ± 0,07	0,420
ГФКБ (нг/мл) в точке 2	0,26 ± 0,006	0,26 ± 0,007	0,664
NR2-антитела (нг/мл) в точке 1	0,62 ± 0,05	1,22 ± 0,43	0,327
NR2-антитела (нг/мл) в точке 2	0,69 ± 0,67	1,45 ± 0,47	0,255
NIHSS (балл) в точке 1	5,57 ± 1,4	9,73 ± 1,5	0,031
NIHSS (балл) в точке 2	2,78 ± 0,9	4,80 ± 1,5	0,146
mRS (балл) в точке 1	3,21 ± 0,2	3,88 ± 0,1	0,031
mRS (балл) в точке 2	2,14 ± 0,3	2,84 ± 0,2	0,048
Barthel (балл) в точке 1	65,7 ± 8,1	40,2 ± 5,6	0,011
Barthel (балл) в точке 2	87,9 ± 5,0	69,8 ± 4,9	0,006

этом референсных значений уровень НСЕ достиг только у 12 (29 %) пациентов. У 13 (31 %) человек наблюдалось повышение уровня НСЕ в динамике.

ГФКБ также был обнаружен в значительном количестве, в большинстве случаев превышая пороговое значение (0,25 нг/мл), и уменьшался в динамике, снижаясь ниже порогового уровня ($0,4 \pm 0,1 \rightarrow 0,2 \pm 0,005$; $p = 0,22$). Лишь трех случаях (7,5 %) наблюдалось повышение уровня в динамике.

Среднее количество NR2-антител референсных значений (2,0 нг/мл) в общей выборке не превысило ($1,01 \pm 0,3$), а в динамике к 10–14 дню в большинстве случаев было отмечено значимое нарастание показателя ($1,1 \pm 0,3$); $p = 0,007$. У 13 пациентов (32,5 %) было выявлено незначительное снижение уровня NR2-антител в динамике.

Тяжесть неврологической симптоматики значимо уменьшалась к 10–14 дню (NIHSS): $8,3 \pm 1,1 \rightarrow 4,1 \pm 0,7$; $p = 0,0000001$; снижалась степень инвалидизации (mRS): $3,7 \pm 0,1 \rightarrow 2,6 \pm 1,5$; $p = 0,0000001$ и возрастал индекс повседневной активности Barthel: $49,1 \pm 4,9 \rightarrow 76,1 \pm 3,9$; $p = 0,0000001$. При этом тяжесть ИИ и степень инвалидизации была достоверно более выражена у женщин по сравнению с мужчинами (табл. 2). При сравнении уровней биомаркеров более высокое значение НСЕ, ГФКБ, NR2-антител было также выявлено у женщин, но статистически уровень значимости достигнут не был (табл. 2).

При сравнении показателей в зависимости от пораженного сосудистого бассейна достоверны-

ми оказались различия только по степени тяжести ИИ при поступлении и уровню NR2-антител (табл. 3).

Все пациенты в зависимости от степени тяжести неврологических нарушений (NIHSS) были условно разделены на две группы: 1-я (средняя и тяжелая степень тяжести) — 7 и более баллов, 2-я (легкая степень) — 0–6 баллов. Сравнение уровней НСЕ, ГФКБ, NR2-антител в данных группах в динамике представлено в таблице 4. Как видно из таблицы 4, большая часть пациентов имела легкую степень тяжести при поступлении ($n = 25$). У пациентов, имевших более тяжелую симптоматику в первые 72 часа, концентрация НСЕ была выше, достигая уровня значимости различий в динамике ($p = 0,008$). Уровень НСЕ значимо уменьшался в динамике у пациентов 2-й группы ($p = 0,016$). Те пациенты, которые к 10–14 дню перешли из группы тяжелой и средней степени тяжести в легкую, также имели значимый регресс уровня НСЕ в динамике ($p = 0,017$). Пациенты, которые имели тяжелую и среднюю степень тяжести в первые 72 часа ИИ и не имели значимого регресса неврологических нарушений в динамике, достаточно, чтобы перейти в группу с более легкой степенью тяжести, не имели значимого уменьшения уровня НСЕ.

Концентрация ГФКБ в группе с тяжелым неврологическим дефицитом была достоверно выше в первые трое суток по сравнению с таковой у пациентов, имеющих легкую степень неврологических

Таблица 3. Значимые различия показателя тяжести ИИ и уровня NR2-антител в зависимости от пораженного бассейна

Показатель $M \pm m$	Пораженный сосудистый бассейн		p
	Каротидный	Вертебрально-базиллярный	
NIHSS (балл) в точке 1	9, 23 $\pm$ 0,8	2,83 $\pm$ 0,8	0,004
NR2-антитела (нг/мл) в точке 1	1,10 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,01	0,024
NR2-антитела (нг/мл) в точке 2	1,30 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,02	0,016

Таблица 4. Динамика уровней HCE, ГФКБ, NR2-антител в зависимости от степени тяжести ИИ

Биомаркер(нг/мл), $M \pm m$		Группа 1 (точка 1), n = 15 (37,5 %), NIHSS 15,8 $\pm$ 5,9	Группа 2 (точка 1), n = 25 (65,5 %), NIHSS 3,7 $\pm$ 1,36	p	Группа 1 (точка 2), n = 5 (12,5 %), NIHSS 13,6 $\pm$ 2,6	Группа 2 (точка 2), n = 35 (87,5 %), NIHSS 2,7 $\pm$ 0,4	p
HCE	Точка 1	45,9 $\pm$ 13,9	28,3 $\pm$ 3,3	0,426	59,1 $\pm$ 45,5	28,7 $\pm$ 9,18	0,371
HCE	Точка 2	21,4 $\pm$ 8,8	15,5 $\pm$ 4,6	0,008	31,5 $\pm$ 6,1	16,2 $\pm$ 5,17	0,073
ГФКБ	Точка 1	0,6 $\pm$ 0,4	0,25 $\pm$ 0,02	0,058	1,34 $\pm$ 0,9	0,25 $\pm$ 0,02	0,074
ГФКБ	Точка 2	0,3 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,03	0,893	0,25 $\pm$ 0,005	0,26 $\pm$ 0,034	0,971
NR2-антител	Точка 1	0,8 $\pm$ 0,4	1,12 $\pm$ 0,5	0,047	0,8 $\pm$ 0,62	1,04 $\pm$ 0,4	0,942
NR2-антител	Точка 2	1,25 $\pm$ 0,6	1,14 $\pm$ 0,5	0,041	1,09 $\pm$ 0,9	1,20 $\pm$ 0,4	0,857
p	HCE	0,302	0,016		0,371	0,017	
	ГФКБ	0,221	0,978		0,073	0,683	
	NR2-анти-тел	0,096	0,404		0,074	0,281	

Примечания: группа 1 — средняя и тяжелая степень тяжести (7 и более баллов по NIHSS); группа 2 — легкая степень (0–6 баллов по NIHSS).

нарушений ($p = 0,058$), и уменьшалась в динамике, тогда как в группе с более легкой симптоматикой практически не менялась. К тому же те пациенты, которые к 10–14 дню по-прежнему имели высокий балл по шкале NIH, имели более высокий уровень ГФКБ в первые 72 часа.

Выявлен достоверно более низкий уровень NR2-антител в первые 72 часа у пациентов с тяжелой степенью неврологических нарушений по сравнению с пациентами с легкой степенью расстройств ($0,8 \pm 0,4$ и $1,12 \pm 0,5$; $p = 0,047$). Однако в динамике в группе 1 был отмечен более высокий уровень NR2-антител, чем у пациентов 2-й группы ($1,25 \pm 0,6$ и $1,14$; $p = 0,041$).

В качестве примера можно отметить пациента

с тяжелым ИИ, который имел улучшение по шкале NIH в динамике лишь на 2 балла, что по-прежнему соответствовало тяжелому ИИ, при этом уровень HCE, хотя и существенно снизился, но имел значительное превышение референсных значений ($52,4 \rightarrow 38,7$ нг/мл), уровень ГФКБ также превышал пороговый уровень и снижался в динамике лишь до уровня порогового значения ($0,35 \rightarrow 0,25$ нг/мл), концентрация NR2-антител при этом нарастала к 14 дню ($0,47 \rightarrow 0,72$ нг/мл).

Для оценки краткосрочного исхода к 10–14 дню ИИ пациентов ранжировали в зависимости от балла по шкале Rankin: благоприятный исход (mRS 0–2) и неблагоприятный исход (mRS 3–6) (табл. 5). Данные, представленные в таблице 5, показывают досто-

Таблица 5. Уровни НСЕ, ГФКБ, NR2-антител в зависимости от краткосрочного исход к 10–14 дню

НСЕ (нг/мл), М ± m Благоприятный 18 (45)/1,7 ± 0,1		Краткосрочный исход на 10–14 день n (%) / М ± m		p
		Неблагоприятный 22 (55)/3,7 ± 0,1		
НСЕ	Точка 1	27,8 ± 5,8	40,8 ± 9,7	0,012
	Точка 2	15,2 ± 1,1	19,8 ± 1,7	0,014
ГФКБ	Точка 1	0,25 ± 0,002	0,5 ± 0,17	0,0001
	Точка 2	0,25 ± 0,007	0,26 ± 0,007	0,660
NR2-антитела	Точка 1	0,83 ± 0,1	1,15 ± 0,5	0,0001
	Точка 2	0,81 ± 0,9	1,5 ± 0,6	0,00001
p		НСЕ - 0,03 ГФКБ - 1,0 NR2-антитела - 0,627	НСЕ - 0,04 ГФКБ - 0,22 NR2-антитела - 0,06	

верно более высокий уровень НСЕ и NR2-антител как в точке 1, так и в точке 2, ГФКБ в точке 1 у пациентов, имевших неблагоприятный исход к 10–14 дню, по сравнению с пациентами с благоприятным исходом. Кроме того, в группе с неблагоприятным исходом, хоть и прослеживалось значимое уменьшение уровней НСЕ, ГФКБ в динамике, но достижение референсных значений не наблюдалось. При этом уровень NR2-антител в группе с благоприятным исходом имел тенденцию к уменьшению, тогда как в группе с неблагоприятным — повышался ($p = 0,06$).

При проведении корреляционного анализа выявлены значимые взаимосвязи между уровнями НСЕ, ГФКБ, NR2-антител и тяжестью неврологических нарушений при ИИ, степенью инвалидизации и краткосрочным исходом (табл. 6). Таким образом, анализируя данные таблицы 6, можно сказать, что чем выше уровень НСЕ и ГФКБ в первые 72 часа ИИ, тем больше тяжесть неврологической симптоматики и хуже восстановление повседневной активности к 10–14 дню. При сохранении высокого уровня НСЕ в динамике или увеличении этого показателя тяжесть ИИ остается существенной или нарастает, что также ухудшает повседневную активность и ассоциируется с худшим краткосрочным исходом. При этом было обнаружено, что уровень НСЕ выше у более старшей возрастной группы. Уровень NR2-антител в первые 72 часа коррелировал с уровнем NR2-антител в динамике, а уровень NR2-антител на 10–14 день с НСЕ в первые трое суток, что позволяет предполагать возможность этого показателя отражать продолжающийся процесс распада ишемизированной ткани.

Обсуждение

Уровни НСЕ, ГФКБ, NR2-антител, их колебания и значение

В проведенном нами исследовании уровень НСЕ в СК в первые 72 часа ИИ превышал референсные значения и значимо уменьшался в динамике к 10–14 дню заболевания. Полученные нами результаты согласуются с большинством исследований, результаты которых представлены в литературе [7].

Мы не выявили существенных отличий по уровню НСЕ в зависимости от пола, сопутствующей патологии, факторов риска, пораженного сосудистого бассейна, что также согласуется с литературными данными. Учитывая важность учета такого фактора риска инсульта, как сахарный диабет, мы не исключали пациентов с диабетом из исследования. Науак А. и соавторы также не обнаружили значимых отличий в уровне НСЕ у пациентов в зависимости от наличия сахарного диабета [31]. Мы выявили прямую корреляционную связь ($r = 0,3$) уровня НСЕ на 10–14 день с возрастом, что говорит о более длительном и сильном разрушении ткани у более старшей возрастной группы.

Повышение уровня ГФКБ в крови по сравнению со здоровым контролем было обнаружено в большинстве исследований, представленных в литературе [8]. В нашем исследовании также ГФКБ определялся в значительном количестве в первые 72 часа от начала ИИ, в большинстве случаев превышал пороговое значение (0,25 нг/мл) и уменьшался в динамике, снижаясь ниже порогового уровня ($0,4 \pm 0,1 \rightarrow 0,2 \pm 0,005$; $p = 0,22$).

Таблица 6. Значимые корреляционные связи уровней НСЕ, ГФКБ, NR2-антител, тяжести ИИ, степени инвалидизации, краткосрочного исхода и возраста

Биомаркер/Точка	Показатель	Коэффициент корреляции (r)
НСЕ/Точка 1	mRS Точка 2	-0,34
	Barthel Точка 2	0,33
	NR2-антитела Точка 2	0,35
НСЕ/Точка 2	Возраст	0,31
	NIHSS Точка 1	0,38
	NIHSS Точка 2	0,47
	mRS Точка 1	0,35
	mRS Точка 2	0,43
	Barthel Точка 1	-0,39
	Barthel Точка 2	-0,42
	ГФКБ Точка 2	0,49
ГФКБ/Точка 1	NIHSS Точка 1	0,45
	NIHSS Точка 2	0,49
	mRS Точка 1	0,33
	mRS Точка 2	0,43
	Barthel Точка 2	-0,40
	ГФКБ Точка 2	0,49
NR2-антитела/Точка 1	NR2-антитела Точка 2	0,89

Камчатнов П.Р. и соавторы исследовали уровень ГФКБ у пациентов в первые 24 часа от начала симптомов ИИ в сравнении с пациентами с хронической цереброваскулярной патологией, ишемической болезнью сердца и здоровым контролем и обнаружили достоверно более высокий уровень ГФКБ у пациентов с ИИ [32]. При этом у пациентов с хронической цереброваскулярной патологией уровень ГФКБ в некоторых случаях был несколько повышен, но значительно меньше, чем при ИИ, тогда как между пациентами с ишемической болезнью сердца и здоровым контролем вообще не было различий. Это подтверждает специфичность данного маркера для острого мозгового повреждения. Кроме того, Ren C. и соавторы в своей работе представили данные о том, что уровень ГФКБ в первые 24 часа от начала симптомов при ИИ значимо выше, чем при ТИА, но при этом концентрация у пациентов с ТИА и у здорового контроля значимо не различалась [33]. Это позволяет предполагать сохранность ГЭБ при ТИА и подтверждает возможность использования уровня ГФКБ в крови для определения степени повреждения мозговой ткани при

инсульте. Мы обнаружили прямую корреляционную связь между уровнями ГФКБ в первые 72 часа и уровнем ГФКБ в динамике, что может отражать продолжающийся процесс распада ишемизированной ткани, который можно оценивать по уровню этого показателя.

Повышение уровня NR2-антител в крови по сравнению со здоровым контролем было обнаружено в большинстве исследований, представленных в литературе как при ИИ, так и при ТИА [9]. В нашем исследовании среднее количество NR2-антител референсных значений (2,0 нг/мл) в общей выборке не превысило ($1,01 \pm 0,3$), а в динамике к 10–14 дню в большинстве случаев было отмечено значимое нарастание показателя ($1,1 \pm 0,3$); $p = 0,007$. Согласно данным литературы, была выявлена большая степень повышения уровня NR2-антител в крови в остром периоде ИИ и при ТИА у женщин по сравнению с мужчинами [30, 34]. Мы также получили более высокий уровень у женщин по сравнению с мужчинами ($1,22 \pm 0,43$ и $0,62 \pm 0,05$), но уровень значимости достигнут не был; $p = 0,327$.

В работе Дамбиновой С. А. и соавторов было выявлено, что при поражении каротидного бассейна (КБ) уровень NR2-антител выше, чем при поражении вертебрально-базилярного бассейна (ВББ) [35]. Мы также обнаружили более высокий уровень NR2-антител при поражении КБ по сравнению с ВББ как в первые 72 часа ($1,10 \pm 0,04$ и $0,47 \pm 0,01$; $p = 0,024$), так и на 10–14 день ($1,30 \pm 0,05$ и $0,51 \pm 0,02$; $p = 0,016$), что может свидетельствовать о возможности данного показателя отражать и масштабность поражения мозговой ткани при ИИ.

Таким образом, данные биомаркеры показали способность подтвердить наличие повреждения мозговой ткани в остром периоде ИИ, а также степень выраженности некротических изменений в мозге и их динамику на фоне проводимой терапии. Это позволяет использовать данные биомаркеры не только для диагностики ИИ, но и для оценки масштабности поражения ткани головного мозга при инсульте.

Уровни биомаркеров и тяжесть неврологических нарушений при ИИ

Часть исследователей сообщила о большей тяжести ИИ при высокой концентрации НСЕ в крови [7], что наблюдали и мы. У пациентов, имевших более тяжелую симптоматику в первые 72 часа, концентрация НСЕ была выше, достигая уровня значимости различий на 10–14 день ($21,4 \pm 8,8$ и $15,5 \pm 4,6$; $p = 0,008$). Уровень НСЕ значимо уменьшался в динамике именно у пациентов, имевших легкую степень тяжести ($p = 0,016$). Была выявлена корреляционная связь уровня НСЕ в точке 2 и NIHSS при поступлении ($r = 0,38$) и NIHSS при выписке ($r = 0,47$), НСЕ в точке 1 и 2 и индексом Barthel на 10–14 день ($r = -0,39$ и $r = -0,42$ соответственно), что отражает более тяжелые неврологические нарушения при повышенном уровне НСЕ. Nayak A. и соавторы описали более высокий уровень НСЕ у пациентов с выраженным неврологическим дефицитом и у пациентов, умерших впоследствии [31]. Мы также выявили более высокий уровень НСЕ в первые 72 часа у пациентов, которые к 10–14 дню все еще имели тяжелую неврологическую симптоматику. Это может указывать на то, что уровень НСЕ отражает степень повреждения мозговой ткани при ИИ, и чем выше уровень данного биомаркера, тем обширнее очаг некроза в головном мозге.

Согласно литературным источникам, связь была положительной при ИИ между тяжестью инсульта, оцененной по NIHSS, и пиковыми уровнями ГФКБ в крови ($p < 0,05$) [8]. Нами также было выявлено значимое различие по степени тяжести пациентов с ИИ в зависимости от уровня ГФКБ в первые 72

часа ($p = 0,05$). Мы обнаружили прямую корреляционную связь между уровнем ГФКБ в первые 72 часа ИИ и тяжестью неврологического дефицита по NIHSS как в первые трое суток ($r = 0,45$), так и в динамике ($r = 0,49$). Кроме того, была обнаружена ассоциация с худшим восстановлением самообслуживания к 10–14 дню в случае повышенного уровня ГФКБ в первые трое суток [Barthel (точка 2), $r = -0,42$]. Пациенты, имевшие высокий уровень ГФКБ в первые 72 часа, хоть и имели значительное снижение его уровня в динамике ($1,34 \pm 0,9 \rightarrow 0,25 \pm 0,005$), но тяжесть состояния оставалась значительной и составляла более 6 баллов по NIHSS, что не позволяло относить этих пациентов к легкой степени тяжести через 10–14 дней. В исследовании Undén J. и соавторов при ИИ пациенты с меньшей степенью тяжести инсульта имели более низкий уровень ГФКБ в первые 24 часа от начала симптомов. При этом концентрация $\geq 0,04$ нг/мл при ИИ в случае проведения тромболитической терапии увеличивала риск геморрагических осложнений в 6,5 раза ($p = 0,0066$) [36].

Таким образом, в нашем исследовании мы обнаружили, что повышенный уровень ГФКБ отражает как сам факт поражения мозговой ткани, так и тяжесть ИИ в первые трое суток. Повышенный уровень ГФКБ впервые 72 часа может служить неблагоприятным прогностическим признаком при ИИ.

Мы выявили в первые 72 часа достоверно более высокий уровень NR2-антител у пациентов с легкой степенью неврологических нарушений ($0,8 \pm 0,4$ и $1,12 \pm 0,5$; $p = 0,047$) по сравнению с более низким уровнем данного биомаркера у пациентов с тяжелой степенью тяжести ИИ. Однако в динамике отмечали обратную ситуацию: у пациентов с плохим восстановлением нарушенных функций, которые оставались в группе с тяжелыми нарушениями, уровень NR2-антител был выше ($1,25 \pm 0,6$ и $1,14$; $p = 0,041$). Другими исследователями также было выявлено, что у пациентов в состоянии ступора и комы не наблюдалось повышения уровня NR2-антител в первые дни ИИ, что, вероятно, отражало развитие иммунодефицитного состояния, при этом снижение уровня NR2-антител до субнормальных значений было крайне неблагоприятным признаком, как правило, приводившим к смерти пациентов [37]. В литературе описана прямая корреляционная связь уровня NR2-антител с тяжестью состояния (NIHSS) в остром периоде ИИ [38]. В своем исследовании мы обнаружили прямую связь NR2-антител на 10–14 день и уровня НСЕ в первые трое суток, который в свою очередь положительно коррелирует с тяжестью ИИ. Это также может подтверждать предположение о том, что в первые дни ИИ антите-

ла вырабатываются не в полной мере, а нарастают в динамике, причем более интенсивно именно при тяжелом поражении головного мозга, отражая тем самым и объем пораженной ткани и продолжающуюся гибель клеток мозга.

Учитывая эти данные, можно сказать, что уровни НСЕ, ГФКБ, NR2-антител могут быть использованы не только для контроля степени повреждения мозговой ткани и для мониторинга осложнений и эффективности терапии.

Уровни НСЕ, ГФКБ, NR2-антител как прогностический маркер

В нашем исследовании пациенты, имевшие неблагоприятный краткосрочный исход к 10–14 дню заболевания (mRS $r = 3$ и более баллов), имели более высокий уровень НСЕ как в первые трое суток, так и в динамике ($40,8 \pm 9,7$ и $27,8 \pm 5,8$; $p = 0,012$). Кроме того, у пациентов с неблагоприятным краткосрочным исходом уровень НСЕ к 10–14 дню хоть и снижался, но значительно меньше, чем у пациентов с более лучшим исходом, и не достигал референсных значений ($19,8 \pm 1,7$ и $15,2 \pm 1,1$; $p = 0,014$). Это было подтверждено и выявленными корреляционными связями. Так, пациенты, имевшие более высокую концентрацию НСЕ при поступлении, имели более низкий индекс повседневной активности и независимости в жизнедеятельности Barthel ($r = -0,34$) и более высокий бал по mRS в динамике ($r = 0,33$), что отражает неблагоприятный краткосрочный исход у данных пациентов. К тому же уровень НСЕ через 10–14 дней коррелировал с низким уровнем самообслуживания Barthel и mRS как в первые 72 часа, так и с худшим краткосрочным исходом в динамике (Barthel $r = -0,39$ и $r = -0,42$ соответственно) и (mRS $r = 0,35$ и $r = 0,43$ соответственно). Наши данные согласуются с данными большинства исследователей [7]. В нашем исследовании мы наблюдали у пациента, имевшего очаг размером 28×16 мм с пенумброй 127×49 мм в бассейне левой средней мозговой артерии (mRS в первые 72 часа — $5 \rightarrow mRS$ через 14 дней — 4), увеличение показателя НСЕ в динамике $23,9 \rightarrow 33,8$ нг/мл. Sienkiewicz-Jarosz H. и соавторы определили, что повышенный уровень НСЕ через 12 часов от начала симптомов увеличивает риск неблагоприятного исхода через 3 месяца в 2,4 раза, через 24 и 72 часа — в 10,2 раза [39].

Уровень ГФКБ у пациентов, имевших неблагоприятный краткосрочный исход к 10–14 дню (mRS 3 и более баллов), был более высоким как в первые трое суток, так и в динамике ($0,5 \pm 0,17$ и $0,25 \pm 0,002$; $p = 0,0001$). Также у пациентов с неблагоприятным краткосрочным исходом уровень ГФКБ

к 10–14 дню хоть и снижался, но значительно меньше, чем у пациентов с более лучшим исходом, и не достигал референсных значений ($0,26 \pm 0,007$ и $0,25 \pm 0,007$; $p = 0,660$). Выявленные корреляционные связи также подтверждают это. Так, пациенты, имевшие более высокую концентрацию ГФКБ в СК при поступлении, имели более высокий бал по mRS как в первые трое суток ($r = 0,33$), так и в динамике ($r = 0,43$), и низкий индекс повседневной активности и независимости в жизнедеятельности Barthel ($r = -0,40$) к 10–14 день. По данным литературы, через 1 год после перенесенного ИИ уровни ГФКБ у пациентов с хорошим функциональным исходом, оцененным по шкале Rankin, были значительно ниже, чем у пациентов с плохим исходом ($p < 0,001$), при этом нескорректированный риск плохого исхода увеличивался в 12 раз, а скорректированный — в 6 раз при уровне ГФКБ более 0,28 нг/мл ($p < 0,001$). Liu G. и соавторы выявили, что уровни ГФКБ в первые 24 часа у пациентов при ИИ, которые умерли в остром периоде, были более чем в 2 раза выше по сравнению с пациентами, которые выжили ($0,18–0,43$ нг/мл против $0,08–0,23$ нг/мл; $p < 0,001$) [40].

Представленные в литературе данные показывают, что степень повышения NR2-антител может иметь прогностическое значение. В работе Гусева Е. И. и соавторов было получено наиболее благоприятное течение инсульта с хорошим восстановлением нарушенных функций, когда к третьему дню развития заболевания наблюдалась стабильная нормализация уровня NR2-антител [37]. Мы выявили, что у пациентов с неблагоприятным функциональным исходом к 10–14 дню уровень NR2-антител в первые 72 часа был достоверно более высоким по сравнению с уровнем этого маркера у пациентов с благоприятным исходом ($1,15 \pm 0,5$ и $0,83 \pm 0,1$; $p = 0,0001$). К тому же мы отмечали нарастание уровня NR2-антител в динамике в этой группе по сравнению со снижением этого показателя у пациентов с более благоприятным исходом ($1,5 \pm 0,6$ и $0,83 \pm 0,9$; $p = 0,00001$). Анализируя уровень NR2-антител и сопоставляя его с клиническим течением заболевания, можно также предполагать срыв процессов ауторегуляции в мозге при несоответствии тяжести состояния и концентрации NR2-антител, что может являться плохим прогностическим признаком.

Заключение

В проведенном исследовании уточнено значение уровней НСЕ, ГФКБ и NR2-антител в остром периоде ИИ в СК и продемонстрирована их связь с тяжестью неврологических нарушений и неблагоприятным

гоприятным краткосрочным функциональным исходом. Полученные результаты показали наличие у данных веществ диагностического и прогностического потенциала, что предполагает актуальность дальнейшего их изучения более детально и на большей выборке, возможно, в сочетании с другими показателями и с учетом наибольшего количества характеристик. На данный момент, учитывая полученные нами результаты и данные литературы, можно сказать, что уровни НСЕ, ГФКБ и NR2-антител могут быть использованы не только для контроля степени повреждения мозговой ткани и мониторинга эффективности терапии и осложнений, но и в качестве прогностических биомаркеров при ИИ, оценки перспективы реабилитационного потенциала и определения выраженности инвалидизации после инсульта.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Feigin VL, Norrving B, George MG, et al. Prevention of stroke: a strategic global imperative. *Nat Rev Neurol*. 2016; 12 (9): 501–512.
2. Castellanos M, Serena J. Applicability of biomarkers in ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2007; 24 Suppl 1: 7–15.
3. Maas MB, Furie KL. Molecular biomarkers in stroke diagnosis and prognosis. *Biomark Med*. 2009; 3 (4): 363–383.
4. Saengen AK, Christenson RH. Stroke biomarkers: progress and challenges for diagnosis, prognosis, differentiation and treatment. *Clin Chem*. 2010; 56 (1): 21–33.
5. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001; 69(3): 89–95.
6. Whiteley W, Tseng M-C, Sandercock P. Blood biomarkers in the diagnosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke*. 2008; 39(10): 2902–2909.
7. Topuzova MP, Alekseeva TM, Panina EB, et al. The possibility of using neuron-specific enolase as a biomarker in the acute period of stroke. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S. S. Korsakova=S.S. Korsakov journal of neurology and psychiatry*. 2019; 119(8-2): 53–62. In Russian [Топузова М.П., Алексеева Т.М., Панина Е.Б. и др. Возможность использования нейрон-специфической енолазы как биомаркера в остром периоде инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2019; 119 (8-2): 53–62].
8. Topuzova MP, Alekseeva TM, Panina EB, et al. The possibility of using glial fibrillary acidic protein as a biomarker in the acute period of stroke. *Rossiiskij nevrologicheskij zhurnal=Russian neurological journal*. 2019; 24 (4): 4–15. In Russian [Топузова М.П., Алексеева Т.М., Панина Е.Б. и др. Возможность использования
9. Topuzova MP, Alekseeva TM, Panina EB, et al. NR2 antibodies as diagnostic and prognostic stroke biomarker. *Arterial'naya gipertenziya=Arterial hypertension*. 2020; 26 (1): 27–36. In Russian [Топузова М.П., Алексеева Т.М., Панина Е.Б. и др. NR2-антитела как диагностический и прогностический биомаркер при инсульте. *Артериальная гипертензия*. 2020; 26 (1): 27–36].
10. Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, et al. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1997; 28(10): 1956–1960.
11. Laskowitz DT, Grocott H, Hsia A, et al. Serum markers of cerebral ischemia. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 1998; 7 (4): 234–241.
12. Eng LF. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol*. 1985; 8 (4-6): 203–214.
13. Missler U, Wiesmann M, Wittmann G, et al. Measurement of glial fibrillary acidic protein in human blood: analytical method and preliminary clinical results. *Clin Chem*. 1999; 45 (1): 138–141.
14. Lundgaard I, Osório MJ, Kress BT, et al. White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience*. 2014; 276: 161–173.
15. Kogure T, Kogure K. Molecular and biochemical events within the brain subjected to cerebral ischemia (targets for therapeutic intervention). *Clin Neurosci*. 1997; 4 (4): 179–183.
16. Shimada N, Graf R, Rosner G, et al. Ischemic flow threshold for extracellular glutamate increase in cat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1989; 9 (5): 603–606.
17. Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, et al. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg*. 1981; 54 (6): 773–782.
18. Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*. 1987; 7 (2): 357–368.
19. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, et al. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem*. 1984; 43 (5): 1369–1374.
20. Meldrum B, Evans M, Griffiths T, et al. Ischaemic brain damage: the role of excitatory activity and of calcium entry. *Br J Anaesth*. 1985; 57 (1): 44–46.
21. Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci*. 1990; 13: 171–182.
22. Okubo Y, Sekiya H, Namiki S, et al. Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107 (14): 6526–6531.
23. Wang Y, Qin Z-H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*. 2010; 15 (11): 1382–1402.
24. Li F, Tsien JZ. Memory and the NMDA receptors. *N Engl J Med*. 2009; 361 (3): 302–303.
25. Levite M. Glutamate receptor antibodies in neurological diseases: anti-AMPA-GluR3 antibodies, anti-NMDA-NR1 antibodies, anti-NMDA-NR2A/B antibodies, anti-mGluR1 antibodies or anti-mGluR5 antibodies are present in subpopulations of patients with either: epilepsy,

- encephalitis, cerebellar ataxia, systemic lupus erythematosus (SLE) and neuropsychiatric SLE, Sjogren's syndrome, schizophrenia, mania or stroke. These autoimmune anti-glutamate receptor antibodies can bind neurons in few brain regions, activate glutamate receptors, decrease glutamate receptor's expression, impair glutamate-induced signaling and function, activate blood brain barrier endothelial cells, kill neurons, damage the brain, induce behavioral/psychiatric/cognitive abnormalities and ataxia in animal models, and can be removed or silenced in some patients by immunotherapy. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014; 121 (8): 1029–1075.
26. Gappoeva MU, Izykenova GA, Granstrem OK, et al. Expression of NMDA neuroreceptors in experimental ischemia. *Biochemistry (Mosc)*. 2003; 68 (6): 696–702.
27. Gingrich MB, Traynelis SF. Serine proteases and brain damage – is there a link? *Trends Neurosci*. 2000; 23 (9): 399–407.
28. Dambinova SA, Khounteev GA, Skoromets AA. Multiple panel of biomarkers for TIA/stroke evaluation. *Stroke*. 2002; 33 (5): 1181–1182.
29. Dambinova SA, Skoromets AA, Skoromets AP. Biomarkers of cerebral ischemia. Development, research and practice. SPb.: "IPK Costa LLC", 2013. 336 p. In Russian [Дамбинова С.А., Скоромец А.А., Скоромец А.П. Биомаркеры церебральной ишемии. Разработка, исследование и практика. СПб.: ООО «ИПК Коста», 2013. 336 с.].
30. Klimenko LL, Skalny AV, Turna AA, et al. Serum trace element profiles, prolactin, and cortisol in transient ischemic attack patients. *Biol Trace Elem Res*. 2016; 172 (1): 93–100.
31. Nayak AR, Badar SR, Lande N, et al. Prediction of outcome in diabetic acute ischemic stroke patients: a hospital-based pilot study report. *Ann Neurosci*. 2016; 23 (4): 199–208.
32. Kamchatnov PR, Chugunov AV, Ruleva NYu, et al. Autoantibodies to GFAP (glial fibrillary acidic protein) and to dopamine in patients with acute and chronic cerebrovascular disorders. *Health*. 2010; 2 (12): 1366–1371.
33. Ren C, Kobeissy F, Alawieh A, et al. Assessment of Serum UCH-L1 and GFAP in acute stroke patients. *Sci Rep*. 2016; 6: 24588.
34. Weissman JD, Khunteev GA, Heath R, et al. NR2 antibodies: risk assessment of transient ischemic attack (TIA)/stroke in patients with history of isolated and multiple cerebrovascular events. *J Neurol Sci*. 2011; 300 (1-2): 97–102.
35. Dambinova SA, Aliev KT, Bondarenko EV, et al. The biomarkers of cerebral ischemia as a new method for the validation of the efficacy of cytoprotective therapy. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S. S. Korsakova=S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2017; 117 (5): 62–67. In Russian [Дамбинова С.А., Алиев К.Т., Бондаренко Е.В. и др. Биомаркеры ишемии головного мозга как новый метод доказательства эффективности нейроцитопротекторов. Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2017; 117 (5): 62–67].
36. Undén J, Strandberg K, Malm J, et al. Explorative investigation of biomarkers of brain damage and coagulation system activation in clinical stroke differentiation. *J Neurol*. 2009; 256 (1): 72–77.
37. Gusev EI, Skvortsova VI, Izykenova GA, et al. The level of autoantibodies to glutamate receptors in the blood serum of patients in the acute period of ischemic stroke. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S. S. Korsakova=S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 1996; 96 (5): 68–72. In Russian [Гусев Е.И., Скворцова В.И., Изыкенова Г.А. и др. Уровень аутоантител к глутаматным рецепторам в сыворотке крови у больных в остром периоде ишемического инсульта. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 1996; 96(5): 68–72].
38. Dambinova SA, Khounteev GA, Izykenova GA, et al. Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-D-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke. *Clin Chem*. 2003; 49 (10): 1752–1762.
39. Sienkiewicz-Jarosz H, Galecka-Wolska M, Bidziński A, et al. Predictive value of selected biochemical markers of brain damage for functional outcome in ischaemic stroke patients. *Neurol Neurochir Pol*. 2009; 43 (2): 126–133.
40. Liu G, Geng J. Glial fibrillary acidic protein as a prognostic marker of acute ischemic stroke. *Hum Exp Toxicol*. 2018; 37 (10): 1048–1053.

Информация об авторах:

Алексеева Татьяна Михайловна, д.м.н., доцент, заведующая кафедрой неврологии и психиатрии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Топузова Мария Петровна, к.м.н., доцент кафедры неврологии и психиатрии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Чайковская Александра Дмитриевна, аспирант кафедры неврологии и психиатрии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Панина Елена Борисовна, к.м.н., доцент кафедры неврологии и психиатрии, ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России;

Вавилова Татьяна Владимировна, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой лабораторной медицины и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Поспелова Мария Львовна, д.м.н., ведущий научный сотрудник НИЛ неврологии и нейрореабилитации, доцент кафедры неврологии и психиатрии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Васильева Елена Юрьевна, заведующая Центральной клинико-диагностической лабораторией, ассистент кафедры лабораторной медицины и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Симаков Каюм Владимирович, руководитель Регионального сосудистого центра, заведующий неврологическим отделением для лечения больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России;

Сергеева Татьяна Васильевна, к.м.н., заместитель главного врача по неврологии (руководитель Регионального сосудистого центра) СПб ГБУЗ «Елизаветинская больница».

Author information:

Alekseeva Tat'yana M., MD, PhD, Dr. Sci., Head of the Department of Neurology and Psychiatry, Almazov National Medical Research Centre;

Topuzova Mariya P., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Neurology and Psychiatry, Almazov National Medical Research Centre;

Chaykovskaya Alexandra D., MD, Postgraduate Student

of the Department of Neurology and Psychiatry, Almazov National Medical Research Centre;

Panina Elena B., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Neurology and Psychiatry, Almazov National Medical Research Centre;

Vavilova Tat'yana V., MD, PhD, Dr. Sci., Professor, Head of the Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Pospelova Maria L., MD, PhD, Leading Researcher of Neurology and Neurorehabilitation Scientific Research Department, Almazov National Medical Research Centre;

Vasilieva Elena Yu., MD, Head of Central Clinical Diagnostics Laboratory, Assistant of the Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Simakov Kayum V., MD, Head of the Regional Vascular Center, Head of the Neurological Department for the Treatment of Patients with Acute Disorders of Cerebral Circulation, Almazov National Medical Research Centre;

Sergeeva Tat'yana V., MD, PhD, Deputy Chief Physician for Neurology (Head of the Regional Vascular Center), Holy Martyr Elizabeth City Hospital.

НОВЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ АРТЕРИОВЕНОЗНЫХ МАЛЬФОРМАЦИЙ

Рожченко Л. В., Дрягина Н. В.

Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт имени профессора А. Л. Поленова — филиал ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Рожченко Лариса Витальевна,
РНХИ им. проф. А. Л. Поленова —
филиал ФГБУ «НМИЦ им.
В. А. Алмазова» Минздрава России,
ул. Маяковского, д. 12, Санкт-Петербург,
Россия, 191014.
E-mail: rozhch@mail.ru

Статья поступила в редакцию 16.09.2020
и принята к печати 12.10.2020

Резюме

Актуальность. Церебральные артериовенозные мальформации (АВМ) не являются статичными врожденными поражениями, а могут расти, рецидивировать и появляться de novo после полной резекции, эмболизации или радиохирургии. Понимание сложной молекулярной биологии АВМ имеет решающее значение для прогнозирования их поведения в процессе лечения и улучшения его результатов. **Цель.** Изучить динамику факторов ангиогенеза в процессе эмболизации церебральных АВМ для разработки стратегии их персонализированного лечения. **Материалы и методы.** В исследование включены 314 пациентов с АВМ, получавших хирургическое лечение в отделении хирургии сосудов мозга РНХИ им. проф. А. Л. Поленова. Определяли уровень сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), ангиопоэтина-2 (ANG-2) и матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) в сыворотке крови до и через 24 часа после эндоваскулярной эмболизации с использованием иммуноферментного анализа (Personal Lab, Adaltis, Italy). **Результаты.** Первичные пациенты с АВМ (48,4 %) продемонстрировали повышение VEGF, MMP-9, ANG-2. Высокий уровень VEGF и MMP-9 демонстрировали АВМ III градации по Spetzler-Martin, АВМ с геморрагическим типом течения, с глубоким характером дренирования, с афферентами из наружной сонной артерии. Возвращение к контрольным значениям всех повышенных факторов роста после тотальной эмболизации является подтверждением отсутствия потенции к рецидивированию АВМ. Отсутствие снижения факторов ангиогенеза после радикальной, по ангиографическим критериям, эмболизации является признаком субтотального выключения АВМ. **Заключение.** Сформулирована персонализированная концепция эмболизации у пациентов с высоким риском роста и рецидивирования.

Ключевые слова: ангиогенез, факторы ангиогенеза, церебральная артериовенозная мальформация, эмболизация.

Для цитирования: Рожченко Л.В., Дрягина Н.В. Новый подход к лечению церебральных артериовенозных мальформаций. Трансляционная медицина. 2020; 7 (5): 43-52. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-43-52

MODERN APPROACHES TO TREATMENT OF COMPLEX CEREBRAL ARTERIOVENOUS MALFORMATIONS

Rozhchenko L. V., Dryagina N. V.

Polenov Neurosurgical Institute, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Rozhchenko Larisa V.,
Polenov Neurosurgical Institute,
Mayakovskaya str. 12, Saint Petersburg,
Russia, 191014.
E-mail: rozhch@mail.ru

Received 16 September 2020; accepted
12 October 2020.

Abstract

Background. Cerebral arteriovenous malformations (AVMs) are not static congenital lesions, but can grow, recur, and appear de novo after complete resection, embolization, or radiosurgery. Understanding the complex molecular biology of AVMs is critical to predicting their behavior during treatment and improving treatment outcomes. **Objective.** To study the dynamics of angiogenesis factors in the process of cerebral AVM embolization in order to develop a strategy for their personalized treatment. **Design and methods.** The study included 314 patients with AVM who received surgical treatment at the Department of Brain Vascular Surgery of the Polenov Neurosurgical Institute. Determined the level of vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin-2 (ANG-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in blood serum before and 24 hours after endovascular embolization using enzyme-linked immunosorbent assay (Personal Lab, Adaltis, Italy). **Results.** Primary patients (48.4 %) with AVM showed an increase in VEGF, MMP-9, ANG-2. A high level of VEGF and MMP-9 demonstrated AVM III grades according to Spetzler-Martin, AVM with a hemorrhagic flow type, with a deep drainage pattern, with afferents from the external carotid artery. The return to control values of all elevated growth factors after total embolization confirms the lack of potency for AVM recurrence. The absence of a decrease in angiogenesis factors after radical, according to angiographic criteria, embolization is a sign of subtotal AVM shutdown. **Conclusion.** A personalized concept of embolization in patients with a high risk of growth and recurrence has been formulated.

Key words: angiogenesis, cerebral arteriovenous malformation, embolization, factors of angiogenesis.

For citation: Rozhchenko LV, Dryagina NV. Modern approaches to treatment of complex cerebral arteriovenous malformations. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020; 7 (5): 43-52. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-43-52

Список сокращений: АВМ — артериовенозная мальформация, ANG — ангиопоэтин, ММР — матриксная металлопротеиназа, VEGF — сосудистый эндотелиальный фактор роста.

Введение

Артериовенозные мальформации (АВМ) встречаются с частотой около 1,1 на 100 000 взрослого населения в год и являются не самым распространенным сосудистым заболеванием головного мозга

[1, 2]. Понимание необходимости изменения подходов к лечению пациентов с наиболее сложными, динамично развивающимися аномалиями развития сосудов головного мозга — церебральными артериовенозными мальформациями — обусловлено неутешительными результатами их хирургического лечения.

Современные хирургические, эндоваскулярные и радиохирургические методы лечения высокопоточных крупных АВМ сопровождаются относитель-

но высокой инвалидизацией и смертностью, поэтому целесообразна разработка новых клеточных и молекулярных биологических методов лечения. Текущая парадигма лечения АВМ не учитывает каких-либо особых факторов, связанных с генетикой или молекулярной конституцией конкретного пациента. Наступило время задуматься о том, что улучшение понимания механизмов роста АВМ может позволить нам изменить их естественное течение и оптимизировать тактику лечения [3, 4].

В НИЛ хирургии сосудов головного и спинного мозга РНХИ им. проф. А. Л. Поленова предложена концепция, направленная на выявление церебральных АВМ, склонных к росту (за счет неоангиогенеза) и рецидивированию, а также выявление пациентов с АВМ с повышенным риском церебральных кровоизлияний до оперативного вмешательства при выполнении многоэтапной эндоваскулярной эмболизации. Этот подход позволит скорректировать тактику хирургического лечения и расширить показания к оперативным вмешательствам (как открытым, так и эндоваскулярным) у пациентов с церебральными АВМ. В настоящее время мировой опыт изучения неоангиогенеза церебральных АВМ ограничивается экспериментальными исследованиями (в России вообще не проводится) и не применяется в планировании тактики хирургического лечения пациентов с АВМ, но собственный опыт свидетельствует о целесообразности более широкого изучения, внедрения и дальнейшей разработки данной методики.

Цель исследования: провести изучение динамики факторов ангиогенеза в процессе эмболизации церебральных артериовенозных мальформаций для разработки стратегии персонализированного эндоваскулярного лечения церебральных артериовенозных мальформаций, учитывающего индивидуальные молекулярные механизмы неоангиогенеза АВМ.

Материалы и методы

В отделении хирургии сосудов мозга РНХИ им. проф. А. Л. Поленова в крови 314 оперированных пациентов с церебральными АВМ и 33 здоровых добровольцев проводилось изучение уровня сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), ангиопоэтина-2 (ANG-2) и матричной металлопротеиназы-9 (MMP-9). Всем пациентам проводилась эндоваскулярная эмболизация церебральных АВМ с использованием клеевой (гистоакрил) и неадгезивной композиции (ONYX), эмболизации осуществлялись как из трансартериального, так и из трансвенозного доступа. Из 314 оперированных пациентов 249 было проведено от 2 до 7 этапов

внутрисосудистого лечения. Средний возраст пациентов составил $34,1 \pm 1,4$ года (от 18 до 64 лет), а здоровых добровольцев $33,9 \pm 2,5$ года (от 25 до 52 лет). Оценка первичного ангиогенного статуса (уровней ANG-2, VEGF и MMP-9) проводилась перед оперативным лечением (в день операции) и в динамике через 1 сутки после проведения эндоваскулярного вмешательства. Кровь пациентов забиралась из вены локтевого сгиба в вакуумную пробирку с активатором свертывания, центрифугировалась, при 2700 об/мин в течение 20 минут, затем сыворотка после аликвотирования отправлялась на хранение при температуре -20°C до исследования. Исследование концентрации VEGF, ANG-2 и MMP-9 проводилось на иммуноферментном анализаторе планшетного типа Personal Lab, Adaltis (Италия). Для определения VEGF использовались тест-системы Invitrogen (США), а для MMP-9 и Ang-2 применялись тест-системы R&D Systems (США). Для каждой тест-системы производитель в инструкции предложил референсные значения, полученные при исследовании крови 60 здоровых добровольцев. Нами для 33 здоровых добровольцев определены уровни VEGF — $271,2 \pm 41,1$ пг/мл, MMP-9 — $432,5 \pm 48,4$ нг/мл и ANG 2 — $2197,7 \pm 273,9$ пг/мл. Эти данные совпали с диапазоном референсных значений, полученных производителем тест-систем у здоровых добровольцев. Эти значения приняты нами в качестве контрольных. Факт превышения уровня факторов ангиогенеза в крови определялся по выходу пределов стандартного отклонения от результатов, полученных в группе здоровых добровольцев.

Результаты

Всем пациентам было проведено эндоваскулярное вмешательство. Средний уровень VEGF в сыворотке крови больных с церебральными АВМ до проведения оперативного вмешательства составил $349,0 \pm 22,9$ пг/мл; MMP-9 — $596,3 \pm 30,4$ нг/мл и ANG-2 — $2971,4 \pm 80,0$ пг/мл. Повышенный уровень хотя бы одного из исследованных факторов ангиогенеза выявлен у 152 (48,4 %) из 314 пациентов с АВМ, у остальных пациентов до операции все уровни факторов ангиогенеза не отличались от показателей у здоровых добровольцев. Повышение уровня VEGF обнаружено у 48 % (у 151 из 314 больных) и сохранение показателя в пределах контрольных значений у 163 пациентов, повышение уровня MMP-9 выявлено у 147 (46,8 %) пациентов, а повышение ANG-2 отмечено у 126 (40,1 %).

Не обнаружено связи повышения уровня факторов ангиогенеза с полом, возрастом, наличием сопутствующей патологии, локализацией АВМ (супра- и субтенториально расположенных). При

анализе ангиографической картины у 89 пациентов в структуре мальформации выявлено преимущественное дренирование в глубокие вены. При такой локализации дренажа у 54 (60,7 %) из них выявлено повышение факторов ангиогенеза: повышенный уровень VEGF обнаружен у 21 (38,9 %) из 54 пациентов, ANG-2 — у 22 пациентов (40,7 %) и MMP-9 — у 19 (35,2 %) больных.

Эпилептический тип течения АВМ демонстрировали 119 пациентов, кровоизлияния из АВМ выявлены у 172 пациентов, у 23 пациентов АВМ обнаружены при обследовании по поводу головной боли. Проанализирована связь между клиническим типом течения АВМ и уровнем факторов ангиогенеза. У 102 (59,3 %) из 172 пациентов с геморрагическим типом течения уровень MMP-9 оказался повышенными.

В представленной работе проанализированы данные 152 первичных (ранее не оперированных) пациентов, у которых выявлены до операции повышенные факторы ангиогенеза. В этой группе пациенты распределились следующим образом: 12 (7,9 %) больных с небольшими АВМ (Spetzler-Martin I–II), 98 (64,5 %) пациентов с АВМ III градации по Spetzler-Martin и 42 (27,6 %) больных с АВМ IV–V градации. Таким образом, наибольшее количество больных с высокими ростовыми факторами выявлено среди пациентов с АВМ III градации по Spetzler-Martin (64,5 %). В группах с небольшими АВМ (Spetzler-Martin I–II) и с большими и гигантскими АВМ (Spetzler-Martin IV–V) количество

пациентов с повышенными VEGF, MMP-9 было сопоставимым. В то же время у 19 (45,2 %) из 42 пациентов с большими и гигантскими АВМ (Spetzler-Martin IV–V) был выявлен повышенный уровень ANG-2, что оказалось почти в два раза чаще, чем у больных с небольшими АВМ (Spetzler-Martin I–II) — у 3 (25 %) из 12 пациентов. Эти данные согласуются с результатами, обнаруженными при анализе структуры дренирования АВМ: повышенный уровень ANG-2 отмечен у 40,7 % пациентов с наиболее часто встречающимся при больших и гигантских АВМ глубоким типом венозного дренирования.

Проанализировано, как ведут себя повышенные факторы ангиогенеза после эмболизации в зависимости от градации мальформации по Spetzler-Martin. Анализирован каждый этап операции в отдельности. После частичной эмболизации у 2 (16,7 %) из 12 пациентов с небольшими АВМ (Spetzler-Martin I–II) был выявлен рост уровня MMP-9 выше дооперационного. В то же время в группе больных с АВМ III градации по Spetzler-Martin число пациентов с ростом уровня этого фактора после операции достигает 58,2 % (у 57 из 98 больных). Среди пациентов с АВМ IV и V градации по Spetzler-Martin повышение уровня MMP-9 продолжалось после операции у 24 (57,1 %) из 42 пациентов. В группе больных с небольшими АВМ (Spetzler-Martin I–II) после частичной эмболизации количество больных с продолжающимся ростом уровня VEGF составило 33 % (у 4 из 12 больных). В группе больных с АВМ

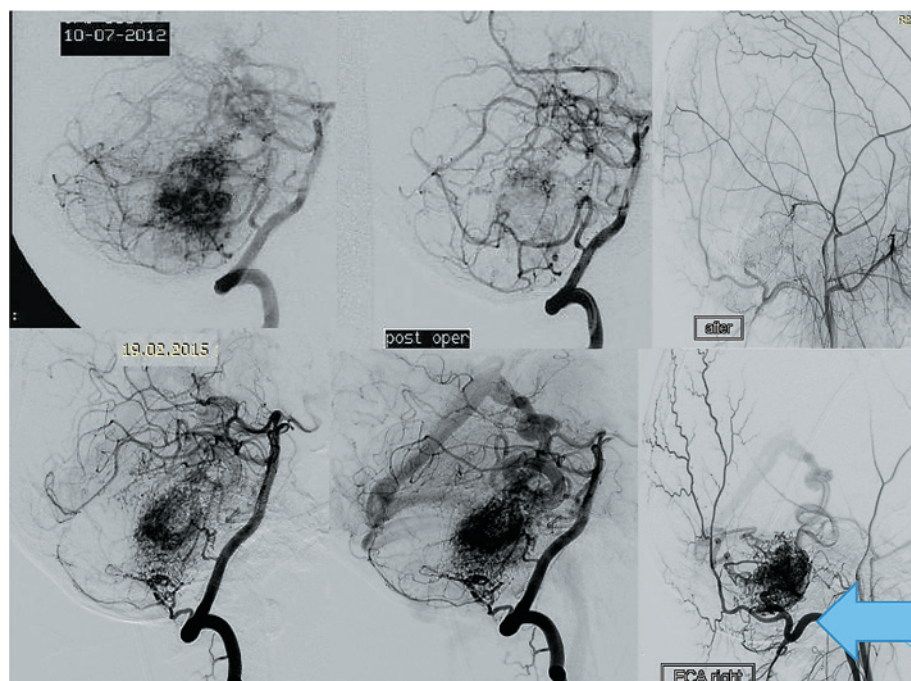


Рис. 1. Вертебральные ангиограммы больной Л., 19 лет, до, после операции и через 2,5 года после первого этапа. Появление заполнения АВМ из затылочной ветви наружной сонной артерии (стрелка)

III градации по Spetzler-Martin число пациентов с дальнейшим повышением этого фактора составляет 37,8 % (у 37 из 98 больных), в группах больных с большими и гигантскими АВМ (Spetzler-Martin IV и V) динамика была алогичной — 35,7 %.

У 47 (30,9 %) из 152 больных в кровоснабжении АВМ участвовала наружная сонная артерия. Повышенный уровень VEGF выявлен у 23 (48,9 %) из 47 пациентов, MMP-9 — у 19 пациентов (40,4 %) и ANG-2 — у 9 (19 %). В дальнейшем, при включении наружной сонной артерии в кровоснабжение АВМ между этапами эмболизации, еще у 36 из 139 пациентов с частично эмболизированными АВМ (у 13 из 152 больных АВМ выключена totally за 1 этап) обнаружен существенный рост уровней факторов ангиогенеза. На рисунке 1 представлены ангиографии до, после и через 2,5 года после операции на АВМ полушария мозжечка, демонстрирующие появление нового источника кровоснабжения АВМ из затылочной ветви наружной сонной артерии через 2,5 года после операции (указано стрелкой). Отмечено дальнейшее повышение в динамике факторов ангиогенеза между этапами операции: 09.07.2012 г. VEGF — $486,9 \text{ pg/mL}$ ($N 271,2 \pm 41,1 \text{ pg/mL}$), MMP-9 — $551,1 \text{ ng/mL}$ ($N 472,5 \pm 48,4 \text{ ng/mL}$), ANG-2 — 7287 pg/mL ($N 2797,7 \pm 273,9 \text{ pg/mL}$), а перед вторым этапом операции значительный прирост всех факторов: 18.02.2015 г. VEGF — $721,7 \text{ pg/mL}$ ($N 271,2 \pm 41,1 \text{ pg/mL}$), MMP-9 — $1227,6 \text{ ng/mL}$ ($N 472,5 \pm 48,4 \text{ ng/mL}$), ANG-2 — 8200 pg/mL ($N 2797,7 \pm 273,9 \text{ pg/mL}$).

Между этапами эмболизации при появлении этого нового афферента АВМ повышенный изначально уровень VEGF продолжал увеличиваться еще до повторной операции у 21 (58,3 %) из 36 пациентов, MMP-9 — у 15 пациентов (41,7 %) из 36 и ANG-2 — у 9 (25 %).

В зависимости от радикальности эмболизации 314 исследованных пациентов были разделены на подгруппы: 86 больным была выполнена totalная внутрисосудистая эмболизация АВМ с использованием различных эмболизатов и их комбинаций (оникс, гистаакрил), 228 пациентам произведена частичная внутрисосудистая эмболизация АВМ. Результат достигался за 1–7 этапов операции.

Проведен анализ динамики факторов ангиогенеза после каждого этапа операции в отдельности, в зависимости от выбранного эмболизата, в группе из 152 больных с повышением одного или нескольких факторов ангиогенеза. В этой группе 49 АВМ были totally эмболизированы, у 103 больных мальформации выключены частично. У 84 (55,3 %) из 152 пациентов произведена эмболизация АВМ с использованием неадгезивной композиции

(оникс); клеевой композицией (гистаакрилом) оперированы 68 (44,7 %) больных.

В группе больных эмболизированных ониксом у 9 (10,7 %) из 84 в результате операции за один этап достигнуто totalное выключение АВМ. При этом после операции наблюдалось снижение всех повышенных уровней факторов ангиогенеза до уровня контрольных значений. После частичного выключения АВМ отмечалось дальнейшее повышение уровня VEGF у 24 (33,8 %) из 71 пациента, а у 47 больных повышенный уровень после операции не продолжал увеличиваться. Дальнейший рост повышенного уровня MMP-9 выявлен у 28 (39,4 %) из 71 пациента, у 43 оставался на прежнем уровне, дальнейший рост повышенного уровня ANG-2 наблюдался у 13 (18,3 %) пациентов, в 58 случаях оставался практически неизменным. Таким образом, после каждого этапа частичной эмболизации АВМ ониксом дальнейший рост повышенных до операции одного или нескольких факторов ангиогенеза отмечен у 52 (77,7 %) из 71 пациента.

Повышение уровня факторов ангиогенеза после частичной эмболизации АВМ коррелировало с появлением на ангиограммах новообразованной сети сосудов (рис. 2). Больная К., 38 лет, исследование факторов ангиогенеза до и после частичной эмболизации свидетельствовали об отсутствии тенденции к их нормализации: до операции: 24.06.2015 г. VEGF — $912,5 \text{ pg/mL}$ ($N 271,2 \pm 41,1 \text{ pg/mL}$), MMP-9 — $403,4 \text{ ng/mL}$ ($N 472,5 \pm 48,4 \text{ ng/mL}$), ANG-2 — 3292 pg/mL ($N 2797,7 \pm 273,9 \text{ pg/mL}$), и после операции: 26.06.2015 г. VEGF — $792,4 \text{ pg/mL}$ ($N 271,2 \pm 41,1 \text{ pg/mL}$), MMP-9 — $518,4 \text{ ng/mL}$ ($N 472,5 \pm 48,4 \text{ ng/mL}$), ANG-2 — 4950 pg/mL ($N 2797,7 \pm 273,9 \text{ pg/mL}$). Через полгода после первого этапа отмечается продолжающийся рост факторов ангиогенеза в крови и появление новой мелкокачистой обслуживающей сети на ангиограммах: 22.10.2015 г. VEGF — $828,8 \text{ pg/mL}$ ($N 271,2 \pm 41,1 \text{ pg/mL}$), MMP-9 — $761,6 \text{ ng/mL}$ ($N 472,5 \pm 48,4 \text{ ng/mL}$), ANG-2 — 4018 pg/mL ($N 2797,7 \pm 273,9 \text{ pg/mL}$).

АВМ формируется на границе между артериальным и венозным руслом, там, где в норме залегают капилляры, и представляет собой конгломерат артерий и вен, формирующих сеть прямых артериовенозных шунтов с высокой скоростью кровотока, не соединенных капиллярами. Расширенные перинодальные капилляры (так называемые «giant bed capillaries») образует сложную систему вокруг АВМ. Доказана возможность сращения перинодальных капилляров в единый конгломерат, сообщающийся с АВМ, что является морфологическим резервом их роста.

Totalная эмболизация гистаакрилом за один этап выполнена 4 (5,9 %) из 68 пациентов, возвра-

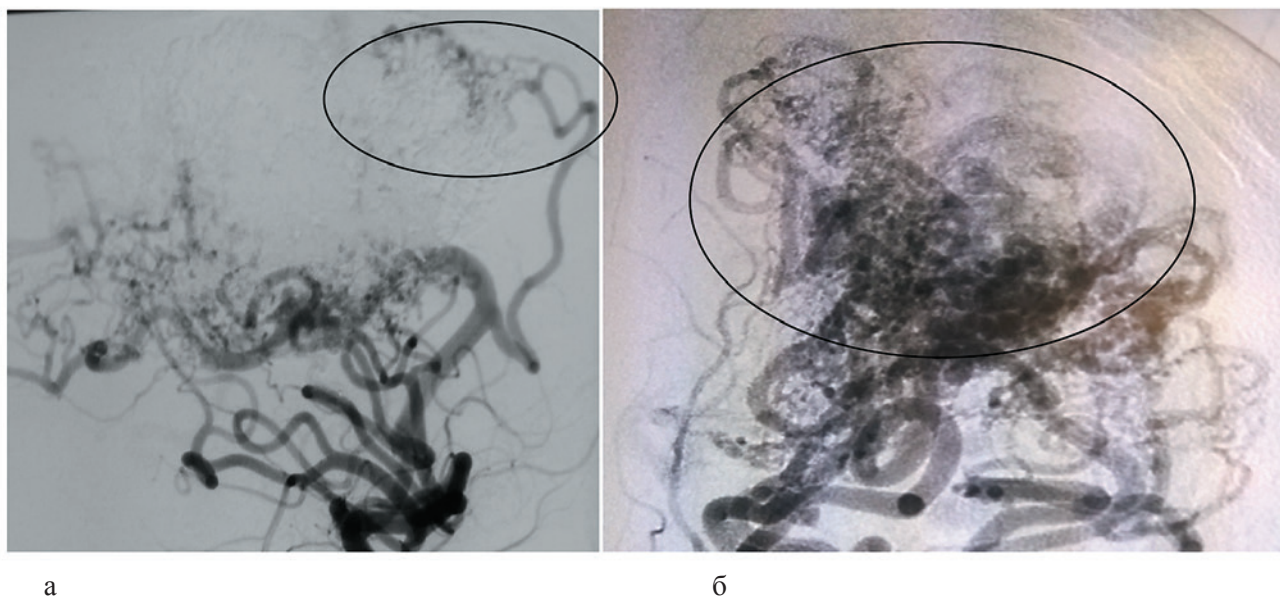


Рис. 2. Каротидные ангиограммы больной К., 38 лет, после первого этапа эмболизации АВМ правой лобной и теменной долей неадгезивной композицией (а), и через полгода после операции. Появление новой мелкоячеистой сети АВМ после частичной эмболизации и (б) через полгода после операции

шение уровня всех факторов ангиогенеза к контрольным значениям после операции также была получена. После каждого этапа эмболизации АВМ гистоакрилом отмечено дальнейшее нарастание уровня повышенных факторов ангиогенеза: VEGF у 19 (29,7 %) из 64 больных продолжал повышаться, у 45 пациентов оставался практически на дооперационном уровне, ANG-2 продолжал расти лишь у 8 (12,5 %) из 64 больных. А вот среди пациентов с повышенным до операции уровнем MMP-9 превышение дооперационного уровня MMP-9 после операции получено у 45,3 % (у 29 из 64 больных). Таким образом, после эмболизации гистоакрилом продолжался рост повышенных до операции одного или нескольких факторов ангиогенеза у 56 (87,5 %) из 64 пациентов. То есть наибольшую склонность к повышению после операции, вне зависимости от эмболизата, продемонстрировал MMP-9, что при эмболизации АВМ гистоакрилом выявляется более отчетливо.

Проанализированы результаты тотальной эмболизации церебральных АВМ у 86 из 314 пациентов. Для полного исключения АВМ понадобилось от 1 до 7 этапов эмболизации. Среди них 42 (48,8 %) пациента имели АВМ I–II градации по Spetzler-Martin, 40 (46,5 %) — АВМ III градации по Spetzler-Martin и 4 (4,7 %) — IV градации по Spetzler-Martin. Из 86 пациентов с тотально эмболизированными АВМ базовое повышение уровня одного или нескольких факторов роста выявлено до первой операции у 49 (56,9 %). У 13 из 49 пациентов с АВМ, тотально выключенной за 1 этап, уровень VEGF статистически

достоверно снижается ($p < 0,001$). У 30 из 49 пациентов с АВМ, тотально выключенной за 2–7 этапов, уровень VEGF после тотальной эмболизации также снижается ($p < 0,05$) (в этой группе сравнивались уровни факторов ангиогенеза до начала лечения с уровнями тех же факторов после тотальной эмболизации). В третьей группе (6 пациентов с АВМ III–IV градации по Spetzler-Martin), ангиографически тотально эмболизированных АВМ, уровень VEGF несколько нарастает. При дальнейшем анализе выявлено, что у этих больных говорить о тотальной эмболизации АВМ не приходится, так как при контрольной ангиографии, выполненной через 5–8 месяцев после операции, отмечается остаточное заполнение АВМ, потребовавшее повторной эмболизации. Таким образом, если на послеоперационной ангиографии мы видим полностью выключенную АВМ, а уровень VEGF после операции остается повышенным, то радикальность операции является сомнительной, обязательно требуется выполнение контрольной ангиографии через полгода для оценки остаточной порции АВМ. Отсутствие нормализации VEGF после эмболизации может являться критерием нерадикального выключения АВМ, а выявление АВМ, склонных к росту и повышенному риску кровоизлияний, является важным звеном в формировании оптимальной тактики хирургического лечения (выбор метода — эмболизации или удаление, частота повторных этапов госпитализации для хирургического лечения, индикация достоверности радикальности выключения АВМ).

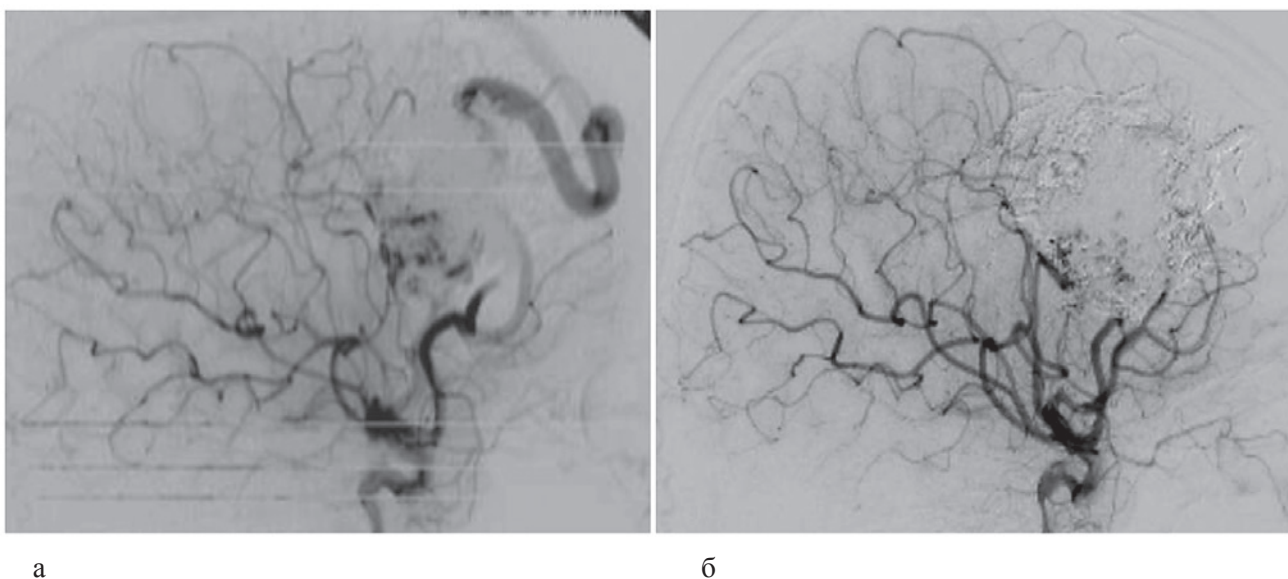


Рис. 3. Больной Д., 21 год. АВМ правой лобной доли, 5 этап эмболизации неадгезивной композицией:

а — правосторонняя каротидная ангиограмма до эмболизации, б — правосторонняя каротидная ангиограмма после эмболизации

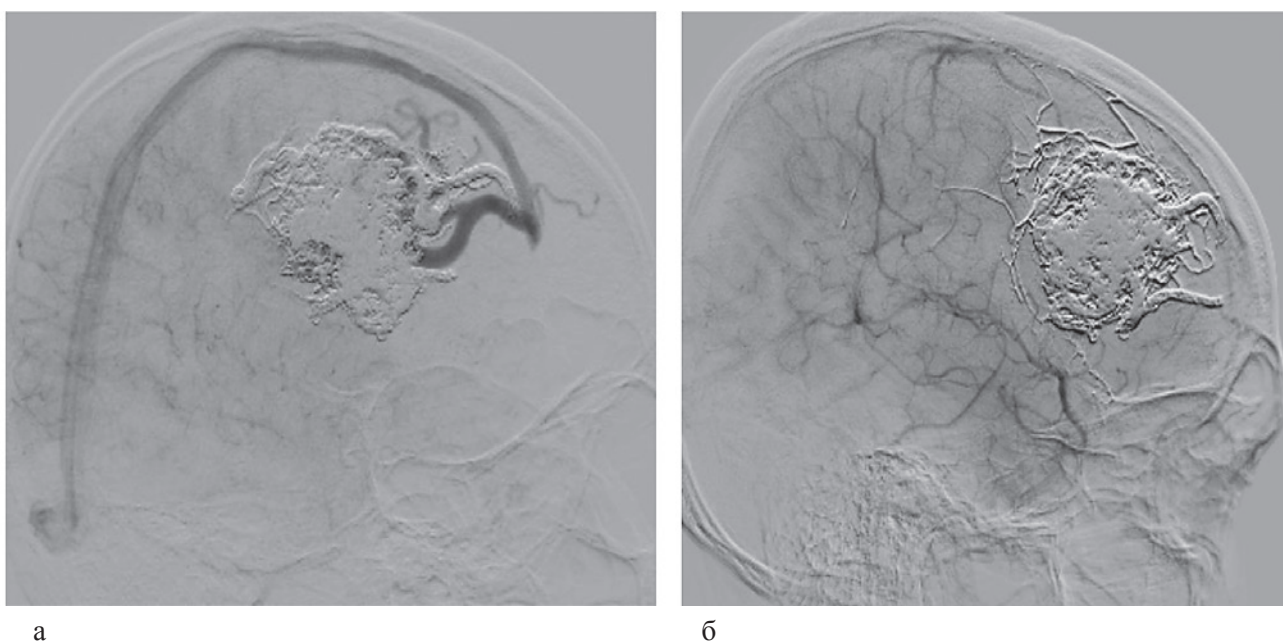


Рис. 4. Больной Д., 22 года. АВМ правой лобной доли, 6 этап эмболизации неадгезивной композицией:

а — правосторонняя каротидная ангиограмма до эмболизации, б — правосторонняя каротидная ангиограмма после эмболизации, заполнения АВМ после эмболизации нет

На рисунке 3 представлены каротидные ангиограммы до и после 5 этапа эмболизации АВМ правой лобной доли операции больного Д., 21 года. Исследование факторов ангиогенеза перед операцией 21.04.2017 г. продемонстрировало повышенный их уровень: VEGF — $516,4 \text{ pg/mL}$ ($N 271,2 \pm 41,1 \text{ pg/mL}$), MMP-9 — $405,5 \text{ ng/mL}$ ($N 472,5 \pm 48,4$

ng/mL), ANG-2 — 2744 pg/mL ($N 2797,7 \pm 273,9 \text{ pg/mL}$). По данным ангиографии в результате эмболизации АВМ исключена радикально. Однако исследование факторов ангиогенеза после операции (22.04.2017) продемонстрировало отсутствие нормализации их уровня, что свидетельствовало о сохранении функционирования АВМ и ее непол-

ноценном выключении: VEGF — 435,8 pg/mL (N 271,2 ± 41,1 pg/mL), MMP-9 — 478,5 ng/mL (N 472,5 ± 48,4 ng/mL), ANG-2 — 2525 pg/mL (N 2797,7 ± 273,9 pg/mL). Выявленное расхождение результатов оценки радикальности выключения АВМ (по данным нейровизуализации АВМ выключена totally, и по данным исследования факторов роста АВМ — сохранение функционирования АВМ) требовало обязательного проведения контрольной ангиографии.

При повторной госпитализации для контрольной ангиографии 15.01.2018 (8 месяцев после операции) исследованы факторы ангиогенеза. Сохранились повышенными уровни: 15.01.2018 г. VEGF — 465,2 pg/mL (N 271,2 ± 41,1 pg/mL) и MMP-9 — 498,3 ng/mL (N 472,5 ± 48,4 ng/mL), ANG-2 — 2725 pg/mL (N 2797,7 ± 273,9 pg/mL). На каротидных ангиограммах (рис. 4) выявлено остаточное заполнение фрагмента АВМ правой лобной доли, что потребовало проведения очередного этапа эмболизации, в результате которого достигнуто тотальное выключение АВМ.

Через сутки после операции отмечена нормализация уровня факторов ангиогенеза: 16.01.2018 г. VEGF — 261,3 pg/mL (N 271,2 ± 41,1 pg/mL), MMP-9 — 437,8 ng/mL (N 472,5 ± 48,4 ng/mL), ANG-2 — 2785 pg/mL (N 2797,7 ± 273,9 pg/mL).

Контрольная каротидная ангиография (исследована наружная и внутренняя сонная артерия справа) (рис. 5) 16.11.2018 г. (через 11 месяцев после операции) подтвердила радикальность выключения АВМ.

У всех пациентов с гиперэкспрессией факторов роста обнаружены ангиографические признаки образования новой патологической сосудистой сети АВМ после частичной эмболизации. Нормализация всех повышенных факторов роста после тотальной эмболизации является подтверждением отсутствия потенции к рецидивированию АВМ.

Обсуждение

Эмболизация с применением клеевых композиций позволяет обеспечить полную облитерацию клубка АВМ лишь у 10–20 % больных. Степень облитерации в основном определяется размером, ангиоархитектоникой АВМ и афферентных артерий. Эмболизация клеевой композицией решает тактические задачи: уменьшение объема АВМ и степени шунтирования крови, выключение участков мальформаций, потенциально опасных в отношении разрыва. Частичная эмболизация не снижает риска кровоизлияний, он остается равным 3 % в год. Реваскуляризация и реканализация АВМ после эмболизации отмечается в 12 % в течение первого года. Стойкие неврологические нарушения после эмболизации возникают у 12,8–25 % больных (легкие нарушения — в 72 %, стойкие выпадения — в 18 %), летальный исход — в 1,6–8 % случаев. Внедрение в клиническую практику неадгезивных эмболизирующих композиций (ONYX) и специальных технологий для их введения способствовало повышению радикальности внутрисосудистых вмешательств до 51–94 % [5]. Повышению радикальности эндоваскулярных эмболизаций АВМ,



Рис. 5. Больной Д., 22 года. АВМ правой лобной доли, контрольная ангиография после радикальной эмболизации АВМ неадгезивной композицией:

а — правосторонняя каротидная ангиограмма (наружная сонная артерия), б — правосторонняя каротидная ангиограмма (внутренняя сонная артерия), заполнения АВМ нет

оптимизации тактики из проведения и посвящено наше исследование.

В проведенном исследовании предпринято изучение молекулярных механизмов роста церебральных АВМ на фоне проводимой эндоваскулярной эмболизации, которые характеризовались изменением уровня факторов ангиогенеза — VEGF, MMP-9, AGP-2. Выявлено, что среди пациентов с геморрагическим типом течения АВМ чаще всего встречаются больные с повышением уровня MMP-9. Обнаруженные нами данные подтверждаются работами Starke R. M., et al. [6], выявившими, что уровни MMP-9 в плазме у больных с рвавшимися АВМ значительно выше по сравнению с АВМ без разрыва и продолжали увеличиваться сразу после операции.

При включении в кровоснабжение АВМ афферентов из наружной сонной артерии (то есть при появлении нового афферента АВМ и новообразованной сосудистой сети между этапами эмболизации) отмечается рост уровня сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) между этапами операции у 58,3 % (по сравнению с 27,7 % в группе без появления новых афферентов). Из 152 пациентов с повышенными до операции факторами ангиогенеза 98 (64,5 %) имели АВМ III градации по Spetzler-Martin. В нашей группе из обследованных 314 больных у 189 пациентов до операции не отмечалось повышения факторов роста, их анализ не входил в задачу данной публикации. Тем не менее следует отметить, что частота встречаемости пациентов с АВМ III градации по Spetzler-Martin в этой группе составила 74 (39,2 %) из 189 больных (почти в два раза реже). Среди пациентов с АВМ III градации по Spetzler-Martin отмечено самое большое количество больных (64,5 %) с высоким уровнем VEGF. Наиболее вероятно, что именно эта часть АВМ склонна к дальнейшему росту, так как сверхэкспрессия VEGF вызывает чрезмерное развитие аномальных кровеносных сосудов с нарушением специфичности эндотелиальных клеток (артериальных и венозных) и ухудшением конструкции стенки сосуда при образовании АВМ [7, 8]. В группах с небольшими АВМ (Spetzler-Martin I–II) и с большими и гигантскими АВМ (Spetzler-Martin IV–V) число пациентов с повышенными VEGF, MMP-9 был сопоставимым. В то же время почти в 2 раза чаще (у 45,2 % больных) выявлялся повышенный уровень ANG-2 при больших и гигантских АВМ (Spetzler-Martin IV–V) по сравнению с 25 % пациентов с небольшими АВМ (Spetzler-Martin I–II). Именно для пациентов с гигантскими мальформациями характерно наличие нескольких расширенных венозных дренажей, осуществляющих венозный отток в глубокие вены мозга. Полученные данные подтверждают, на наш взгляд, тот факт, что в периваскулярной

области вокруг больших и гигантских церебральных АВМ обнаружена сверхэкспрессия ANG-2, обеспечивающая формирование аномально расширенных вен без зрелой структуры стенок [9, 10].

Все же наиболее интересными явились результаты оценки показателей ангиогенного статуса в зависимости от радикальности проведенных эндоваскулярных вмешательств. Частичная эмболизация АВМ, независимо от эмболизата, ведет к дальнейшему повышению уровня MMP-9 у больных с большими и гигантскими АВМ, уровень VEGF у трети больных во всех группах по Spetzler-Martin продолжает нарастать, повышенный уровень ANG после операции повышается незначительно. Наличие феномена послеоперационного роста АВМ после частичной эмболизации объясняется, с одной стороны, наличием ангиографически негативного, скрытого компартмента АВМ, с другой стороны, тем, что у половины больных с АВМ существуют генетически предрасположенные механизмы роста, приводящие к образованию новых сосудов, активно принимающих участие в возобновлении кровоснабжения мальформации. Проведение тотальной эмболизации АВМ приводило к обратному результату: больных с повышенными показателями ангиогенных факторов после тотальной эмболизации вообще не было. Всем пациентам с тотально эмболизированными АВМ выполнена контрольная ангиография через 6–11 месяцев после завершения лечения, подтвердившая радикальность выключения АВМ. У 6 пациентов при послеоперационной ангиографии мы выявили полностью выключенную АВМ, а уровень VEGF через сутки после операции остался повышенным. При выполнении контрольной ангиографии через полгода обнаружено остаточное функционирование мальформации, потребовавшее еще одного этапа эмболизации. Таким образом, отсутствие нормализации факторов ангиогенеза после эмболизации может являться критерием нерадикального выключения АВМ.

Высокий уровень в крови VEGF, ANG-2 и MMP-9 у больных с церебральными АВМ может являться важным инструментом прогнозирования течения заболевания, определения риска кровоизлияния из АВМ, помогая в выборе оптимальной хирургической тактики. При выявлении повышенных уровней факторов ангиогенеза можно прогнозировать риск кровоизлияния в послеоперационном периоде и возможность роста АВМ между этапами эмболизации. Проводится сравнение в динамике уровней факторов ангиогенеза, полученных до, после операции и между этапами эмболизации (при многоэтапном лечении), а также клинко-рентгенологическое сопоставление (выявление новообра-

зованных сосудов, изменения афферентов, увеличения размеров АВМ). На основании этих данных планируется тактика дальнейшего лечения (объем эмболизации, выбор эмболизата, необходимость открытого удаления АВМ и радиохирургического лечения). На основании полученных данных нами проводится коррекция плана эндоваскулярного и микрохирургического лечения АВМ, оценка радикальности выключения их из кровотока. У всех пациентов с гиперэкспрессией факторов роста обнаружены ангиографические признаки образования новой патологической сосудистой сети АВМ после частичной эмболизации. Нормализация всех повышенных факторов роста после тотальной эмболизации является подтверждением отсутствия потенции к рецидивированию АВМ.

Заключение

Продолжение изучения молекулярных механизмов роста АВМ на фоне проводимого лечения позволит сформулировать новую концепцию эмболизации, показания и противопоказания, определить необходимую частоту проведения очередных этапов вмешательства, а также выбор эмболизата. Сочетание всех изучаемых технологических решений при эмболизации церебральных АВМ с детализацией биологических особенностей мальформации (выявление АВМ, склонных к росту или рецидивированию) позволит создать оптимальную стратегию хирургического лечения АВМ. Наши результаты подтверждают значимость роли ангиогенеза в патофизиологии АВМ головного мозга, так как дисбаланс факторов роста способствует прогрессированию и росту мальформаций. Сочетание всех изучаемых технологических решений при эмболизации церебральных АВМ с детализацией биологических особенностей мальформации (выявление АВМ, склонных к росту или рецидивированию) позволит создать оптимальную стратегию хирургического лечения АВМ, что делает возможным осуществление самых амбициозных и перспективных научных проектов в современной сосудистой нейрохирургии.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Parfenov V, Svistov D, Eliava SH, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of arteriovenous malformations of the central nervous system. M.: Assoциация нейрохирургов Rossijskoj Federacii, 2014. P. 47. In Russian [Парфенов В.Е., Свистов Д.В., Элиава Ш.Ш. и др. Клинические рекомендации по диагностике

и лечению артериовенозных мальформаций центральной нервной системы. М.: Ассоциация нейрохирургов Российской Федерации, 2014. С. 34].

2. Amin-Hanjani S. ARUBA results are not applicable to all patients with arteriovenous malformation. *Stroke*. 2014; 45 (5): 1539–1540.

3. Rozhchenko LV, Dryagina NV, Panuntsev VS, et al. Investigation of angiogenesis factors in cerebral arteriovenous malformations with different clinical pattern. *Rossijskij nejrohirurgicheskij zhurnal imeni professora A. L. Polenova*=Russian Neurosurgical Journal named after Professor A. L. Polenov. 2014; 4(1): 35–41. In Russian [Рожченко Л.В., Дрягина Н.В., Панунцев В.С. и др. Исследование факторов ангиогенеза при церебральных артериовенозных мальформациях с различным клиническим течением. Российский нейрохирургический журнал имени профессора А. Л. Поленова. 2014; 6 (1): 35–41].

4. Rangel-Castilla L, Russin JJ, Martinez-Del-Campo E, et al. Molecular and cellular biology of cerebral arteriovenous malformations: a review of current concepts and future trends in treatment. *Neurosurg Focus*. 2014; 37 (3): E1.

5. Chapot R, Stracke P, Velasco A, et al. The pressure cooker technique for the treatment of brain AVMs. *J Neuroradiol*. 2014; 41 (1): 87–91.

6. Starke RM, Komotar RJ, Hwang BY, et al. Systemic expression of matrix metalloproteinase-9 in patients with cerebral arteriovenous malformations. *Neurosurgery*. 2010; 66(2): 343–348.

7. Moftakhar P, Hauptman JS, Malkasian D, et al. Cerebral arteriovenous malformations. Part 1: cellular and molecular biology. *Neurosurg Focus*. 2009; 26 (5): E10.

8. Karamysheva A.F. The Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Moscow)*. 2008; 73 (7): 751–762. I

9. Chen W, Choi E-J, McDougall CM, et al. Brain arteriovenous malformation modeling, pathogenesis, and novel therapeutic targets. *Transl Stroke Res*. 2014; 5 (3): 316–329.

10. Hashimoto T, Lam T, Boudreau NJ, et al. Abnormal balance in the angiopoietin-tie2 system in human brain arteriovenous malformations. *Circ Res*. 2011; 89 (2): 111–113.

Информация об авторах:

Рожченко Лариса Витальевна, к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ хирургии сосудов головного и спинного мозга РНХИ им. проф. А. Л. Поленова — филиала ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Дрягина Наталья Владимировна, к.м.н., заведующая клинико-диагностической лабораторией с экспресс-группой РНХИ им. проф. А. Л. Поленова — филиала ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Rozhchenro Larisa V., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Surgery of the Vessels of the Brain and Spinal Cord, Polenov Neurosurgical Institute;

Dryagina Natalya V., PhD, Head of the Clinical Diagnostic Laboratory, Polenov Neurosurgical Institute.

ПАТОМОРФОЛОГИЯ АТИПИЧНОЙ ФОРМЫ ВРОЖДЕННОГО ГИПЕРИНСУЛИНИЗМА НА ПРИМЕРЕ ТРЕХ КЛИНИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ

Перминова А. А., Митрофанова Л. Б., Баиров В. Г.,
Сухоцкая А. А., Рыжкова Д. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Перминова Анастасия Аркадьевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
Email: aaperminova@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 14.08.2020
и принята к печати 11.10.2020.

Резюме

Актуальность. Врожденный гиперинсулинизм (ВГ) характеризуется персистирующей гипогликемией, приводящей к необратимому повреждению коры головного мозга. Атипичная форма ВГ (АВГ) остается практически неизученной. **Цель.** Описание гистологических и иммуногистохимических особенностей поджелудочной железы (ПЖ) при АВГ. **Материалы и методы.** Материал для исследования — фрагменты резецированной ПЖ 3 детей с АВГ возрастом 3, 6 и 7 месяцев. Контрольная группа — ПЖ 9 детей, умерших от пороков сердца. Ткань ПЖ окрашивалась гематоксилином и эозином, проводилась иммуногистохимическая реакция с антителами к хромогранину А, соматостатину и факторам транскрипции (ФТ) NeuroD1, Nkx2.2 и Isl1. **Результаты.** У всех пациентов наблюдались гиперплазированные островки Лангерганса, которые местами сливались друг с другом. У двоих пациентов поражение ограничивалось участком ПЖ, а у одного захватывало всю железу. У всех пациентов резко повышалась ($p < 0,01$) экспрессия NeuroD1 как в экзокринной, так и в эндокринной частях ПЖ в зоне поражения: в $79,0 \pm 23,4$ % эндокриноцитов и в $88,0 \pm 8,2$ % экзокриноцитов (в контроле $10,5 \pm 7,9$ % и $4,0 \pm 4,9$ % соответственно). Экспрессия хромогранина А и ФТ Isl1 и Nkx2.2 статистически значимо ($p < 0,01$) повышалась только в пораженных эндокриноцитах (хромогранин А — $62,3 \pm 15,4$ % эндокриноцитов, Isl1 — $82,0 \pm 4,6$ %, Nkx2.2 — $81,3 \pm 4,6$ %; в контроле — $39,4 \pm 7,9$ %, $30,2 \pm 16,2$ % и $26,4 \pm 11,9$ % соответственно). У двух пациентов наблюдалась тенденция к повышению количества соматостатин + эндокриноцитов. **Заключение.** АВГ морфологически очень гетерогенна. Как и другие формы ВГ, АВГ характеризовалась статистически значимым повышением экспрессии хромогранина А и ФТ NeuroD1, Nkx2.2, Isl1, а экспрессия соматостатина в целом оставалась неизменной.

Ключевые слова: атипичная форма врожденного гиперинсулинизма, врожденный гиперинсулинизм, гипертрофия ядер эндокриноцитов, иммуногистохимическое исследование, соматостатин, хромогранин А, Isl1, NeuroD1, Nkx2.2.

Для цитирования: Перминова А.А., Митрофанова Л.Б., Баиров В.Г. и др. Патоморфология атипичной формы врожденного гиперинсулинизма на примере трех клинических случаев. Трансляционная медицина. 2020; 7 (5): 53-61. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-53-61

PATHOMORPHOLOGY OF THE ATYPICAL FORM OF CONGENITAL HYPERINSULINISM ON THE EXAMPLE OF THREE CLINICAL CASES

Perminova A. A., Mitrofanova L. B., Bairov V. G.,
Sukhotskaya A. A., Ryzhkova D. V.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Perminova Anastasia A.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: aaperminova@yandex.ru

Received 14 August 2020; accepted 11
October 2020.

Abstract

Background. Congenital hyperinsulinism (CH) is characterized by persistent hypoglycemia, leading to irreversible damage to the cerebral cortex. The atypical form of CH (ACH) remains practically unexplored. **Objective.** Description of histological and immunohistochemical features of the pancreas in ACH. Design and methods. Material for research — fragments of the resected pancreas of 3 children with ACH aged 3, 6 and 7 months. Control group — pancreas of 9 children who died from heart malformations. Pancreatic tissue was stained with hematoxylin and eosin, an immunohistochemical reaction was performed with antibodies to chromogranin A, somatostatin, and transcription factors (TF) NeuroD1, Nkx2.2, and Isl1. **Results.** In all patients, numerous hyperplastic islets of Langerhans were observed, which in places merged with each other. In two patients, the lesion was limited to the pancreas area, and in one it covered the entire gland. All patients showed a sharp increase ($p < 0.01$) in the expression of NeuroD1 both in the exocrine and endocrine parts of the pancreas in the affected area: in 79.0 ± 23.4 % of endocrinocytes and in 88.0 ± 8.2 % of exocrinocytes (in the control 10.5 ± 7.9 % and 4.0 ± 4.9 % respectively). The expression of chromogranin A and TF Isl1 and Nkx2.2 increased statistically significantly ($p < 0.01$) only in affected endocrinocytes (chromogranin A — 62.3 ± 15.4 % of endocrinocytes, Isl1 — 82.0 ± 4.6 %, Nkx2.2 — 81.3 ± 4.6 %; in the control — 39.4 ± 7.9 %, 30.2 ± 16.2 % and 26.4 ± 11.9 % respectively). In 2 patients, there was a tendency to an increase in the number of somatostatin + endocrinocytes. **Conclusion.** ACH is morphologically very heterogeneous. Like other forms of CH, ACH was characterized by a statistically significant increase in the expression of chromogranin A and TF NeuroD1, Nkx2.2, Isl1, while the expression of somatostatin in general remained unchanged.

Key words: atypical form of congenital hyperinsulinism, chromogranin A, congenital hyperinsulinism, hypertrophy of endocrinocyte nuclei, immunohistochemical study, Isl1, NeuroD1, Nkx2.2, somatostatin.

For citation: Perminova AA, Mitrofanova LB, Bairov VG, et al. Pathomorphology of the atypical form of congenital hyperinsulinism on the example of three clinical cases. Translational Medicine. 2020; 7 (5): 53-61. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-53-61

Список сокращений: АВГ — атипичная форма врожденного гиперинсулинизма, ВГ — врожденный гиперинсулинизм, ПЖ — поджелудочная железа, ПЭТ-КТ — позитронно-эмиссионная компьютерная томография, ФТ — фактор транскрипции.

Введение

Врожденный гиперинсулинизм (ВГ) характеризуется развитием персистирующей гипогликемии,

которая приводит к необратимому повреждению коры головного мозга с последующей инвалидизацией больных [1]. Будучи гетерогенной патологией, ВГ является наиболее частой причиной персистирующей гипогликемии у детей грудного возраста. В то же время в понятие ВГ не входит гипогликемия, связанная с перинатальным стрессом, ятрогенными вмешательствами или генетическими синдромами, а также инсулинома [2]. В научных публикациях

до сих пор иногда встречаются устаревшие термины для обозначения ВГ, такие как незидиобластоз, персистирующая гиперинсулинемическая гипогликемия младенцев и идиопатическая спонтанно возникающая гипогликемия младенцев [3].

ВГ в европейской популяции встречается лишь у 1 из 40 000–50 000 новорожденных детей [4]. Однако в ближневосточных регионах, где распространены близкородственные браки, частота встречаемости этого заболевания может достигать 1:2500 [5].

Известно около 15 генов, мутации в которых могут приводить к развитию ВГ [6]. Наиболее часто патогенные мутации затрагивают гены *ABCC8* и *KCNJ11*, кодирующие компоненты АТФ-зависимого калиевого канала, нарушение работы которого в островках Лангерганса приводит к бесконтрольной секреции инсулина β -клетками и развитию персистирующей гипогликемии.

В зависимости от объема поражения выделяют очаговую, диффузную и атипичную формы ВГ [7, 8]. Для очаговой формы характерно поражение ограниченного участка поджелудочной железы (ПЖ) со сливанием островков Лангерганса вследствие аденоматозной гиперплазии β -клеток, для диффузной — гиперплазия островков Лангерганса с появлением в них гипертрофированных и гиперхромных ядер эндокриноцитов во всей ПЖ. В понятие атипичной формы ВГ входят все те случаи, патоморфология которых не укладывается в понятие очаговой и диффузной формы. Атипичной форме присущ морфологический мозаицизм: сосуществование уменьшенных в размерах и гиперплазированных островков Лангерганса, а также поражение части ПЖ без развития в этой области характерной для очаговой формы аденоматозной гиперплазии [9, 10]. При этом в гиперплазированных островках Лангерганса содержится больше проинсулина, чем инсулина, в то время как в маленьких островках наблюдается обратное соотношение [10]. По степени выраженности экспрессии инсулина островки Лангерганса при атипичной форме подразделяются на активные и покоящиеся. В последних находят повышенное количество соматостатин-позитивных δ -клеток, которые коэкспрессируют транскрипционный фактор *Nkx2.2* [8].

Известно, что различные варианты мутаций в генах *ABCC8* и *KCNJ11* ассоциированы с очаговой и диффузной формами ВГ [6]. Что касается атипичной формы, то для нее не установлены какие-либо четкие корреляции с определенными мутациями. Согласно имеющимся данным, к развитию атипичных форм ВГ может приводить внутритканевый мозаицизм (вследствие соматической

рекомбинации) и отцовская изодисомия при доминантных мутациях в гене *ABCC8* [9, 11].

Вместе с тем выявление того или иного морфологического варианта ВГ принципиально важно, поскольку разные его формы имеют не только разный потенциал к излечению, но и предполагают разный необходимый объем хирургического вмешательства [12]. Многим пациентам с атипичной формой для выздоровления оказывается достаточной парциальная панкреатэктомия, другим же требуется дополнительная медикаментозная коррекция [10].

Несмотря на успехи позитронно-эмиссионной компьютерной томографии (ПЭТ-КТ) с *18F-DOPA* в диагностике морфологических форм ВГ [13], окончательное подтверждение того или иного варианта возможно только при гистологическом исследовании, а срочное интраоперационное исследование замороженных срезов ПЖ представляет собой существенные трудности из-за нечеткой визуализации границ между ее экзо- и эндокринными элементами. Для дифференциальной диагностики между различными формами ВГ предлагается оценивать наличие увеличенных в размерах ядер эндокриноцитов, которые, как считают некоторые исследователи, характерны только для диффузной формы [7, 8].

Иммунофенотип ПЖ при ВГ исследован крайне мало. *NeuroD1* — транскрипционный фактор, участвующий в нейрогенезе [14]. Помимо нервной системы *NeuroD1* экспрессируется также в клетках-предшественниках ПЖ и задействован в процессе формирования островков Лангерганса [15]. Факторы транскрипции *Nkx2.2* и *Isl1* тоже участвуют в формировании эндокринных островков, а *Nkx2.2* еще и в дифференцировке их α -, β -, PP- и δ -клеток [16]. *Nkx2.2* может как активировать, так и подавлять экспрессию *NeuroD1* [17]. Окрашивание на хромогранин А в зачатке ПЖ становится положительным уже с 8-й недели гестации, в то время как инсулин и глюкагон в этих клетках еще не выявляются [18]. Что касается соматостатина, то он, как известно, ингибирует секрецию и глюкагона, и инсулина, но их взаимоотношения при ВГ остаются еще не до конца выясненными [19]. Недавно нами было установлено, что экспрессия *NeuroD1*, *Nkx2.2*, *Isl1* и хромогранина А повышается, а соматостатина — не изменяется как при диффузной, так и при очаговой формах ВГ [20]. Однако для атипичной формы ВГ подобные данные в литературе отсутствуют.

Патоморфология ВГ в целом на сегодняшний день остается малоизученной. В особенности это касается атипичной формы, детальное гистологи-

ческое описание которой до сих пор отсутствует.

Целью исследования было описание гистологических и иммуногистохимических особенностей ПЖ при атипичной форме ВГ.

Материалы и методы

Материалами для исследования послужили фрагменты резецированной ПЖ 3 детей (табл. 1) с гистологически подтвержденной атипичной формой ВГ. Возраст пациентов был 3, 6 и 7 месяцев. В качестве контроля использовался аутопсийный материал ПЖ 9 детей возрастом от 1 до 10 месяцев (средний возраст $3,2 \pm 2,9$ месяцев), умерших от декомпенсированных пороков сердца.

Двое из троих детей на момент рождения имели массу тела более 4 кг. У всех троих пациентов ВГ был диагностирован в течение первых суток жизни. В ходе предоперационной диагностики у двоих детей с макросомией были выявлены гетерозиготные мутации в гене ABCC8, а у одного ребенка — сочетание гомозиготной мутации в гене KCNJ11 и гетерозиготной мутации в гене HNF4A (табл. 1). По данным ПЭТ-КТ у всех троих было диагностирована фокальная форма ВГ, причем у двоих пациентов фокусы были одиночными и располагались в головке ПЖ, а у одного фокусов было несколько, и они находились в теле и хвосте.

В соответствии с данными интраоперационного гистологического исследования первому пациенту была выполнена проксимальная гемипанкреатэктомия (субтотальная резекция головки ПЖ), второму — субтотальная резекция 99 % ткани ПЖ,

а третьему — резекция тела и хвоста ПЖ. В послеоперационном периоде у ребенка, перенесшего субтотальную резекцию ПЖ, развился сахарный диабет и экзокринная недостаточность ПЖ, а также задержка психомоторного развития. У пациента, которому была выполнена резекция тела и хвоста ПЖ, впоследствии были диагностированы частичная экзокринная недостаточность ПЖ и задержка психомоторного развития.

Было выполнено гистологическое исследование с окрашиванием микропрепаратов ПЖ гематоксилином и эозином, а также иммуногистохимическое исследование с антителами к факторам транскрипции NeuroD1, Nkx2.2 и Isl1; к хромогранину А и соматостатину. В ходе морфометрического анализа производился подсчет экспрессирующих указанные маркеры клеток по отношению к общему количеству эндокриноцитов в поле зрения. В каждом микропрепарате было оценено по 10 полей зрения.

Статистический анализ проводился с помощью Statistica v.10 software (StatSoft, Russia). Значимость различий в количественных характеристиках интерпретировали с использованием t-критерия Стьюдента (для нормальных распределений) и с помощью критерия Манна–Уитни (в случае других типов распределения). Различия между группами были определены как статистически значимые при $p < 0,05$. Для оценки наличия связи между двумя переменными был применен ранговый корреляционный анализ Спирмена. Коэффициент корреляции (r) интерпретировался следующим образом: $r < 0,3$: слабая связь; $r = 0,3–0,5$: умеренная; $r = 0,5–0,7$:

Таблица 1. Клинические данные пациентов с атипичной формой ВГ

Пациент	Пол	Возраст, мес.	Масса тела при рождении, г.	ПЭТ-КТ	Генетическое исследование	Объем операции	Осложнения
№ 1	Ж	3	4300	Фокальная форма, фокус в головке	ABCC8 гетерозиготная с.1923+2T>A	Проксимальная гемипанкреатэктомия	—
№ 2	Ж	7	2260 (кесарево сечение на 37-й нед.)	Фокальная форма, фокус в головке	KCNJ11 гомозиготная с.1037C>T:р. A346V; HNF4A гетерозиготная с. 1321A>G:р. J441V	Субтотальная резекция 99 % ПЖ	Сахарный диабет, экзокринная недостаточность ПЖ, задержка психомоторного развития
№ 3	М	6	4220	В большей степени фокальная, фокусы в теле и хвосте	ABCC8 гетерозиготная с.3330–13G>A	Резекция тела и хвоста ПЖ	Частичная экзокринная недостаточность ПЖ, задержка психомоторного развития

Таблица 2. Данные иммуногистохимического исследования пораженных участков ПЖ при атипичной форме ВГ: доля эндо- или экзокринных клеток в поле зрения в пораженном участке ПЖ, экспрессирующих тот или иной иммуногистохимический маркер

Пациент	Часть ПЖ	NeuroD1 (%)	ChrA (%)	Isl1 (%)	Nkx2.2 (%)	Соматостатин (%)
№ 1	Эндо	93	55	78	84	13
	Экзо	95	2	6	5	3
№ 2	Эндо	52	52	88	84	47
	Экзо	90	2	10	8	2
№ 3	Эндо	92	80	80	76	30
	Экзо	79	5	6	6	1
Пациенты (n = 3), M±SD	Эндо	79,0 ± 23,4*	62,3 ± 15,4*	82,0 ± 4,6*	81,3 ± 4,6*	30,0 ± 17,0
	Экзо	88,0 ± 8,2*	3,0 ± 1,7	7,3 ± 2,3	6,3 ± 1,5	2,0 ± 1,0
Контроль (n = 9), M±SD	Эндо	4,0 ± 4,9	39,4 ± 7,9	30,2 ± 16,2	26,4 ± 11,9	22,3 ± 11,5
	Экзо	10,5 ± 7,9	3,1 ± 3,2	5,1 ± 5,3	4,1 ± 2,9	2,6 ± 1,4

Примечания: M — среднее арифметическое, SD — среднеквадратическое отклонение, * — разница статистически значима по сравнению с контролем при $p < 0,01$.

значимая; $r = 0,7-0,9$: сильная; и $r > 0,9$: очень сильная. Корреляция считалась положительной, если $r > 0$, и отрицательной, если $r < 0$.

Результаты

Гистологическое исследование

У пациента № 1 в головке ПЖ наблюдались многочисленные гиперплазированные островки Лангерганса, которые местами сливались друг с другом, показывая тем самым тенденцию к формированию аденоматозноподобных структур (рис. 1). Но при этом отсутствовал четко сформированный узел аденоматозной гиперплазии, который обычно наблюдается при классической очаговой форме ВГ [7]. В свою очередь, в отличие от диффузной формы ВГ, у пациента № 1 пораженный участок был ограничен головкой ПЖ, в то время как в хирургических краях резекции была неизменная экзо- и эндокринная ткань. Кроме того, в пораженных островках Лангерганса встречалось достаточно много эндокриноцитов с увеличенными в размерах ядрами: 5,3 клетки в поле зрения (3,21 % от общего количества эндокриноцитов).

Гистоархитектоника ПЖ у пациента № 2 была аналогичной таковой у пациента № 1 за исключением того, что поражение не ограничивалось каким-либо участком, а захватывало всю ткань ПЖ: во всех изученных срезах в островках Лангерганса выявлялись увеличенные в размерах ядра (в среднем 2,3 клетки в поле зрения или 2,85 % эндокри-

ноцитов, рис. 2). Но при этом, в отличие от диффузной формы ВГ, гиперплазированные островки местами сливались между собой, создавая видимость аденоматозного поражения.

У пациента № 3 увеличенные в размерах островки Лангерганса тоже местами сливались между собой, как у пациентов № 1 и 2, но при этом поражение носило мультифокальный характер: среди нормальной ткани ПЖ было обнаружено 2 участка со скоплением гиперплазированных эндокринных островков. Однако, в отличие от пациентов № 1 и 2, даже в пораженных зонах было обнаружено сравнительно мало клеток с увеличенными ядрами: в среднем 1,5 клетки в поле зрения (1,37 % эндокриноцитов).

Иммуногистохимическое исследование

Во всех трех случаях полученные данные были достаточно однородными (табл. 2).

У всех пациентов наблюдалось резкое повышение экспрессии транскрипционного фактора NeuroD1 как в экзокринной, так и в эндокринной частях ПЖ в зоне поражения (разница статистически значима по сравнению с контролем, $p < 0,01$): у пациентов с атипичной формой ВГ NeuroD1 выявлялся в 79,0 ± 23,4 % эндокриноцитов и в 88,0 ± 8,2 % экзокриноцитов, в то время как в нормальной ПЖ эти показатели составили 10,5 ± 7,9 % и 4,0 ± 4,9 % соответственно. При этом была обнаружена сильная положительная корреляция ($r = 0,932$;

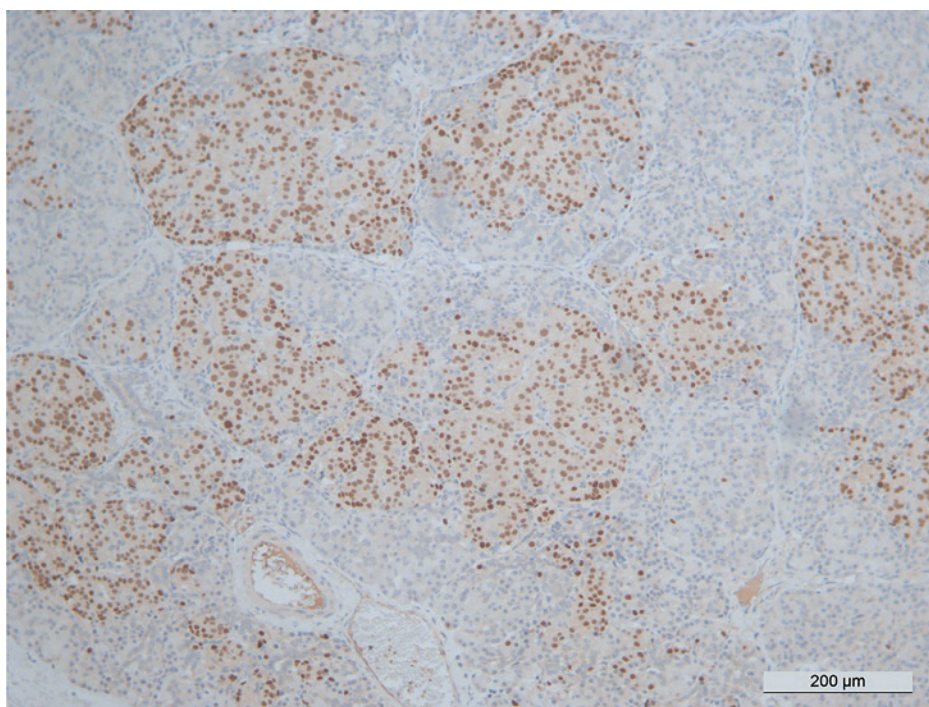


Рис. 1. Пациент № 1. Гиперплазированные островки Лангерганса, сливающиеся друг с другом. Иммуногистохимическая реакция с антителами к ISL-1, увеличение $\times 100$

$p < 0,01$) между количеством экспрессирующих NeuroD1 клеток между экзо- и эндокринной порциями ПЖ.

Экспрессия факторов транскрипции Isl1 и Nkx2.2, а также хромогранина А была статистически значимо ($p < 0,01$) выше только в пораженных эндокриноцитах, в то время как в экзокринной части ПЖ оставалась неизменной. У пациентов с атипичной формой ВГ иммуногистохимическая реакция на хромогранин А была положительна в $62,3 \pm 15,4$ % эндокриноцитов, на Isl1 — в $82,0 \pm 4,6$ %, а на Nkx2.2 — в $81,3 \pm 4,6$ %, тогда как в контроле хромогранин А экспрессировало $39,4 \pm 7,9$ % эндокриноцитов, Isl1 — $30,2 \pm 16,2$ %, Nkx2.2 — $26,4 \pm 11,9$ %. Кроме того, прослеживалась статистически значимая связь между степенью выраженности экспрессии хромогранина А и Isl1 ($r = 0,643$; $p < 0,05$); хромогранина А и Nkx2.2 ($r = 0,582$; $p < 0,05$); а также Isl1 и Nkx2.2 ($r = 0,942$; $p < 0,01$). Последняя корреляционная связь была очень сильной. Также наблюдалась статистически значимая ($p < 0,01$) связь экспрессирующих NeuroD1 эндокриноцитов с хромогранинном А, Isl1 и Nkx2.2 ($r = 0,822$; $r = 0,869$; $r = 0,878$ соответственно).

При иммуногистохимическом окрашивании на соматостатин не было обнаружено статистически значимой разницы между нормальной ПЖ и ПЖ пациентов с атипичной формой ВГ. Однако у двух пациентов наблюдалась тенденция к повы-

шению количества экспрессирующих соматостатин эндокринных клеток по сравнению с контролем. В обеих группах соматостатин-позитивные клетки выявлялись преимущественно по периферии островков Лангерганса.

Обсуждение

У двоих пациентов были обнаружены гетерозиготные мутации в гене ABCC8, которые, согласно данным литературы, характерны для очаговой формы ВГ [6]. Однако установлено, что доминантные мутации в гене ABCC8 могут быть причиной появления атипичной формы [9, 11]. Таким образом, нельзя исключить, что у изученных нами пациентов с гетерозиготным генотипом мутантный аллель имел доминантный тип наследования. Несмотря на гистологическую атипичность, которая не позволила отнести обнаруженные в ПЖ изменения к классической очаговой форме ВГ, у обоих пациентов пораженные участки захватывали лишь часть железы. Таким образом, в обоих случаях было оправдано произведение парциальной панкреатэктомии. И хотя у обоих пациентов часть ПЖ была сохранена, по крайней мере у одного из них в послеоперационном периоде развились осложнения в виде частичной экзокринной недостаточности и задержки психомоторного развития.

У пациента № 2 было выявлено сразу две мутации: гомозиготная в гене KCNJ11 и гетерозиготная

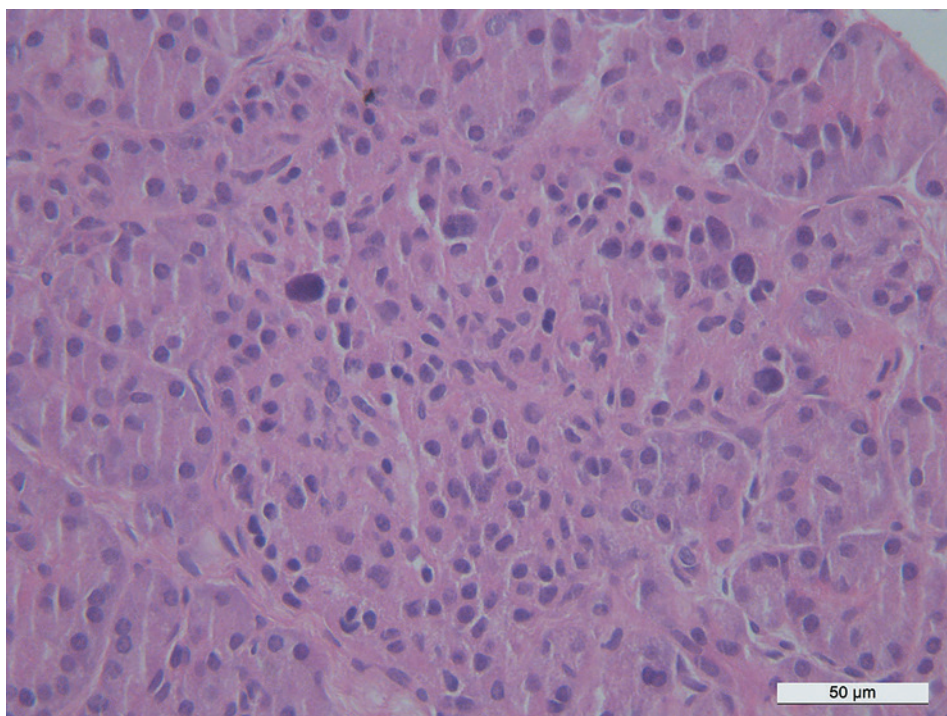


Рис. 2. Островок Лангерганса за пределами зоны аденоматозноподобной гиперплазии ц пациента № 2, окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$

в гене HNF4A. Как известно, изолированная гомозиготная мутация в гене KCNJ11 обычно приводит к возникновению диффузной формы ВГ [6]. Что касается мутации в гене HNF4A, то для нее на сегодняшний день не установлена связь с той или иной морфологической формой ВГ, однако известно, что ассоциированный с этой мутацией ВГ со временем может трансформироваться в MODY-диабет [21]. Возможно, что у данного пациента гомозиготная мутация в гене KCNJ11 обусловила диффузность поражения ткани ПЖ, а мутация в гене HNF4A явилась причиной появления атипичной гистоархитектоники.

В двух случаях из трех объем поражения ткани ПЖ был правильно установлен методом ПЭТ-КТ уже на предоперационном этапе. Однако у пациента № 2 был сделан вывод об ограниченности поражения, тогда как при морфологическом исследовании изменения, типичные для ВГ, захватывали всю железу. Причиной ложных результатов ПЭТ в данном случае, вероятно, послужил нехарактерный для диффузной формы аденоматозноподобный участок в ПЖ и, как следствие, гетерогенный захват ^{18}F -DOPA. Таким образом, несмотря на бесспорные успехи ПЭТ-КТ в предоперационной диагностике ВГ [13], неоднородность аккумуляции радиофармацевтического препарата при атипичных формах может стать причиной диагностических ошибок.

Гистологическое исследование ПЖ при ВГ требует тщательного изучения всего присланного операционного материала. Это связано с тем, что атипичная форма ВГ в отдельных зонах ПЖ по своей гистоархитектонике может напоминать как диффузную, так и очаговую формы [8, 9]. У всех трех пациентов нами были обнаружены гиперплазированные островки Лангерганса, местами сливающиеся между собой, но не формирующие четких аденоматозных фокусов, как при очаговой форме. При этом у одного больного поражение носило диффузный характер, а у двоих — ограниченный. Возможно, что у этих двоих пациентов пораженные участки ПЖ представляли собой «недоразвитые» очаги аденоматозной гиперплазии, которые впоследствии трансформировались бы в классические фокусы, характерные для очаговой формы ВГ.

Таким образом, в случае атипичной формы обнаружение в какой-либо части ПЖ аденоматозноподобного участка, представленного сливающимися между собой островками, может привести к ошибочному заключению об очаговом характере патологического процесса, а выявление гиперплазированных островков Лангерганса (хотя местами и сливающихся между собой) с крупными ядрами, наоборот, может навести на мысль о диффузной форме.

Как показывает практика, увеличенные в размерах ядра эндокриноцитов обнаруживаются не только при диффузной, но и при очаговой фор-

ме ВГ [20]. По данным наших исследований, количество клеток с крупными ядрами при очаговой форме ($n = 16$) составило $4,98 \pm 1,2$ клеток в п/зр ($1,81 \pm 0,48$ % эндокриноцитов), при диффузной ($n = 10$) — $3,86 \pm 1,55$ клеток в п/зр ($4,49 \pm 1,67$ % эндокриноцитов), а в контроле — $0,34 \pm 0,19$ клеток в п/зр ($0,44 \pm 0,24$ % эндокриноцитов). Таким образом, у пациента № 1 с атипичной формой ВГ количество эндокриноцитов с увеличенными ядрами было несколько больше, чем в среднем у пациентов с очаговой, и меньше, чем у пациентов с диффузной формами ВГ. Но что касается атипичной формы в целом, то, исходя из описанных нами наблюдений, этот признак нельзя считать надежным: у пациента № 1 увеличенные в размерах ядра эндокриноцитов в большом количестве встречались в пораженном участке, у пациента № 2 обнаруживались преимущественно за пределами аденоматозноподобной зоны, а у пациента № 3 — практически не встречались.

Вместе с тем, поскольку от объема поражения ткани ПЖ напрямую зависит объем операции и частота послеоперационных осложнений [12], верная диагностика той или иной морфологической формы ВГ чрезвычайно важна уже на этапах предоперационного обследования и интраоперационного срочного гистологического исследования. По данным немногочисленных исследований, у пациентов с атипичной формой для излечения часто оказывалась достаточной частичная панкреатэктомия [10]. Таким образом, атипичную форму (как и очаговую) необходимо отличать от диффузной, при которой всегда показана субтотальная панкреатэктомия.

Полученные данные иммуногистохимического исследования атипичной формы хорошо согласуются с нашими предшествующими исследованиями иммунофенотипа ПЖ при очаговой и диффузной формах ВГ, при которых было обнаружено статистически значимое повышение экспрессии факторов транскрипции NeuroD1, Nkx2.2 и Isl1, а также хромогранина А в эндокринной части ПЖ, а NeuroD1 — еще и в экзокринной. Что касается экспрессии соматостатина, то статистически значимое увеличение количества соматостатин-позитивных клеток выявлено не было, хотя у двоих из трех изученных нами пациентов и прослеживалась такая тенденция. Возможно, бóльшая выборка пациентов с атипичной формой ВГ позволила бы обнаружить эту, описанную некоторыми авторами, особенность иммунофенотипа [8].

Ограничением исследования явилась маленькая выборка пациентов. Такой размер выборки обусловлен редкостью ВГ в целом и его атипичной формы в частности.

Заключение

Атипичная форма ВГ гетерогенна как генетически, так и морфологически. В то же время, согласно полученным нами данным, ее иммуногистохимический профиль значимо не отличался от других форм ВГ. Как и другие формы ВГ, атипичная характеризовалась статистически значимым повышением экспрессии факторов транскрипции NeuroD1, Nkx2.2, Isl1 и хромогранина А, в то время как экспрессия соматостатина в целом оставалась неизменной. Несмотря на редкость атипичной формы, требуется ее дальнейшее полномасштабное исследование для оптимизации диагностического процесса и лечебной тактики.

Благодарности / Acknowledgments

Коллектив авторов благодарит за приготовление гистологических и иммуногистохимических препаратов лабораторного техника В. Г. Миренбург.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Menni F, de Lonlay P, Sevin C, et al. Neurologic outcomes of 90 neonates and infants with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia. *Pediatrics*. 2001; 107 (3): 476–479.
2. Lord K, De León DD. Hyperinsulinism in the Neonate. *Clin Perinatol*. 2018; 45 (1): 61–74.
3. Stanley CA. Advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in infants and children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87 (11): 4857–4859.
4. Otonkoski T, Ammala C, Huopio H, et al. A point mutation inactivating the sulfonylurea receptor causes the severe form of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy in Finland. *Diabetes*. 1999; 48 (2): 408–415.
5. Mathew PM, Young JM, Abu-Osba YK, et al. Persistent neonatal hyperinsulinism. *Clin Pediatr (Phila)*. 1988; 27 (3): 148–151.
6. Galcheva S, Demirbilek H, Al-Khawaga S, et al. The genetic and molecular mechanisms of congenital hyperinsulinism. *Front Endocrinol*. 2019; 10: 111.
7. Sempoux Ch, Guiot Y, Jaubert F, et al. Focal and diffuse forms of congenital hyperinsulinism: the keys for differential diagnosis. *Endocr Pathol*. 2004; 15 (3): 241–246.
8. Han B, Mohamed Z, Estebanez MS, et al. Atypical forms of congenital hyperinsulinism in infancy are associated with mosaic patterns of immature islet cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017; 102 (9): 3261–3267.
9. Houghton JA, Banerjee I, Shaikh G, et al. Unravelling the genetic causes of mosaic islet morphology in congenital hyperinsulinism. *J Pathol Clin Res*. 2020; 6 (1): 12–16.
10. Snider KE, Becker S, Boyajian L, et al. Genotype and phenotype correlations in 417 children with congenital

hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98 (2): E355–363.

11. Hussain K, Flanagan S E, Smith VV, et al. An ABCC8 gene mutation and mosaic uniparental isodisomy resulting in atypical diffuse congenital hyperinsulinism. *Diabetes.* 2008; 57 (1): 259–263.

12. Lord K, Dzata E, Snider KE, et al. Clinical presentation and management of children with diffuse and focal hyperinsulinism: a review of 223 cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98 (11): E1786–1789.

13. Ni J, Ge J, Zhang M, et al. Genotype and phenotype analysis of a cohort of patients with congenital hyperinsulinism based on DOPA-PET CT scanning. *Eur J Pediatr.* 2019; 178 (8): 1161–1169.

14. Pataskar A, Jung J, Smialowski P, et al. NeuroD1 reprograms chromatin and transcription factor landscapes to induce the neuronal program. *EMBO J.* 2016; 35 (1): 24–45.

15. Romer AI, Singer RA, Sui L, et al. Murine perinatal β -cell proliferation and the differentiation of human stem cell-derived insulin-expressing cells require NEUROD1. *Diabetes.* 2019; 68 (12): 2259–2271.

16. Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology.* 2005; 146 (3): 1025–1034.

17. Anderson KR, Torres CA, Solomon K, et al. Cooperative transcriptional regulation of the essential pancreatic islet gene NeuroD1 (beta2) by Nkx2.2 and neurogenin 3. *J Biol Chem.* 2009; 284 (45): 31236–31248.

18. Krivova YS, Barabanov VM, Proshchina AE, et al. Distribution of chromogranin A in human fetal pancreas. *Bull Exp Biol Med.* 2013; 156 (12): 839–842. In Russian [Кривова Ю.С., Барабанов В.М., Прошина А.Е. и др. Распределение хромогранина А в поджелудочной железе плодов человека. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013; 156 (12): 839–842].

19. Braun M. The somatostatin receptor in human pancreatic β -cells. *Vitam Horm.* 2014; 95: 165–193.

20. Mitrofanova LB, Hazratov AO, Galkovsky BE, et al. Immunohistochemical study of NeuroD1, Nkx2.2, Isl1 transcription factors, somatostatin and chromogranin a in different forms of congenital hyperinsulinism. *Molecular medicine.* 2020; 18 (1): 36–47. In Russian [Митрофанова Л.Б., Хазратов А.О., Гальковский Б.Э. и др. Иммуногистохимическое исследование факторов транскрипции NeuroD1, Nkx2.2, Isl1, соматостатина и хромогранина А при различных формах врожденного гиперинсулинизма у детей. Молекулярная медицина. 2020; 18 (1): 36–47].

21. Stanik J, Skopkova M, Brennerova K, et al. Congenital hyperinsulinism and glycogenosis-like phenotype due to a novel HNF4A mutation. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017; 126: 144–150.

Информация об авторах:

Перминова Анастасия Аркадьевна, аспирант 1-го года, патологоанатомическое отделение, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Митрофанова Любовь Борисовна, д.м.н., главный научный сотрудник НИЛ патоморфологии, профессор кафедры патологии Института медицинского образования, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Баиров Владимир Гиреевич, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник НИЛ хирургии врожденной и наследственной патологии Института перинатологии и педиатрии, профессор кафедры хирургических болезней Института медицинского образования, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Сухоцкая Анна Андреевна, к.м.н., доцент, заведующий отделением детской хирургии пороков развития, Институт перинатологии и педиатрии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Рыжкова Дарья Викторовна, профессор РАН, д.м.н., главный научный сотрудник научно-исследовательского отдела ядерной медицины и тераностики Института онкологии и гематологии, руководитель научно-клинического объединения ядерной медицины, заведующий кафедрой ядерной медицины и радиационных технологий Института медицинского образования, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Perminova Anastasia A., 1st year Postgraduate Student, Pathology Department, Almazov National Medical Research Centre;

Mitrofanova Lubov B., MD, Dr. Sc., Chief Researcher of the Scientific Research Laboratory of Pathomorphology, Professor of the Department of Pathology, Almazov National Medical Research Centre;

Bairov Vladimir G., MD, Dr. Sc., Chief Researcher of the Scientific Research Laboratory of Surgery in Congenital and Genetic Diseases, Professor of the Department of Surgery, Almazov National Medical Research Centre;

Sukhotskaya Anna A., PhD, Associate Professor, Head of Pediatric Surgery Department, Almazov National Medical Research Centre;

Ryzhkova Daria Viktorovna, MD, Dr. Sc., Professor, Head of the Research And Clinical Unit for Nuclear Medicine, Chief Researcher at the nuclear Cardiology Research Laboratory, Almazov National Medical Research Centre.

СОВРЕМЕННАЯ КОНЦЕПЦИЯ НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ СТАРТА ПУБЕРТАТА И ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ. ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНОЙ СИСТЕМЫ КИССПЕПТИНА KISS/KISS1R

Никитина И. Л., Юхлина Ю. Н., Саракаева Л. Р., Плаксина А. О.,
Байрамов А. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:
Никитина Ирина Леоровна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: nikitina0901@gmail.com

Статья поступила в редакцию 24.09.2020
и принята к печати 12.10.2020.

Резюме

Актуальность. Система кисспептина играет ключевую роль в нейроэндокринной регуляции репродуктивной оси, механизмов старта пубертата и фертильности. Изучение фундаментальных принципов функционирования системы кисспептина позволит транслировать в клиническую практику новый терапевтический и диагностический подход к лечению гипогонадотропного гипогонадизма и задержки старта пубертата у детей. **Цель.** Оценка функциональной активности системы кисспептина и ее роли в генезе задержки старта пубертата. **Материалы и методы.** В экспериментальную часть исследования включено 53 особи крыс линии Wistar мужского пола. В клиническое исследование было включено 75 соматически здоровых мальчиков. Экспрессия рецепторов к кисспептину в центральных андрогензависимых тканях определялась иммуногистохимическим методом. Концентрацию рецепторов KISS1R и уровень кисспептина в плазме крови определяли методом ИФА. Определение уровня лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов и тестостерона в плазме крови проводилось хемилюминисцентным методом. **Результаты.** Выявлена отрицательная обратная связь между концентрацией кисспептина и тестостерона плазмы как в экспериментальном, так и в клиническом разделе исследования. Гипотестостеронемия приводит к значимому снижению количества кисспептиновых рецепторов в андроген-зависимых тканях. В условиях дефицита тестостерона в нейронах медиального аркуатного ядра гипоталамуса развиваются дегенеративно-дистрофические изменения, подвергающиеся частичному обратному развитию на фоне терапии тестостероном. Уровень кисспептина значимо повышается при задержке полового развития. Установлен пороговый уровень кисспептина в крови для прогнозирования задержки полового созревания — 16,9 пг/мл. **Заключение.** Полученные результаты указывают на важность трансляции их в клиническую практику с целью анализа кисспептиновой регуляции при центральных вариантах задержки полового развития.

Ключевые слова: гипогонадизм, гонадотропин-рилизинг гормон, кисспептин, мальчики, пубертат, тестостерон.

Для цитирования: Никитина И.Л., Юхлина Ю.Н., Саракаева Л.Р. и др. Современная концепция нейроэндокринной и эпигенетической регуляции старта пубертата и полового развития. Трансляционные исследования роли лиганд-рецепторной системы кисспептина KISS/KISS1R. Трансляционная медицина. 2020; 7 (5): 62-80. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-62-80

MODERN CONCEPT OF NEUROENDOCRINE AND EPIGENETIC REGULATION OF THE ONSET OF PUBERTY AND SEXUAL DEVELOPMENT. TRANSLATIONAL STUDIES ON THE ROLE OF THE KISS/KISS1R SYSTEM

Nikitina I. L., Yuchlina Y. N., Sarakaeva L. R., Plaksina A. O., Bayramov A. A.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Nikitina Irina L.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: nikitina0901@gmail.com

Received 24 September 2020; accepted
12 October 2020.

Abstract

Background. Kisspeptin system plays a fundamental role in the neuroendocrine control of hypothalamic-pituitary-gonadal axis, initiation of puberty and fertility. These observations suggest that kisspeptin system is a potential novel therapeutic and diagnostic approach for treating children with delayed puberty and hypogonadotropic hypogonadism and is currently a focus of translational research. **Objective.** Estimation of the functional activity of the kisspeptin system and its role in the genesis of delayed puberty. **Design and methods.** The experimental part of the study included 53 male Wistar rats. The clinical part of the study included 75 somatically healthy boys. The expression levels of kisspeptin receptors KISS1R in central androgen dependent tissues were evaluated by immunohistochemical method. Kisspeptin receptor levels and serum levels of kisspeptin were assessed by ELISA. Serum levels of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone were evaluated by chemiluminescent immunoassay. **Results.** A negative regulatory feedback was established between the concentration of kisspeptin and plasma testosterone both in the experimental and clinical parts of the study. Hypotestosteronemia leads to a significant decrease in the number of kisspeptin receptors in androgen-dependent tissues. Low testosterone levels cause degenerative-dystrophic changes in the neurons of the medial arcuate nucleus of the hypothalamus, which undergo partial regression during testosterone therapy. The level of kisspeptin significantly increases in individuals with delayed puberty. Serum kisspeptin levels exceeding 16.9 pg/ml is a reliable predictor of delayed puberty. **Conclusion.** Obtained results indicate the importance of translating them into clinical practice in order to substantiate novel diagnostic and therapeutic approach to the management of central forms of delayed puberty.

Key words: boys, gonadotropin-releasing hormone, hypogonadism, kisspeptin, puberty, testosterone.

For citation: Nikitina IL, Yuchlina YN, Sarakaeva LR, et al. Modern concept of neuroendocrine and epigenetic regulation of the onset of puberty and sexual development. Translational studies on the role of the KISS/KISS1R system. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020; 7 (5): 62-80. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-62-80

Список сокращений: AP — андрогеновые рецепторы, ГГГ-ось — гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось, ГнРГ — гонадотропин-рилизинг-гормон, ИМТ — индекс массы тела, ЛГ — лютеинизирующий гормон, МАЯ — медиальное аркуатное ядро, ФСГ — фолликулостимулирующий гормон, ХГЧ — хорионический гонадотропин человека, ЦНС — центральная нервная система, KISS1R — рецептор кисспептина, KNDy — нейроны системы кисспептин, нейрокинин В, динорфин.

Актуальность

Процесс функционального формирования репродуктивной системы является мультиэтапным, стартует в раннем эмбриогенезе и завершается по окончании периода пубертата полной анатомической и функциональной зрелостью, а также способностью к воспроизводству и поддержанию вида. Регуляторные механизмы, определяющие последовательность половой дифференцировки и достижение половой зрелости, являются предметом

продолжающихся исследований. В настоящее время хорошо изучены механизмы регуляторной активности иерархически расположенных отделов гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси (ГГГ-оси), клиническими проявлениями этапов активации и реактивации которой являются последовательные смены стадий полового развития. К последним относятся дифференцировка половой системы в эмбриогенезе, минипубертат в раннем возрасте после рождения, за которым следует так называемая «ювенальная пауза», сменяющаяся пубертатом с последующим формированием половой системы взрослого, способной к фертильности. Гормональные механизмы, определяющие смену данных этапов полового развития, представлены изменением пульсаторной секреции гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ) нейросекреторными ядрами гипоталамуса [1, 2]. При этом поиск регуляторов, влияющих на возраст, в котором возрастает секреция ГнРГ, на частоту и интенсивность его пульсаторных выбросов, продолжается и представляет важность для дальнейших исследований. Известно, что физиологический пубертат имеет значительные индивидуальные колебания в возрасте старта (женский пол — с 8 до 13 лет; мужской пол — с 9 до 14 лет), а также продолжительности. К числу нормальных вариантов пубертата могут быть отнесены поздний возрастной старт с быстрой прогрессией. Либо, напротив, раннее начало с различными по темпам сценариями прогрессии и достижения половой зрелости. Данные наблюдения привели к попыткам пересмотра возрастных норм физиологического старта пубертата некоторыми обществами детских эндокринологов (США и др.). Однако впоследствии данные рекомендации не нашли подтверждения, и были возвращены прежние сроки старта пубертата. Однако изучение регуляторных процессов, определяющих пубертатную реактивацию гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, продолжается. В исследованиях установлена секреция ГнРГ задолго до начала пубертата, что позволило предположить роль других факторов, кроме ГнРГ, в запуске его старта [3]. Значимым открытием последних лет является разработка новой концепции старта пубертата. Она основана на установлении роли иерархической транскрипционной активности генов, на которую влияет ряд эпигенетических факторов регуляции. Информационный сигналинг при этом реализуется посредством секреции нейротрансмиттеров и гормонов, передающих сигналы на область нейросекреторных нейронов гипоталамуса, секретирующих ГнРГ, запускающего, в свою очередь, гормональную гонадотропную регуляцию нижележащих отделов центральной нервной системы (ЦНС). [1, 2, 4, 5].

Согласно современным представлениям, поступление информации в ГнРГ-секретирующие нейроны гипоталамуса обеспечивается эпигенетическим контролем групп генов, обеспечивающих супрессию (активацию) транссинаптического межнейронального сигналинга кисспептиновых нейронов, синхронизированных с нейронами системы KNDy (динорфин, нейрокинин В, кисспептин). Супрессия либо активация секреции ГнРГ обеспечивается информацией, поступающей от одной из двух групп генов — Polycombgroup (PcG), транскрипционные ингибиторы и Trithoraxgroup (TrxG), транскрипционные активаторы, подвергающиеся эпигенетическому контролю (деацетилирование гистонов, не кодируемые микроРНК, гиперметилирование ДНК и др.). Преобладание информации с активаторной или супрессорной группы генов на секреторные нейроны, которые продуцируют кисспептин, включающийся в межнейрональный сигналинг в синхронизации с продуктами системы KNDy, определяет характер секреции ГнРГ нейронами гипоталамуса [4, 5]. Следует отдельно остановиться на роли лиганд-рецепторной системы кисспептина KISS/KISS1R, открытие которой имело революционное значение для расшифровки генеза нейроэндокринной регуляции репродуктивной системы. Система KISS/KISS1R включает ген кисспептина, который локализуется на длинном плече 1 хромосомы (1q32); его продуктом транскрипционной активности является гидрофобный белок (включающий 145 аминокислот), который может быть расщеплен в процессе протеолитического распада до белков с более низкой молекулярной массой — не теряющие биологической активности кисспептины 54, 14, 13 и 10. Рецептор кисспептина, в настоящее время обозначаемый KISS1R, является лигандом G-протеинового рецептора 54 (GPR54). Установлена локализация KISS1R в различных отделах ЦНС с наиболее высокой представленностью в перивентрикулярных и аркуатных ядрах гипоталамуса. В настоящее время кисспептины представляются ключевыми регуляторами секреции ГнРГ, однако осуществление эффективных глия-нейрональных и межнейрональных взаимодействий возможно только в ко-экспрессии генов системы KNDy [2, 4, 6].

В настоящее время продолжают исследования трансляционного характера, целью которых является дальнейшее изучение механизмов транссинаптической сигнальной передачи на разных регуляторных уровнях гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. Получены данные, что мутации с потерей функции в генах, кодирующих нейрокинин В (TAC3) и его рецептор (TAC3R), приводили к пубертатным нарушениям [7]. Согласно мнению

большинства исследователей, предполагается, что киспептин напрямую стимулирует секрецию ГнРГ через ГнРГ-содержащие нейроны, большинство из которых экспрессируют рецептор KISS1R. Представляются интересными данные о различной анатомической локализации нейронов, экспрессирующих KISS1 mRNA. В то время как KISS1-нейроны аркуатных (ARC) ядер показали негативную обратную связь, нейроны перивентрикулярных (AVPV) ядер гипоталамуса показали положительную обратную связь регуляции ГнРГ/гонадотропинов половыми стероидами [8].

Другие исследования показали, что киспептины могут участвовать в передаче сигналов от половых стероидов (андрогенов и эстрогенов), кроме того, транслировать информацию между лептином и ГнРГ-секретирующими центрами гипоталамуса, осуществляя таким образом процессы «прямой/обратной связи» в границах гонадной оси не только в центральных, но и в периферических отделах половой системы, и сигнализируя в вышеназванные центры об энергетическом балансе [9–11].

Представляют интерес исследования, уточняющие роль периферических систем (рецепции андрогензависимых тканей, половых стероидов) в осуществлении киспептинового сигналинга, направленного на осуществление связей в границах гонадной оси [12]. Так, фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ) оказывают воздействие на половые железы, что приводит к увеличению половых стероидов и, соответственно, влияет на физиологические и поведенческие изменения в период половой зрелости. Половые стероиды (эстроген и прогестерон у женщин и тестостерон у мужчин) стимулируют организующее и активирующее геномное воздействие на гипоталамические секс-диморфные центры. Продукты экспрессии генов в указанных гипоталамических центрах инициируют поведение по женскому или мужскому типу, что имеет большое значение для правильной сексуальной самоидентификации подростка. [12, 13]. Многие исследования показали значительную степень колокализации KND- и KISS1-нейронов с рецепторами стероидных гонадных гормонов (особенно андрогена AR и эстрогена ER α) [7, 14]. Однако уточнение большинства механизмов, опосредуемых киспептинами во влиянии на различные регуляторные процессы репродуктивной системы, а именно понимание роли данной системы как основного регулятора ГнРГ-секреции, трансммиттера сигналов либо сопутствующего участника данных процессов, является предметом активного исследовательского поиска [15]. Это представляется тем более важным в связи с увеличением количества фактических

данных о перспективе применения антагонистов и агонистов киспептинов для совершенствования технологий лечения разнообразных расстройств репродукции и полового развития [16–19]. Другим актуальным направлением является изучение возможностей применения киспептина в роли диагностического маркера патологии и терапевтического препарата для лечения центральных форм гипогонадизма и задержки старта пубертата. Опубликованы результаты исследований использования киспептина для лечения патологии, обусловленной расстройством секреции ГнРГ и гонадотропинов. Проводятся исследования по поиску оптимальных терапевтических схем применения киспептина в целях восстановления физиологической секреции гонадотропинов [20–23]. В исследовании Matsui H., et al. (2004) было изучено влияние метастина (киспептин-54), вводимого подкожно, на уровень гонадотропинов (фолликулостимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон) самцов и самок крыс. ФСГ и ЛГ повышались и индуцировали овуляцию у самок крыс препубертатного возраста. Сделан вывод о влиянии киспептина-54 на созревание гонад. У самцов крыс введение киспептина-54 также значительно повышало уровень гонадотропных гормонов в плазме крови. Нежелательных побочных эффектов зарегистрировано не было. [24]. Dhillon W. S., et al. (2005) установили, что что инактивирующие мутации гена рецептора киспептина KISS1R ассоциированы с несостоятельностью репродуктивной функции. Внутривенное введение киспептина-54 мужчинам добровольцам в течение 90 минут значительно повышало уровень ЛГ, ФСГ и тестостерона. Предложено рассматривать введение киспептина как новый метод влияния на активацию гонадной оси [25]. В работе George J. T., et al. (2011) были установлены дозозависимые эффекты киспептина-10 на стимуляцию ГнРГ при болюсном введении молодым мужчинам, при этом выявлена пороговая для увеличения ГнРГ доза (1 мкг/кг), превышение которой до 3 мкг/кг приводило к обратному эффекту — снижению ГнРГ, что предостерегает от использования высоких доз этого пептида. Эффекта «десенситизации» гонадотрофов при непрерывном подкожном введении киспептина получено не было [26]. Серьезно продвинулись в данной области Young J., et al. (2013), получившие данные о восстановлении функциональной активности гонадной оси при мутациях гена нейрокинина В (NKВ) и его рецептора при введении киспептина-10. Эффективность отмечена как при двукратном в день внутривенном болюсе препарата, так и при непрерывной подкожной инфузии киспептина в течение 3 дней. Резюмировано, что киспептин может быть рекомендован при

гипоталамической аменорее, хронической ановуляции. При повышении ЛГ (при синдроме поликистозных яичников) введение нейрокина В и антагонистов кисспептина может привести к снижению этого гонадотропина. Показано, что непрерывная подкожная инфузия кисспептина может эффективно восстанавливать пульсаторную секрецию ГнРГ при его эндогенной недостаточности [27].

Старт пубертата и его физиологическая прогрессия, завершающаяся достижением половой зрелости, является чрезвычайно значимым периодом для детей и подростков. Качество созревания репродуктивной системы в детстве определяет перспективу фертильности. Задержка старта пубертата, расстройства его динамического развития и гипогонадизм относятся к числу достаточно частых и весьма серьезных проблем как для выбора терапии, так и для прогнозирования репродукции. Рекомендуемые в настоящее время подходы к терапии не всегда имеют желаемый эффект, что определяет актуальность поиска новых терапевтических технологий.

Цель исследования

Проведение фундаментальных экспериментальных исследований по изучению механизмов регуляции полового созревания и трансляция их результатов в клиническую практику позволят расширить понимание патогенеза нарушений сигналинга при гипогонадотропном гипогонадизме и синдроме позднего пубертата. Также подобные исследования имеют целью оптимизацию существующих диагностических и терапевтических алгоритмов оказания помощи. В Институте эндокринологии Центра Алмазова в течение последнего десятилетия проводятся научные исследования, направленные на углубленное изучение механиз-

мов нейроэндокринной регуляции процессов пубертатной активации гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси как в физиологическом аспекте, так и при задержке старта пубертата центрального генеза. Исследования носят трансляционный характер, включают экспериментальные и клинические разделы и в целом имеют конечной целью оптимизировать вопросы диагностики и коррекции нарушений полового развития в пубертате. Ниже приводятся некоторые результаты проведенных нами исследований [28–32].

Материалы и методы

Экспериментальное исследование

Экспериментальная часть исследования проведена на лабораторных крысах линии Wistar мужского пола. Всего было включено 53 особи крыс в возрасте 2–3 дней. Все экспериментальные животные были разделены на 7 групп, по 6–8 особей в каждой. Возрастное экстраполирование было следующим: 1 месяц — допубертатный возраст, 2 месяца — возраст старта пубертата, в 4 месяца — половозрелые особи. Данные представлены в таблице 1.

Экспериментальный гипогонадотропный гипогонадизм был создан 2 способами:

1. Хирургическая модель создавалась путем односторонней гонадэктомии в раннем неонатальном периоде (4–5 день жизни) по стандартам экспериментальных физиологических исследований [Corbier P., et al. (1983); Bernhardt J. A., et al. (2007)]. Основана на том, что односторонняя гонадэктомия новорожденных самцов крыс в раннем постнатальном периоде (1–5 день от рождения) нарушает дифференцировку гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси ЦНС в возрасте «минипубертата» андрогенами [Мыслицкий В. Ф. (1990); Резников А. Г. (2007)].

Таблица 1. Группы экспериментальных животных

№ группы	Название группы	Возраст крыс, месяц	Количество особей, n
1	Хирургическая модель гипогонадизма	2	7
2	Хирургическая модель гипогонадизма	4	8
3	Комбинированная модель гипогонадизма	4	8
4	Хирургическая модель гипогонадизма с лечением тестостероном	4	8
5	Контроль допубертатного возраста	1	8
6	Контроль препубертатного возраста	2	7
7	Контроль половозрелые особи	4	6

Снижение организующей роли андрогенов на головной мозг ведет к нарушению формирования центров регуляции выброса гонадотропинов и к отсутствию гипофизарного ответа на низкий уровень андрогенов в постнатальном периоде развития животных [Corbier P., et al. (1983); Handa R. J. et al. (1985); Мыслицкий В. Ф. (1990); Шишкина И. В. (1984)]. Валидацию метода гипогонадотропного гипогонадизма проводили измерением в сыворотке крови половых гормонов и гонадотропинов (тестостерон, ЛГ и ФСГ) в двух- и четырехмесячном возрасте, которые соответствовали допубертатным значениям.

2. Комбинированная модель: части крыс хирургической модели был введен препарат гонадолиберина в пролонгированной форме (Трипторелин-депо) в дозе 0,29 мг на 100 г веса в возрасте достижения половой зрелости (4 месяца) [Filippi S., et al. (2002); Vignozzi L., et al. (2004); Morelli A., et al. (2004)].

В группе хирургической модели в возрасте 4 месяцев была выделена подгруппа из 8 особей крыс, которой был проведен курс введения препарата тестостерона пропионата в дозе 5 мг/кг/сут в течение 7 дней [Байрамов А. А. и др. (2006)]. На разных этапах эксперимента были забраны материалы центральных (головной мозг) и периферических (гонады, мышечная ткань, кровь) андрогензависимых тканей на разных сроках полового развития.

Морфологическое исследование проведено на срезах области медиального аркуатного ядра гипоталамуса (МАЯ). Проводился поиск интересующей области путем множественных пробных фронтальных срезов, зафиксированных в парафине образцов головного мозга, в проекции боковых желудочков на уровне bregma –3,6 мм под контролем микроскопии согласно стереотаксическому атласу [Paxinos G., et al. (1986)]. Производилось окрашивание срезов по Нисслию в площади 0,01 мм² правого и левого МАЯ у каждой особи. С учетом имеющихся в литературе данных классификации клеток определяли фенотип нейронов [Жаботинский Ю. М. (1965)]. Оценивались площадь и форма клеток, размер и расположение ядер, характер окрашивания клеточных структур, расположение клеток, наличие их скоплений. Морфометрию проводили с помощью программы Imagescope (Россия).

Экспрессия рецепторов к кисспептину KISS1R в центральных андрогензависимых тканях (МАЯ) определялась иммуногистохимическим методом с использованием поликлональных кроличьих антител KISS1R (Cloud-Clone Corp., Китай) в концентрации 200 µg/ml. Экспрессия рецепторов к тестостерону определялась с использованием мышиных

антител клон F3 (Cloud-Clone Corp., Китай) в концентрации 500 µg/ml. После проявления связанных антигенов диаминобензидином ядра клеток окрашивали гематоксилином Карацци. Определяли число и долю тел нервных клеток, различавшихся по степени экспрессии рецепторов KISS1R и к тестостерону. Срезы МАЯ изучали при помощи микроскопа Leica DME (Германия), фотографировали и осуществляли морфометрическое исследование, используя сканер Pannoramic-250 Flash III (Венгрия) и программу 3DHISTECH (Венгрия).

В периферических андрогензависимых тканях (гонады, мышцы) определяли концентрацию рецепторов к кисспептину (KISS1R). На этапе подготовки для получения гомогената образцы тканей были подвержены гомогенизации на криогенной мельнице CryoMill-2L (Retsch, Германия). Концентрацию рецепторов KISS1R в полученных супернатантах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа Synergy 2 (BioTek USA) с использованием Elisa kit набора [MBS 2021161 Test Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Kisspeptin Receptor (Kiss1R)].

Определение кисспептина в крови крыс проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа Synergy 2 (BioTek USA) с использованием Elisa kit набора [CSB-E1343rTestEnzyme-linkedImmunosorbentAssayKitForthe quantitative determination of rat kisspeptin-1 (KISS1)].

Морфологическое и иммуногистохимическое исследования проводились под руководством Дробленкова А. В., гистоморфолога, д.м.н., старшего научного сотрудника НИЛ детской эндокринологии Института эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Клиническое исследование

В исследование были включены 75 пациентов мужского пола. Они были разделены на три группы. Основную группу составили 22 соматически здоровых мальчика.

Критерии включения в основную группу:

1. Мужской пол.
2. Возраст старше 14 лет.
3. Отсутствие клинических признаков старта полового созревания, объем гонад менее 4 мл.
4. Допубертатные значения уровня ЛГ (<0,1 МЕ/л) и тестостерона (0,09–0,22 нмоль/л).
5. Информированное согласие на участие в данном исследовании.

Группы сравнения составили 2 группы практически здоровых мальчиков со стартом пубертата в физиологические сроки. Группа сравнения 1 была представлена 25 мальчиками 14–18 лет в ста-

дии Таннер III–V; группа сравнения 2 включала 28 мальчиков 6–10 лет в стадии Таннер I. Данные формирования групп представлены в таблице 2.

Проведен ретроспективный анализ анамнестических данных, полученных в беседе с пациентами и их родителями, а также при анализе предоставленной медицинской документации. Принимались во внимание факторы перинатального анамнеза, которые могли оказать влияние на гипоталамо-гипофизарно-гонадную ось, особенности течения беременности и родов. Проведен первичный клинический осмотр с оценкой соматического статуса по стандартной схеме клинического обследования. При антропометрическом обследовании производилось измерение роста при помощи механического ростомера ДИАКОМС, серия 0047585, закрепленного на стене с точностью до 0,1 см. Вес измерялся при помощи медицинских электронных напольных весов Масса-К, серия ВЭМ-150. Индекс массы тела (ИМТ) определялся по формуле = вес (кг)/рост × 2 (м). Оценивался в соответствии с референсными таблицами ВОЗ «WHO Reference» 2007. Оценка полового развития проводилась при

клиническом осмотре по общепринятой методике по шкале Таннер; объем тестикул оценивали с использованием орхидометра.

Лабораторные исследования были направлены на определение уровней ксисспептина в плазме крови с помощью иммуноферментного анализа с использованием набора Elisa для Kisspeptin 1 (KISS1) (CEC559Hu) (Cloud-Clone Corp). Определение уровня лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов и тестостерона в плазме крови проводилось хемилюминесцентным методом на анализаторе «Cobas E 411» (Roche, Швейцария).

Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010 для Windows. Выборки были проверены по гипотезам о нормальном распределении с использованием показателей асимметрии и эксцесса. Выборка для каждой группы крыс составила не менее 5 животных. Для оценки значимости влияния изучаемых факторов на полученный результат использовали метод однофакторного дисперсионного анализа.

Таблица 2. Характеристики пациентов, включенных в исследование

Группа	Количество пациентов, n	Возраст, n (лет)	Стадия полового развития по Таннер
Основная	22	14–17	I
Сравнения 1	25	14–18	III–V
Сравнения 2	28	6–10	I

Таблица 3. Сравнение перинатальных характеристик в различных группах

Характеристика	Основная группа задержки полового развития (n = 22)	Группа сравнения 1, Таннер III–V (n = 25)	Группа сравнения 2, Таннер I (n = 28)	P*
Преждевременные роды, %	0	0	10,7	0,11
Оперативные роды, %	27	23	25	0,98
Преэклампсия, %	35	29	33	0,90
Анемия во время беременности, %	18	14	25	0,63
Внутриутробная инфекция, %	6	5	4	0,94

Примечание: * — Тест Краскела–Уоллиса для всех групп.

Для сравнения пар показателей в группах опыта и контроля применяли непараметрический метод рангового сравнения — вычисление парного критерия Вилкоксона (W-критерий). Корреляционный анализ проведен с применением критерия корреляции Пирсона. Различия считали значимыми при вероятности ошибки менее 5 % ($p < 0,05$).

При анализе данных клинической части исследования использовалась описательная и аналитическая статистика. Сводная статистика была представлена в виде медианы и значений диапазона или процентов случаев с 95 % доверительными интервалами. При анализе данных использовался параметрический критерий Манна–Уитни, непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с попарными межгрупповыми посттестами Dunn и двусторонним ANOVA, а также критерий хи-квадрат с коррекцией Yates'. Чтобы скорректировать возможные смешивающие или модифицирующие эффекты нескольких факторов, была выполнена ANCOVA, в которой потенциальные счетчики были введены в модель в качестве ко-вариатов. Анализ под кривой (ROC) был выполнен для оценки возможности уровня киспептина в плазме крови быть критерием патологии. Различия считали значимыми при вероятности ошибки менее 5 % ($p < 0,05$). Корреляционный анализ проведен с применением критерия корреляции Пирсона. Для анализа данных использовалось программное обеспечение MedCalc для Windows, версия 18 (MedCalc Software, Остенде, Бельгия) [Schoonjans F. (2017)].

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России. До включения в исследование у всех было получено письменное информированное согласие.

Результаты

Результаты исследования представлены последовательно, в соответствии с экспериментальным и клиническим этапами.

Цель экспериментального этапа состояла в исследовании динамики изменений лиганд-рецепторной системы киспептина KISS/KISS1R в периферических и центральных андрогензависимых тканях у самцов крыс модели экспериментально индуцированного гипогонадотропного гипогонадизма. При анализе возрастных изменений уровня тестостерона в крови животных контрольных групп установлены различия в допубертатном возрасте, возрасте старта пубертата и достижении

половой зрелости [медиана (Me) тестостерона соответственно 5,99 нг/мл; 14,29 нг/мл и 20,02 нг/мл; $p < 0,01$], что было ожидаемым для данных стадий полового развития. Сделано заключение о закономерном повышении уровня тестостерона плазмы крови у здоровых самцов крыс при прогрессировании полового созревания, достигая максимального значения в возрасте 4 месяцев, соответствующем возрасту достижения половой зрелости.

Что касается количественных характеристик киспептиновых рецепторов в гонадах, то в группе интактных животных было отмечено их увеличение в зависимости от возраста. Так, изменения в тестикулах от возраста допубертата (1 месяц) к возрасту половой зрелости (4 месяца) составили 0,92 нг/мг/белка против 1,13 нг/мг/белка соответственно, $p < 0,01$. В скелетных мышцах подобных изменений получено не было. Даже в физиологических условиях с возрастом не происходило нарастание количества киспептиновых рецепторов (соответственно медианы в допубертате и периоде половой зрелости 0,12 нг/мг/белка и 0,11 нг/мг/белка; $p > 0,05$). При этом количество данной группы рецепторов как в отсутствие пубертата, так и в периоде полной половой зрелости в тестикулах было значимо выше, чем в мышцах ($p < 0,05$), свидетельствуя о физиологически более низкой представленности киспептиновых рецепторов в ткани скелетной мускулатуры, несмотря на ее принадлежность также к числу андрогензависимых тканей.

Таким образом, физиологическое распределение рецепторов киспептина было различным в гонадах и скелетных мышцах. В первых подтверждено статистически достоверное нарастание рецепторов односторонне с ростом тестостеронемии на фоне прогрессии полового развития, в скелетных же мышцах подобных изменений не было отмечено — количество их оставалось неизменным и значительно более низким по сравнению с гонадами.

Экспериментально индуцированный гипогонадизм приводил к снижению уровня тестостерона крови у половозрелых особей до допубертатных значений, статистически значимо отличавшихся от тестостеронемии в группе интактных животных соответствующего возраста (медианы 15,39 нг/мл в хирургической модели, 9,51 нг/мл в комбинированной модели против 20,02 нг/мл у интактных половозрелых особей, $p < 0,01$). Данные представлены на рисунке 1.

Концентрация рецепторов киспептина в гонадах экспериментальных групп гипогонадизма была значимо ниже, чем у половозрелых интактных крыс (Me соответственно 0,88 нг/мг/белка и 1,13 нг/мг/белка, $p < 0,05$). Плотность рецепторов

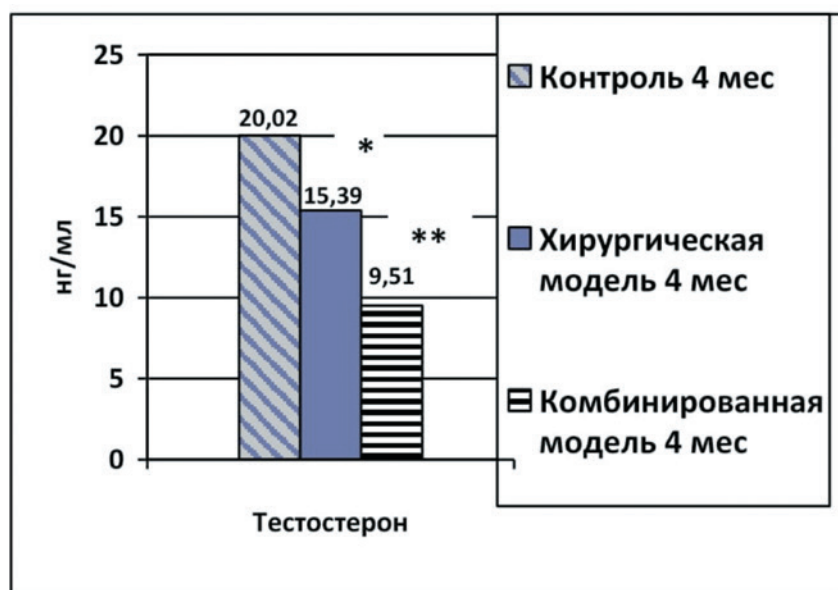


Рис. 1. Сравнительный анализ уровня тестостерона крови на модели гипогонадотропного гипогонадизма и здоровых половозрелых особей (нг/мл):

* — сравнение контроль (4 месяца) — хирургическая модель (4 месяца), $p < 0,01$; ** — сравнение контроль (4 месяца) — комбинированная модель (4 месяца), $p < 0,01$

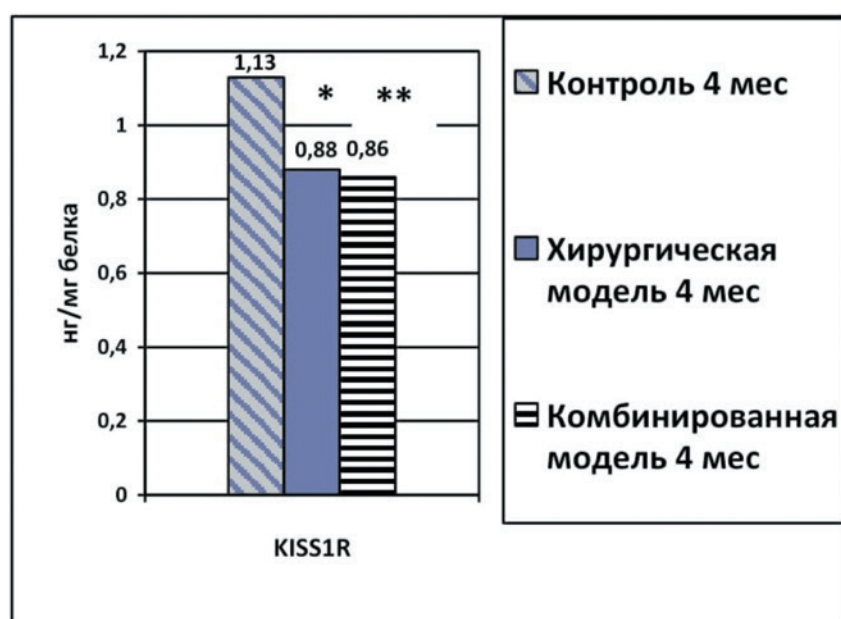


Рис. 2. Сравнительный анализ KISS1R в гонадах у самцов крыс с гипогонадотропным гипогонадизмом и группы контроля (4 месяца) (нг/мг белка):

* — сравнение контроль (4 месяца) — хирургическая модель (4 месяца), $p < 0,01$; ** — сравнение контроль (4 месяца) — комбинированная модель (4 месяца), $p < 0,01$

KISS1R в модели гипогонадизма (4 месяца) была сопоставима с таковой в группе контроля допубертатного возраста (1 месяц) (Me 0,88 нг/мг/белка против 0,92 нг/мг/белка, $p > 0,05$). Данные представлены на рисунке 2.

Различий в количестве рецепторов KISS1R в мышцах хирургической модели гипогонадизма и допубертатными, пубертатными интактными крысами (Me 0,1 нг/мг против 0,12 нг/мг; 0,18 нг/мг; $p > 0,05$) получено не было.

Значимые различия были получены в комбинированной экспериментальной модели гипогонадизма. Концентрация рецептора KISS1R была ниже в этой группе при сравнении как с интактными половозрелыми самцами (Me 0,06 нг/мг и 0,11 нг/мг соответственно; $p < 0,01$), так и при сопоставлении с хирургической моделью в 4 месяца (Me 0,06 нг/мг и 0,1 нг/мг; $p < 0,05$). Данные представлены на рисунке 3.

Было сделано заключение о влиянии выраженности гипотестостеронемии на снижение количества рецепторов KISS1R с исходно менее насыщенной ими мышечной ткани.

Что касается уровня ксипептина крови, то проведенный корреляционный анализ выявил сильную обратную связь между ксипептином и тестостероном как у здоровых особей, так и при гипогонадотропном гипогонадизме ($r = -0,99$; $p < 0,01$ в группе контроля, $r = -0,86$; $p < 0,05$ в модели гипогонадизма). Сделано заключение о разнонаправленном содержании ксипептина и тестостерона в крови независимо от их количественного уровня.

На фоне введения тестостерона отмечалось повышение его в плазме крови экспериментальных животных и достигало медианных значений 26,26 нг/мл, что было статистически выше таковых до начала лечения (15,39 нг/мл) ($p < 0,01$). При этом полученные значения превышали таковые в контрольных группах интактных самцов крыс половозрелого возраста (Me 26,26 нг/мл против Me 20,02 нг/мл в контроле; $p < 0,01$). Таким образом, терапия

тестостероном гипогонадотропного гипогонадизма в использованной схеме приводила к превышению физиологического уровня тестостерона.

Терапия тестостероном, несмотря на восстановление его уровня в крови до уровня половозрелых особей, не приводила к значимому увеличению количества KISS1R у четырехмесячных самцов крыс в гонадах и скелетных мышцах, которые оставались соответствующими таковым у особей, не вступивших в пубертат. Уровень ксипептина крови на фоне введения тестостерона также не изменялся.

На основании полученных данных сделано общее заключение, что терапия тестостероном не восстанавливала регуляторные взаимоотношения на уровне периферических андрогензависимых тканей, обеспечиваемых рецепторами ксипептина, несмотря на восстановление пубертатного уровня этого стероида в крови, по крайней мере в примененной дозе и схеме введения. Для уточнения возможностей заместительной терапии требуется продолжение исследований в данном направлении.

При изучении системы ксипептина KISS/KISS1R на модели экспериментально индуцированного гипогонадотропного гипогонадизма в центральной нервной системе у самцов крыс была выполнена морфологическая оценка нейронов медиального аркуатного ядра. Данные представлены на рисунке 4.

На этапе морфологического исследования был проведен анализ изменения строения нейронов, количества их патологических форм, простран-

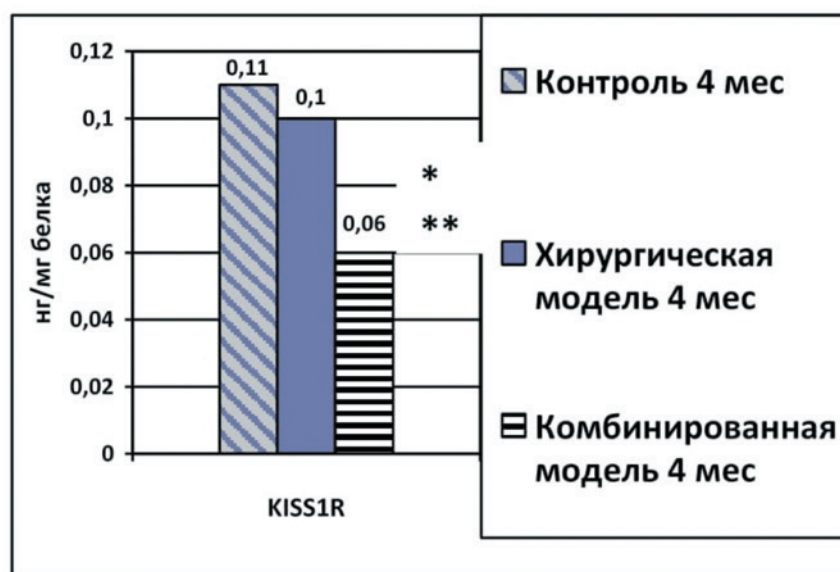


Рис. 3. Сравнительный анализ KISS1R в мышцах у самцов крыс с гипогонадотропным гипогонадизмом и группы контроля (4 месяца) (нг/мг белка):

* — сравнение хирургическая модель (4 месяца) — комбинированная модель (4 месяца), $p < 0,05$;

** — сравнение контроль (4 месяца) — комбинированная модель (4 месяца), $p < 0,01$

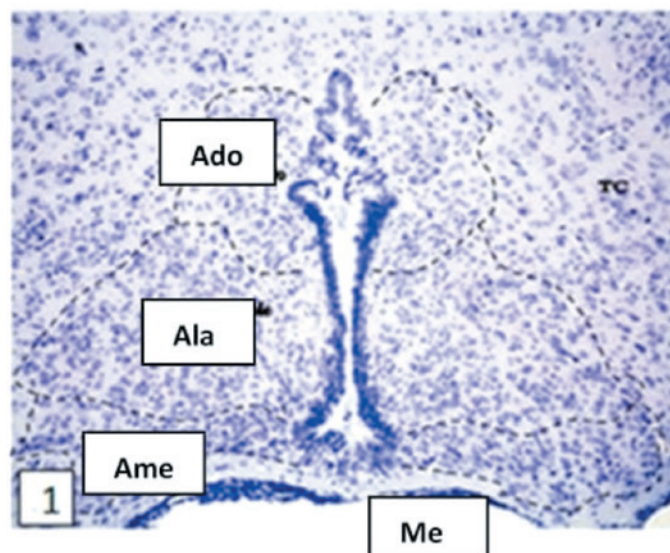


Рис. 4. Аркуатный ядерный комплекс. Сопоставление фронтальных срезов промежуточного мозга интактных половозрелых крыс с картами стереотаксического атласа головного мозга крыс (Paxinos G., Watson C.; 1998). Окраска методом Ниссля, ок. $\times 10$, об. $\times 10$:

Ado — аркуатное дорсальное ядро, Ala — аркуатное латеральное ядро, Ame — аркуатное медиальное ядро, Me — срединное возвышение

ственных глио-нейрональных и межнейрональных взаимоотношений в гипоталамических ядрах при гипогонадизме в сравнении с контрольной группой. Выявлено, что при гипогонадотропном гипогонадизме в 2 раза уменьшалась представленность неизмененных и малоизмененных клеток, площадь их также становилась значимо меньше по сравнению с контролем (рис. 5).

Отмечена тенденция к группированию клеток различной морфологии, где наряду с малоизмененными нейронами визуализировались значимо измененные (гиперхромные, сморщенные) жизнеспособные нейроны. Подобные изменения в клетках обусловлены необратимыми процессами атрофии/склероза. Также в группе гипогонадизма многократно увеличилось число гибнущих и погибших, или тeneвидных, клеток. В целом описанные изменения морфологии нейронов расценены как дегенеративные (рис. 6).

При моделировании гипогонадотропного гипогонадизма было установлено возрастание глиоцито-нейронального индекса, что, наряду со склонностью нейронов к группированию в условиях устойчивого снижения тестостерона, позволило расценивать изменения как компенсаторно-приспособительные. Известно, что, объединяясь в группы для более тесного контакта, глиоциты и нейроны способны обмениваться рядом жизненно важных микро- и макромолекул, таких как глюкоза, РНК, нейротрофический глиальный фактор, что в условиях развития дистрофических процессов может

трактоваться как компенсаторный механизм.

На этапе иммуногистохимического исследования были изучены изменения экспрессии андрогеновых (АР) и кисспептиновых рецепторов (KISS1R) в нейронах МАЯ у интактных животных и при гипогонадотропном гипогонадизме.

Все нейроны этой области экспрессировали рецепторы к андрогенам. У интактных половозрелых самцов крыс была отмечена преимущественно высокая степень экспрессии с некоторыми вариациями в зависимости от распределения рецепторов в проекции клеточных структур. Умеренная и слабая степень экспрессии имела место лишь в единичных нейронах. Напротив, в модели гипогонадотропного гипогонадизма, наряду с вышеописанными дистрофическими изменениями морфологии нейронов, также были установлены значимые отличия в экспрессии АР. Так, признаки выраженной экспрессии в нейронах МАЯ отсутствовали ($p < 0,05$); экспрессия АР большинством малоизмененных нейронов была расценена как умеренная. Доля нейронов со слабой экспрессией выросла в 8,6 раза ($p < 0,05$), также определялись тeneвидные клетки с экспрессией, градирующей как «очень слабая».

Измерение экспрессии рецепторов KISS1R в медиальном аркуатном ядре различных экспериментальных групп самцов крыс

Подобные изменения определялись и в отношении экспрессии рецепторов KISS1R в МАЯ. У интактных крыс были выявлены 2 группы нейронов:

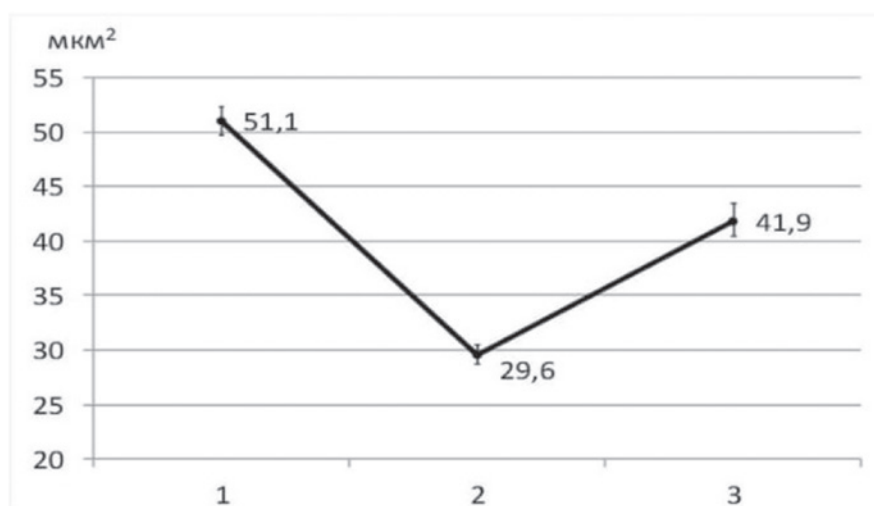


Рис. 5. Изменения площади тел малоизмененных нейронов при гипогонадизме (2) и заместительной терапии тестостероном (3) в сравнении с параметрами у интактных крыс (1). Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки. Различия между параметрами клеток значимы ($p < 0,05$)

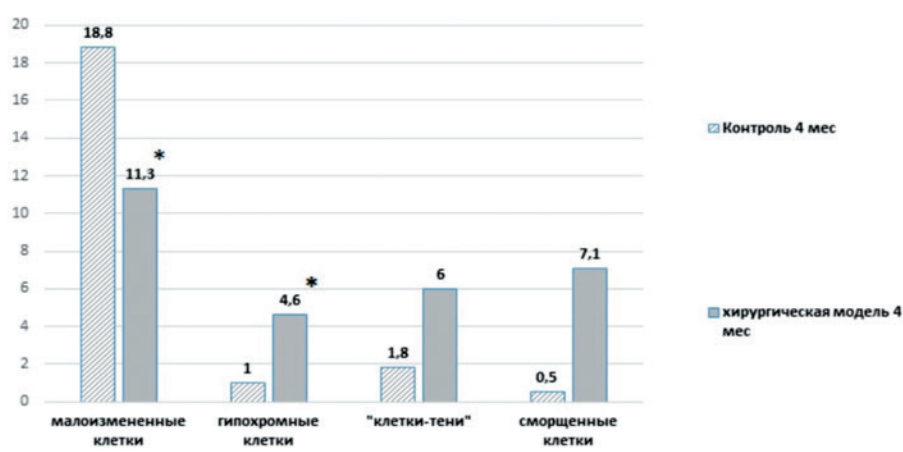


Рис. 6. Анализ соотношения нейронов различных видов в разных группах самцов крыс на площади 0,01 мм²:

* — сравнение с группой контроля, $p < 0,05$

с очень выраженной и слабо выраженной экспрессией KISS1R. В клетках с высокой экспрессией KISS1R локализовались в плазматической мембране и цитоплазме тел и в отростках, отходящих от тела данных клеток. В плазмолемме их экспрессия была непрерывной, а область экспрессии — более широкой, чем у клеток, имеющих низкую экспрессию KISS1R. Последние имели морфологические отличия, представленные меньшими размерами и более светлой окраской ядра и неправильной овальной или полигональной формой плазматической мембраны. Данные представлены на рисунке 7.

При гипогонадизме экспрессия рецепторов KISS1R существенно снижалась, проявляясь лишь на отдельных участках плазмолеммы и отсутствуя в цитоплазме нейронов (рис. 8).

Обобщая полученные результаты, было установлено, что при гипогонадотропном гипогонадизме, в условиях устойчивого дефицита тестостерона в нейронах МАЯ гипоталамуса развиваются дегенеративно-дистрофические изменения с точки зрения морфологии клеток, и снижение экспрессии андрогеновых и кисспептиновых рецепторов, с точки зрения функциональной активности клеток.

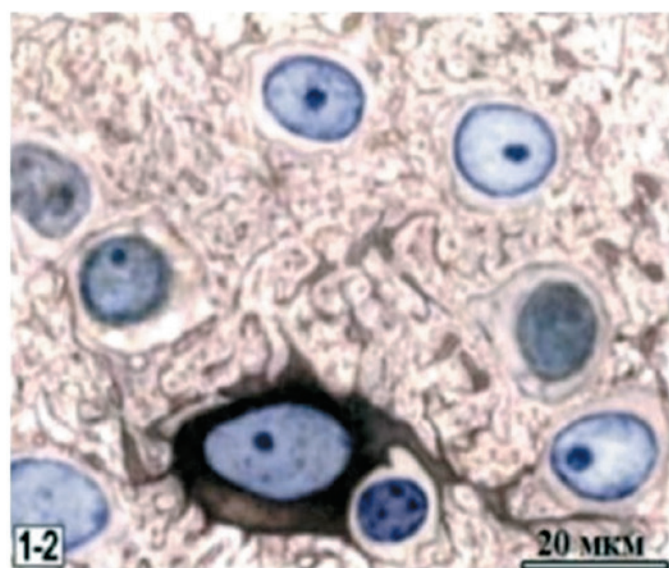


Рис. 7. Экспрессия рецепторов KISS1R в нейронах МАЯ гипоталамуса у здоровых половозрелых крыс. Окраска методом Ниссля, докрасивание ядер клеток гематоксилином, ок. $\times 10$, об. $\times 100$

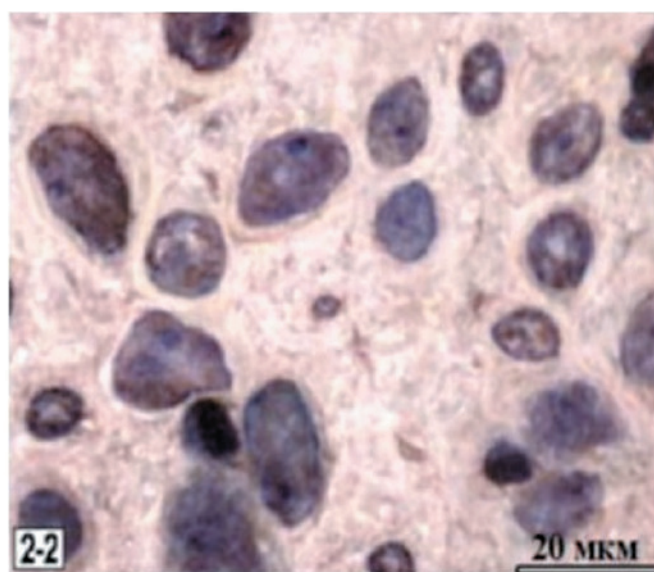


Рис. 8. Экспрессия рецепторов KISS1R в нейронах МАЯ гипоталамуса у крыс модели гипогонадотропного гипогонадизма в возрасте 4 месяцев. Окраска методом Ниссля, докрасивание ядер клеток гематоксилином, ок. $\times 10$, об. $\times 100$

При изучении гистоморфологических характеристик нейронов МАЯ на фоне введения тестостерона получены следующие результаты. Отмечалась позитивная динамика, выражавшаяся в увеличении площади малоизмененных нейронов в основном за счет хорошо выраженной цитоплазмы, а также в снижении тенденции к образованию групп. Однако число гибнущих и погибших клеток, равно как и глиоцито-нейрональный индекс, не претерпели значительных изменений. Степень экспрессии AP

и KISS1R частично восстанавливалась, выражаясь в статистически значимо большей доле нейронов с умеренной и выраженной экспрессией у гипогонадных крыс с лечением по сравнению с не лечеными особями.

Таким образом, введение тестостерона при гипогонадотропном гипогонадизме подвергает частичному обратному развитию дегенеративно-дистрофические процессы и частично восстанавливает интенсивность экспрессии андрогеновых и кис-

спептиновых рецепторов, однако не влияет на процесс гибели нервных клеток.

Анализируя итоги экспериментальной части исследования и транслируя полученные результаты в клиническую практику, следует подчеркнуть значимое негативное влияние устойчивого снижения уровня тестостерона при гипогонадотропном гипогонадизме на процессы ксиспептин-опосредованной регуляции полового развития, представленные уменьшением количества ксиспептиновых рецепторов в периферических андрогензависимых тканях, прогрессией дегенеративных морфологических и функциональных изменений в центральных отделах головного мозга, регулирующих активность репродуктивной системы, не полностью обратимых даже при восстановлении уровня тестостерона путем заместительной терапии. Полученные результаты обосновывают важность трансляции их в клиническую практику с целью анализа ксиспептиновой регуляции при центральных вариантах задержки полового развития для поиска и обоснования новых диагностических и терапевтических возможностей при данной группе патологии.

В клинический раздел исследования было включено 75 детей и подростков мужского пола. Были сформированы 3 группы мальчиков, различного

возраста: основная группа — 22 мальчика старше 14 лет с отсутствием вторичных половых признаков, допубертатным объемом тестикул и низким уровнем тестостерона и ЛГ $<0,01$ МЕ/л. Был проведен стимуляционный тест с трипторелином-депо, по результатам которого установлено, что в 6 случаях стимулированный пик ЛГ был ниже 10 МЕ/л, что подтверждало гипогонадотропный гипогонадизм. В 16 случаях максимальное значение ЛГ было выше 10 МЕ/л, что свидетельствовало о синдроме позднего пубертата. Уровень тестостерона у мальчиков с гипогонадотропным гипогонадизмом также, как у мальчиков с синдромом позднего пубертата, был низким, не имея значимых различий (медианы в подгруппах соответственно: 0,09 нмоль/л и 0,22 нмоль/л; $p = 0,11$). Поскольку основной идеей проводимого исследования являлось уточнение механизмов задержки полового развития центрального генеза, пациенты с гипогонадотропным гипогонадизмом и синдромом позднего пубертата были объединены в одну группу задержки полового созревания.

Группы сравнения были представлены мальчиками с физиологическим течением полового развития. Группа сравнения 1 — юноши в возрасте, сопоставимом с основной группой, от 14 до 17 лет,

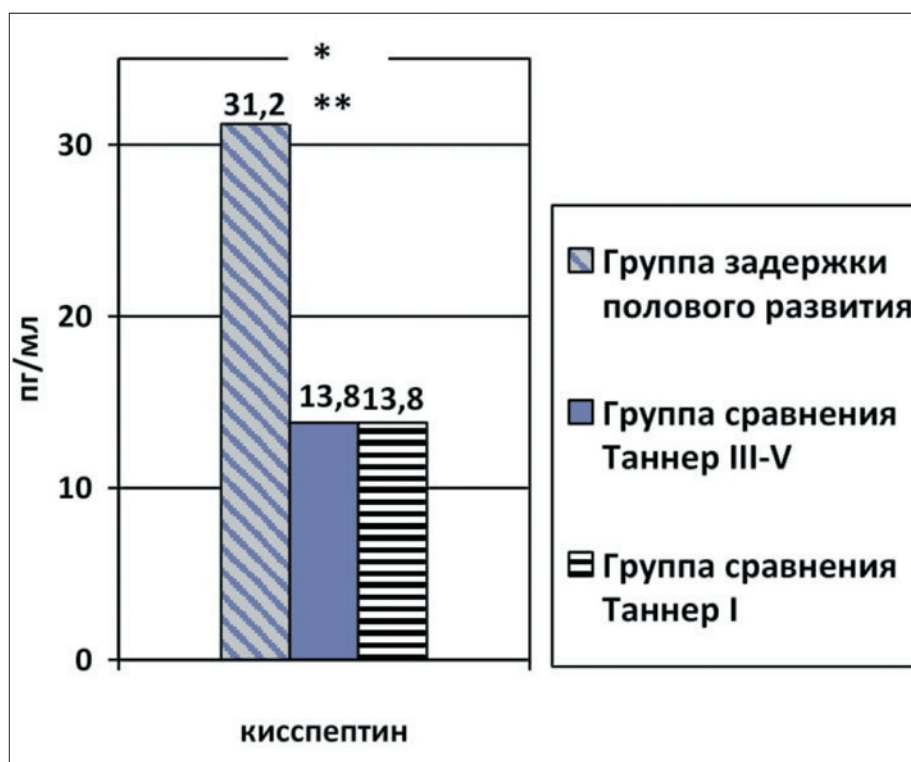


Рис. 9. Сравнительный анализ уровня ксиспептина плазмы крови в различных группах (пг/мл):

* — сравнение основной группы и группы контроля в стадии Таннер III–V ($p = 0,02$); ** — сравнение основной группы и группы контроля в стадии Таннер I ($p = 0,02$)

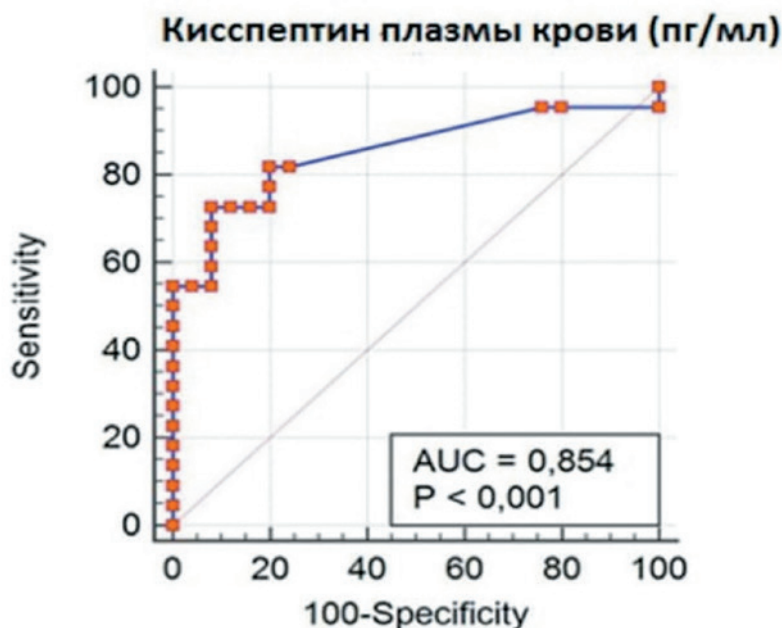


Рис. 10. ROC-анализ уровня киспептина плазмы крови в основной группе

имеющие физиологическое половое созревание (Таннер III–V), и группа сравнения 2 — мальчики, не имеющие старт пубертата в физиологически допустимые сроки, в возрасте от 8 до 10 лет (Таннер I). Все включенные в исследование дети и подростки не имели острой и тяжелой хронической соматической патологии, не принимали препараты, влияющие на стероидогенез.

При проведении сравнительного анализа факторов перинатального риска в группах не было установлено различий в частоте преэклампсии, анемии во время беременности, преждевременных и оперативных родов, внутриутробной инфекции ($p > 0,05$), что позволило сделать заключение о сопоставимости групп с точки зрения возможного негативного влияния на функциональную активность гипоталамо-гипофизарной системы в раннем периоде развития и актуальности поиска других причин различий в регуляции полового развития в сопоставимых по возрасту и другим факторам группах. Данные представлены в таблице 3.

При сравнении параметров физического развития на момент включения в исследование были установлены различия в параметрах роста — дети основной группы имели более низкое значение SDS роста (Me $-0,79$ SDS) при сравнении с группой сравнения 1 сопоставимого возраста (Me $0,42$ SDS), $p < 0,05$. При этом медиана SDS роста в группе сравнения 2 составила $-0,5$ SDS и была сопоставима с основной группой, $p > 0,05$. Отставание в росте более 1 SDS составило 36 % в основной группе, 16 и 35 % в группах сравнения 1 и 2 соответственно. При оценке показателей ИМТ было установлено,

что избыток веса отмечался у 27 % обследованных основной группы, 40 % группы сравнения 1 и 21 % группы сравнения 2, данные различия были статистически не значимы ($p > 0,05$).

Выполнено определение киспептина крови у всех исследуемых. При анализе уровня киспептина внутри основной группы, где ранее не было выявлено статистических различий по клинико-биохимическим параметрам, также не было установлено различий киспептина крови в группе позднего пубертата и гипогонадотропного гипогонадизма (медианы соответственно 29,5 пг/мл и 44,5 пг/мл, $p = 0,63$). Полученные результаты подтверждают возможность объединения функциональной и органической задержки пубертата в общую группу задержки полового развития по признаку отсутствия реактивации центральных отделов гонадостата в должном для этого возрасте.

В группах мальчиков с физиологическим для возраста сценарием полового развития, независимо от его стадии, были установлены сопоставимые значения уровня киспептина крови (медианы в обеих группах 13,8 пг/мл), которые были значимо ниже по сравнению с таковыми в основной группе задержки полового развития, где медиана киспептина составила 31,2 пг/мл ($p = 0,02$). Данные представлены на рисунке 9.

Таким образом, в результате проведенного сравнительного анализа показано, что уровень киспептина крови, сопоставимо низкий при физиологическом течении пубертата, независимо от его стадии, значимо повышается при задержке полового развития в соответствующем старту пубертата возрасте.

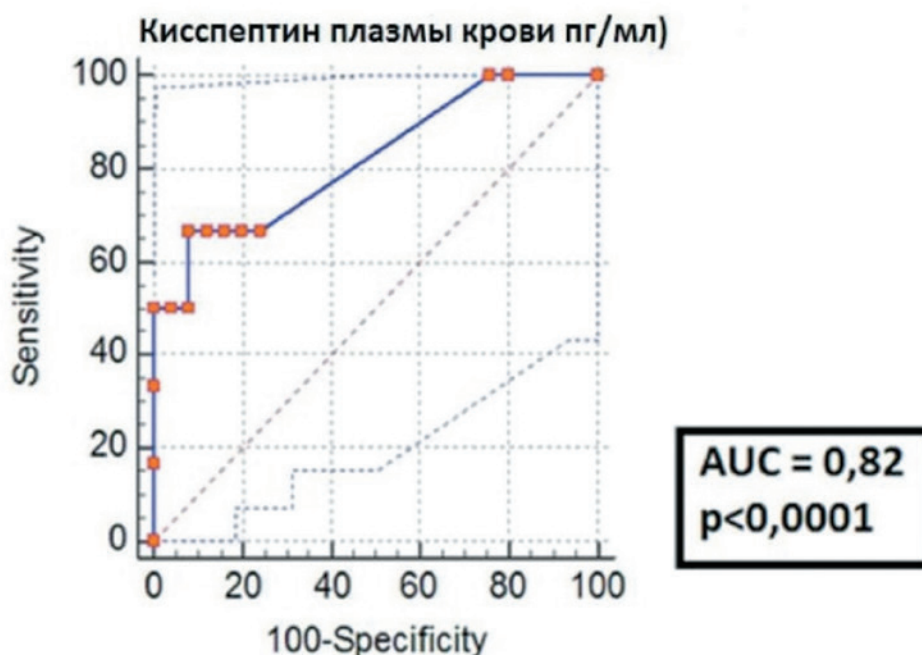


Рис. 11. ROC-анализ уровня киспептина плазмы крови в подгруппе подростков с гипогонадотропным гипогонадизмом

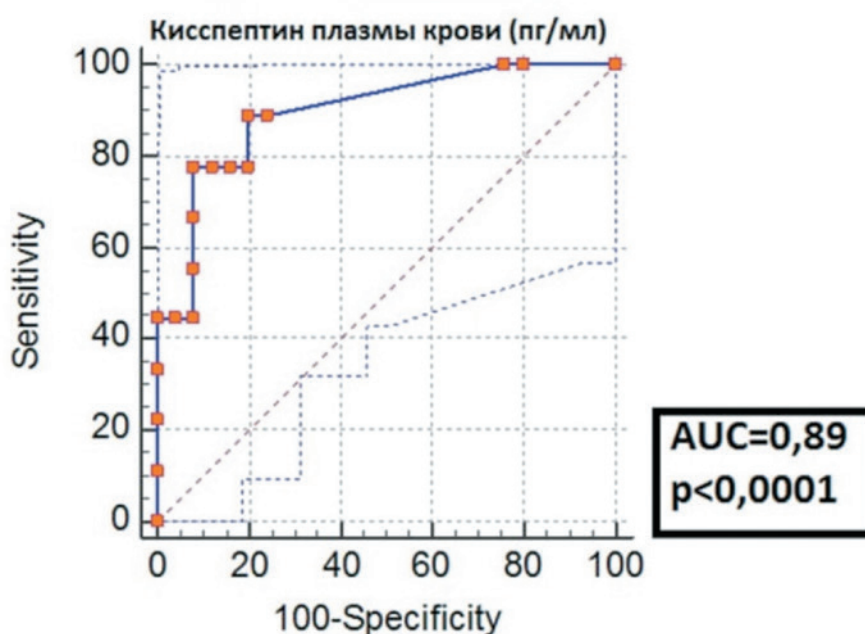


Рис. 12. ROC-анализ уровня киспептина плазмы крови в подгруппе подростков с синдромом позднего пубертата

Проведенный корреляционный анализ между уровнем тестостерона и киспептина крови выявил негативную связь средней силы между этими показателями ($r = -0,5$; $p < 0,01$). Подобные данные ранее были получены на экспериментальном материале. Таким образом, наличие стойкой обратной взаимосвязи между уровнями тестостерона и кис-

спептина крови, наряду с установленным клинико-биохимическим фенотипом подростков, имеющих значимо более высокий уровень киспептинемии при задержке полового развития центрального генеза по сравнению с мальчиками, не имеющими нарушений полового развития, позволяют обозначить новые регуляторные механизмы стероидоген-

неза со стороны кисспептина по принципу «обратной связи».

Полученные данные о повышении кисспептина крови при задержке полового развития легли в основу поиска количественных значений данного сигнального пептида, возможных для использования в качестве критерия патологического сценария пубертата. В результате проведенного анализа распределения под кривой (ROC) значений кисспептина при задержке полового развития и физиологическом течении пубертата (основная группа и группа сравнения 1) был установлен оптимальный пороговый уровень кисспептина в крови для прогнозирования задержки полового созревания. Таким уровнем, по данным ROC анализа, можно считать показатель кисспептина крови 16,9 пг/мл (чувствительность 73 %, специфичность 92 %, $p < 0,0001$). Данные представлены на рисунке 10.

Для уточнения возможных дифференциальных различий в значениях кисспептина для прогноза синдрома позднего пубертата и гипогонадотропного гипогонадизма подобные ROC-кривые были построены отдельно для значений кисспептина крови при каждом из названных состояний в сравнении со значениями в группе контроля 1. Пороговые значения кисспептина крови при обоих состояниях были одинаковы и не отличались от таковых для общей группы задержки полового развития, т. е. соответствовали 16,9 пг/мл (для синдрома позднего пубертата чувствительность 77,7 %, специфичность 92 %; для гипогонадотропного гипогонадизма чувствительность 66,7 %, специфичность 92 %, $p < 0,0001$). Данные представлены на рисунке 11 и 12.

Сделано общее заключение, что значение кисспептина крови $>16,9$ пг/мл является пороговым для прогнозирования задержки старта полового развития, но не позволяет дифференцировать функциональные и органические его варианты.

Заключение

Основной идеей представленного исследования явилось изучение роли кисспептинового сигналинга, играющего важную роль в физиологической регуляции гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, в части его влияния на центральные и периферические стероидчувствительные ткани для расширения понимания механизмов патологии и поиска новых диагностических и терапевтических возможностей при нарушениях старта пубертата и полового развития детей и подростков. Получены новые данные о значимом негативном влиянии дефицита андрогенов на рецепцию кисспептина в центральных и периферических от-

делах гонадостата, о регуляторной функции кисспептина по отношению к тестостерону по принципу «обратной связи», а также о недостаточной эффективности заместительной терапии дефицита андрогенов эфирами тестостерона с точки зрения репарации ранее произошедших дегенеративных и атрофических процессов.

Транслируя полученные результаты в клиническую практику, рекомендованы оптимальные для прогнозирования задержки полового развития у мальчиков пороговые значения кисспептина крови, не позволяющие, однако, дифференцировать функциональный либо органический генез патологии, и теоретически обоснована целесообразность апробации и внедрения новых терапевтических технологий лечения с включением кисспептина задержки полового развития в мужском поле.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016; 4 (3): 254–264.
2. Ojeda SR, Lomniczi A, Sandau U, et al. New concepts on the control of the onset of puberty. In: Loche S, Cappa M, Ghizzoni L, et al., eds. *Pediatric Neuroendocrinology.* Endocr Dev. Basel, Karger, 2010; 17: 44–51.
3. Ojeda SR, Terasawa E. Neuroendocrine regulation of puberty. In: Pfaff D, Arnold A, Etgen A, et al., eds. *Hormones, Brain and Behavior.* New York, Elsevier, 2002; 4: 589–659.
4. Lomniczi A, Ojeda SR. The emerging role of epigenetics in the regulation of female puberty. In: Bourguignon J-P, Parent A-S, eds. *Puberty from bench to clinic. Lessons for clinical management of pubertal disorders.* Endocr Dev. Basel, Karger, 2016; 29: 1–16.
5. Ranke MB, Mullis P-E, eds. *Diagnostics of endocrine function in children and adolescents.* 4th, rev and extended ed. Basel, Karger, 2011:535.
6. Willemsen RH, Dunger DB. Normal variations in pubertal timing: genetic determinants in relation to growth and adiposity. In: Bourguignon J-P, Parent A-S, eds. *Puberty from bench to clinic. Lessons for clinical management of pubertal disorders.* Endocr Dev. Basel, Karger. 2016; 29: 17–35.
7. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet.* 2009; 41 (3): 354–358.
8. Leon S, Barroso A, Vazquez MJ, et al. Direct actions of kisspeptins on GnRH neurons permit attainment

- of fertility but are insufficient to fully preserve gonadotropic axis activity. *Sci Rep*. 2016; 6: 19206.
9. Brown RE, Imran SA, Ur E, et al. KiSS-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake. *Mol Cell Endocrinol*. 2008; 281 (1–2): 64–72.
 10. Tng EL. Kisspeptin signalling and its roles in humans. *Singapore Med J*. 2015; 56 (12): 649–656.
 11. Celik O, Celik N, Aydin S, et al. Ghrelin action on GnRH neurons and pituitary gonadotropes might be mediated by GnIH-GPR147 system. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2016; 25 (2): 121–128.
 12. Javed Z, Qamar U, Sathyapalan T. The role of kisspeptin signalling in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis - current perspective. *Endokrynol Pol*. 2015; 66 (6): 534–547.
 13. Tena-Sempere M. Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 314 (2): 164–169.
 14. Sapronov NS. Gonadoliberins. SPb.: Art-express, 2012. p. 272. In Russian [Сапронов Н.С. Гонадолиберины. СПб.: Арт-экспресс, 2012. с. 272].
 15. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, et al. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev*. 2012; 92 (3): 1235–1316.
 16. Guerriero KA, Keen KL, Millar RP, et al. Developmental changes in GnRH release in response to kisspeptin agonist and antagonist in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): implication for the mechanism of puberty. *Endocrinology*. 2012; 153 (2): 825–836.
 17. Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, et al. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci*. 2009; 29 (12): 3920–3929.
 18. George JT, Veldhuis JD, Roseweir AK, et al. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96 (8): E1228–1236.
 19. Newton CL, Anderson RC, Millar RP. Therapeutic neuroendocrine agonist and antagonist analogs of hypothalamic neuropeptides as modulators of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Endocr Dev*. 2016; 30: 106–129.
 20. Yarmolinskay MI, Ganbarli NF, Aylamazyan EK. Role of kisspeptin in regulation of reproductive function. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznej* = Journal of Obstetrics and Women's Diseases. 2016; 65 (6): 4–18. In Russian [Ярмолинская М.И., Ганбарли Н.Ф., Айламазян Э.К. Значение Кисспептина в регуляции функции репродуктивной системы. Журнал акушерства и женских болезней. 2016; 65 (6): 4–18].
 21. George JT, Veldhuis JD, Roseweir AK, et al. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96 (8): E1228–1236.
 22. Chan YM, Butler JP, Pinnell NE, et al. Kisspeptin resets the hypothalamic GnRH clock in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96 (6): 908–915.
 23. Jayasena CN, Abbara A, Narayanaswamy S, et al. Direct comparison of the effects of intravenous kisspeptin-10, kisspeptin-54 and GnRH on gonadotrophin secretion in healthy men. *Hum Reprod*. 2015; 30 (8): 1934–1941.
 24. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, et al. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 320 (2): 383–388.
 25. Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, et al. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90 (12): 6609–6615.
 26. George JT, Veldhuis JD, Roseweir AK, et al. Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96 (8): 1228–1236.
 27. Young J, George JT, Tello JA, et al. Kisspeptin restores pulsatile LH secretion in patients with neurokinin B signaling deficiencies: physiological, pathophysiological and therapeutic implications. *Neuroendocrinology*. 2013; 97 (2): 193–202.
 28. Nikitina IL, Khoduleva YuN, Masel AS, et al. System of KISS-KISS1R: focus on peripheral signaling in androgen-dependent tissues in the experimentally induced model hypogonadotropic hypogonadism. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya* = Pathological physiology and experimental therapy. 2016; 60 (4): 24–33. In Russian [Никитина И.Л., Ходулева Ю.Н., Масель А.С. и др. Система KISS/KISS1R: периферический сигналинг в андрогензависимых тканях в модели мужского гипогонадизма. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60 (4): 24–33].
 29. Nikitina IL, Bayramov AA, Khoduleva YuN, et al. Kisspeptins in physiology and pathology of sex development — new diagnostic and therapeutic approaches. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii* = Reviews on clinical pharmacology and drug therapy. 2014; 12 (4): 3–12. In Russian [Никитина И.Л., Байрамов А.А., Ходулева Ю.Н. и др. Кисспептины в физиологии и патологии полового развития — новые диагностические и терапевтические возможности. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2014; 12 (4): 3–12].
 30. Nikitina IL. The timing of puberty: well-known and new. *Arterial'naya gipertenziya* = Arterial hypertension. 2013; 19 (3): 227–236. In Russian [Никитина И.Л. Старт пубертата — известное и новое. Артериальная гипертензия. 2013; 19 (3): 227–236].
 31. Nikitina IL, Yuchlina YN, Vasileva EY, et al. Kisspeptin regulation of male sex development: possibilities of diagnosis and treatment of delayed puberty and hypogonadotropic hypogonadism. *Problemy endocrinologii* = Problems of endocrinology. 2018; 64 (5): 280–285. In Russian [Никитина И.Л., Юхлина Ю.Н., Васильева Е.Ю. и др. Кисспептиновые механизмы регуляции полового развития мальчиков: потенциал диагностики и терапии при задержке старта пубертата и гипогонадотропном гипогонадизме. Проблемы эндокринологии. 2018; 64 (5): 280–285].
 32. Droblenkov AV, Proshina LG, Yuhlina YuN, et al. Testosterone-dependent changes in neurons of hypothalamic arcuate nucleus and reversibility of these changes by modeled male hypogonadism. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya* = Pathological physiology and experimental therapy. 2017; 61 (4): 21–30. In Russian [Дробленков А.В., Прошина Л.Г., Юхлина Ю.Н. и др. Тестостерон-зависимые изменения нейронов аркуатного ядра гипоталамуса и их обратимость при моделировании мужского гипогонадизма. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2017; 61 (4): 21–30].

Информация об авторах:

Никитина Ирина Леоровна, д.м.н., заведующий НИЛ детской эндокринологии Института эндокринологии, заведующий кафедрой детских болезней Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Юхлина Юлия Николаевна, ассистент кафедры детских болезней Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Саракаева Лейла Рамазановна, младший научный сотрудник НИЛ детской эндокринологии Института эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Плаксина Анна Олеговна, старший лаборант кафедры детских болезней Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Байрамов Алекбер Азизович, д.м.н., ведущий научный сотрудник НИЛ клинической эндокринологии Института эндокринологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Nikitina Irina L., MD, PhD, Head of Research Laboratory of Pediatric Endocrinology at Institute of Endocrinology, Head of the Department of Childhood Diseases, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Center;

Yuchlina Yulia N., Assistant at the Department of Childhood Diseases, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Center;

Sarakaeva Leyla R., Junior Researcher at Research Laboratory of Pediatric Endocrinology at Institute of Endocrinology, Almazov National Medical Research Center;

Plaksina Anna O., Senior Laboratory Assistant, Department of Childhood Diseases, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Center;

Bayramov Alekber A., MD, PhD, Leading Researcher, Research Laboratory of Clinical Endocrinology, Institute of Endocrinology, Almazov National Medical Research Center.

МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ ПЛАЦЕНТЫ: СИСТЕМАТИЗИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ОПИСАНИЮ ПЛАЦЕНТЫ

Фокин А. В., Семенова Е. С., Вышедкевич Е. Д., Шелепова Е. С.,
Романов Г. Г., Труфанов Г. Е., Машенко И. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Фокин Александр Владимирович,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: fokinalexrussia@mail.ru

Статья поступила в редакцию 23.06.2020
и принята к печати 12.10.2020.

Резюме

Актуальность. В настоящее время одним из актуальных вопросов пренатальной магнитно-резонансной томографии (МРТ) является точная и своевременная диагностика патологических состояний экстрафетальных структур плода. В частности, наиболее острой проблемой является необходимость улучшения диагностической точности распознавания и дифференцировки плацентарной адгезивно-инвазивной патологии. В литературных источниках нет единого подхода к методике и описанию МР-исследования плаценты. **Цель.** Улучшить диагностические возможности метода магнитно-резонансной томографии для исследования плаценты. **Материалы и методы.** Выполнено и проанализировано 293 МР-исследования малого таза беременных женщин в возрасте от 22 до 45 лет (средний — 35 лет) в сроке беременности от 14 до 38 недель (средний — 36 недель). **Результаты.** Разработана и внедрена в клиническую практику трехэтапная методика МРТ плаценты и алгоритм систематизированного описания МР-исследования плаценты беременных. **Заключение.** Разработанный систематизированный подход к исследованию плаценты поможет улучшить диагностические возможности метода МРТ для исследования плаценты в связи с востребованностью в настоящее время точной и правильной интерпретации этого органа in vivo.

Ключевые слова: алгоритм, беременность, МРТ во время беременности, МРТ плаценты, плацента, плод.

Для цитирования: Фокин А.В., Семенова Е.С., Вышедкевич Е.Д. и др. Магнитно-резонансная томография плаценты: систематизированный подход к описанию плаценты. Трансляционная медицина. 2020; 7 (5): 81-90. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-81-90

MAGNETIC RESONANCE IMAGING OF THE PLACENTA: A SYSTEMATIC APPROACH TO THE DESCRIPTION OF NORMAL PLACENTA

Fokin A. V., Semenova E. S., Vyshedkevich E. D., Shelepova E. S.,
Romanov G. G., Trufanov G. E., Mashchenko I. A.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Fokin Aleksandr V.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: Fokinalerussia@mail.ru

Received 23 June 2020; accepted 12 October
2020.

Abstract

Background. Currently, one of the topical issues of prenatal magnetic resonance imaging is accurate and timely diagnosis of pathological conditions of extrafetal structures of the fetus. In particular, the most acute problem is the need to improve the diagnostic accuracy of recognition and differentiation of placental adhesive-invasive pathology (PAIP). In the literature, there is no unified approach to the methodology and description of MRI examination of the placenta. **Objective.** To improve the diagnostic methods of the method of magnetic resonance imaging for the study of the placenta. **Design and methods.** A total of 293 MRI studies of the small pelvis of pregnant women aged 22 to 45 years (average — 35 years), in gestational age from 14 to 38 weeks (average — 36 weeks) were performed and analyzed. **Results.** A clinical three-stage method of MRI of the placenta and an algorithm for systematized description of MRI of the placenta of pregnant women have been developed and implemented. **Conclusion.** The developed systematic approach to the study of the placenta will help improve the capabilities of the MRI method for examining the placenta in connection with the demand for accurate and correct interpretation of this organ in vivo.

Key words: algorithm, fetus, MRI during pregnancy, placenta, placental MRI, pregnancy.

For citation: Fokin AV, Semenova ES, Vyshedkevich ED, et al. Magnetic resonance imaging of the placenta: a systematic approach to the description of normal placenta. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020; 7 (5): 81-90. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-81-90

Список сокращений: МРТ — магнитно-резонансная томография.

Введение

Плацента является органом, который формируется при беременности в процессе эмбриогенеза для поддержания нормального роста и развития плода. Ее состояние и функционирование играют решающую роль в патофизиологии внутриутробных и гестационных расстройств. Традиционная ультразвуковая оценка состояния плаценты в последние десятилетия часто дополняется магнитно-резонансной томографией (МРТ) с целью уточнения выявленных патологических изменений плаценты [1, 2, 3]. Большинство пренатальных МР-исследований

проводится в основном для визуализации плода, оценка плаценты включается в любое такое исследование, и распознавание нормального вида плаценты может быть полезным для выявления вариантов ее развития, возможных кровоизлияний, ишемии или других нарушений. Кроме того, возросшая частота родов с помощью кесарева сечения в популяции означает, что больше женщин, чем когда-либо, подвержены риску аномального прикрепления плаценты, и диагностическая визуализация может играть важную роль для них. Поэтому врач-рентгенолог должен быть готов оценить плаценту как нормальную, так и патологически измененную.

В статье проанализированы современные литературные данные и собственный опыт, касающийся

ся МР-семиотики плаценты без патологических изменений в соответствии с гестационным возрастом и ее вариантами развития.

Целью данной работы было улучшить диагностические возможности метода магнитно-резонансной томографии для исследования плаценты. И для этого было необходимо:

1. Проанализировать современные литературные данные и собственный опыт МР-исследования плацент без патологических изменений в соответствии с гестационным возрастом и ее вариантами развития.

2. Разработать алгоритм систематизированного МР-исследования и описания плаценты.

Материалы и методы

За период с января 2017 по июнь 2020 годы выполнено 293 МР-исследований малого таза беременным по различным показаниям. Срок беременности женщин был от 14 до 38 недели (средний — 36 неделя), возраст беременных — от 22 до 45 лет (средний — 35 лет). Исследования выполняли на МР-томографах с индукцией магнитного поля 3 и 1,5 Тл (Siemens, Германия). Импульсные последовательности для лучшей визуализации должны иметь широкое поле обзора (300–450 мм), толщина среза варьируется, в «материнских» и «плацентарных» протоколах оптимально 4–5 мм, однако в «тазовой» последовательности необходимо 3–4 мм. Рекомендуемые параметры матрицы 320х320 и выше.

Результаты

Нами была разработана и внедрена в клиническую практику трехэтапная методика МРТ плаценты.

Оптимальная трехэтапная методика МРТ плаценты представляла собой следующие этапы:

1 этап — «материнский» — МР-визуализация, основанная на анатомии матери; необходима для

оценки сегментарного расположения плаценты в полости матки с использованием Т2-ВИ от уровня верхней границы дна матки до промежности с толщиной среза 4–5 мм.

2 этап — «плацентарный» — детальное изучение паренхимы органа и оценки границы «плацента-миометрий» с получением МР-изображений в трех ортогональных плоскостях относительно анатомии плаценты с толщиной среза 3–5 мм в Т1-ВИ, Т2-ВИ с/без подавления сигнала от жировой ткани, а также ДВИ.

3 этап — «тазовый» — для оценки шейки матки и смежных структур малого таза, что особенно актуально при плацентарной адгезивно-инвазивной патологии.

Оптимальный МР-протокол исследования плаценты у беременной представлен в таблице 1.

Обсуждение

Расположение плаценты в полости матки

Плацента может располагаться вдоль передней, задней, боковых стенок матки, а также в дне или нижнем маточном сегменте матки. На ранних сроках беременности плацента прикрепляется в нижних отделах матки, и по мере протонирования беременности она мигрирует вверх (около 1 мм в неделю), что связано с ростом плода и увеличением объема матки [4]. К началу третьего триместра (30 недель) плацента обычно достигает своего окончательного местоположения.

Термин «низкое расположение плаценты» используется, когда ее край расположен в нижнем сегменте матки в пределах 2–3 см или менее от внутреннего зева шейки матки, но не достигает его. Термин «предлежание плаценты» применяется, когда плацента касается или покрывает внутренний зев шейки матки. Предлежание может быть краевым (плацента достигает внутрен-

Таблица 1. Протокол оптимальной трехэтапной методики МР-исследования плаценты

Этап	Тип последовательности	Плоскость	Толщина среза, мм	Поле обзора, мм	Ориентация срезов
Материнский	T2 SSFSE/SSFP	SAG, COR, TRA	4–5	300–400	По анатомии женщины
Плацентарный	T2 SSFSE/SSFP	SAG, COR, TRA	4–5	300–400	По плаценте
	T2 BLADE FS	SAG, COR, TRA	4–5	380–450	По плаценте
	T1 SE	SAG	4–5	380–450	По плаценте
	T1 SE FS	TRA	4–5	380–450	По плаценте
	DWI	TRA	4–5	300–400	По плаценте
Тазовый	T2 SE	SAG	3–4	380–450	По матке

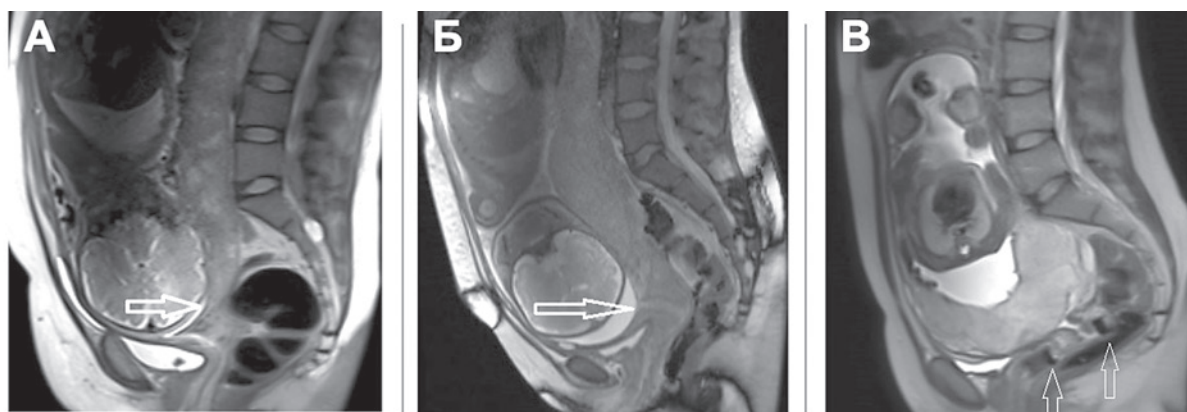


Рис. 1. Варианты расположения плаценты в полости матки (указана стрелкой):

а — низкое расположение плаценты, 34 неделя беременности, нижний край плаценты выше внутреннего зева на 2,5 см; б — краевое предлежание плаценты, 35 неделя беременности; в — полное центральное предлежание плаценты, 29 неделя беременности, в области шейки матки имеются артефакты от пессария

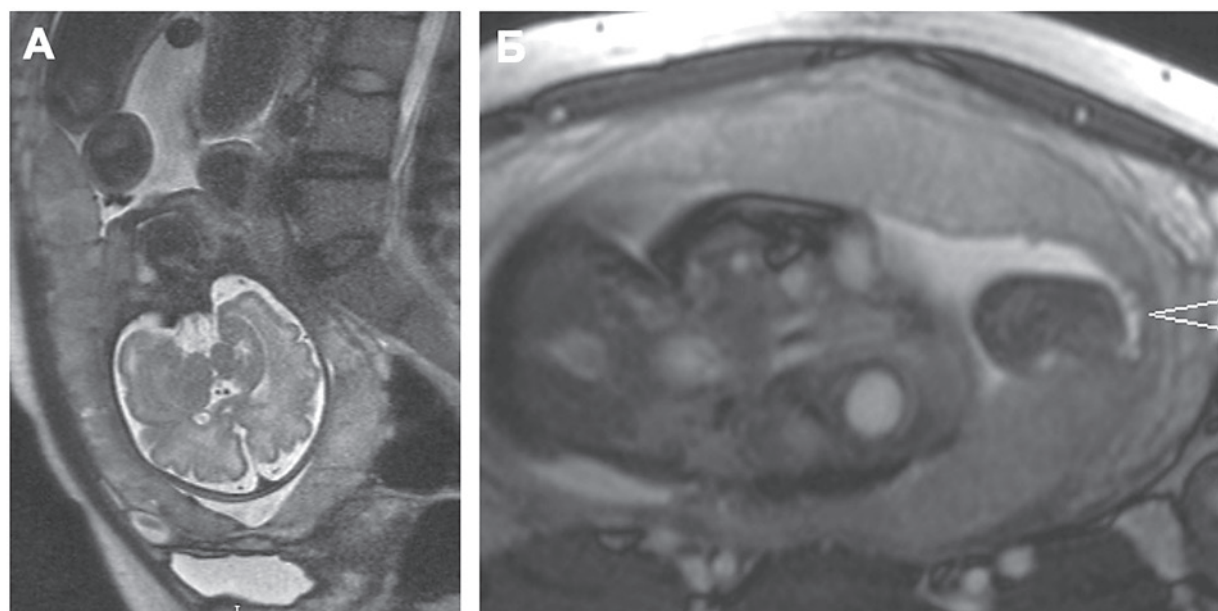


Рис. 2. Двудольная плацента, 35 неделя беременности. Определяются две относительно симметричные и равные доли плаценты, разделенные между собой мембраной:

а — сагиттальная плотность, б — аксиальная плоскость

него зева, но не перекрывает его), частичным (плацента частично перекрывает внутренний зев без перехода на противоположную стенку матки) или полным (плацента полностью перекрывает область внутреннего зева, а при центральном полном варианте предлежания средняя часть плаценты находится над областью внутреннего зева) [5].

Ретроспективное исследование, проведенное Dashe J. S., et al. [6] в 2002 году показало, что среди случаев предлежания плаценты, наблюдаемых

в 15–19 недель, 20–23, 24–27, 28–31 и 32–35 недель, предлежание сохранялось до момента родов в 12, 34, 49, 62 и 73 соответственно.

Таким образом, предлежание плаценты, выявленное на более раннем сроке беременности, с меньшей вероятностью сохранится до родов, чем диагностированное в более позднем гестационном возрасте. Для определения вида предлежания плаценты при МРТ наиболее информативны изображения, ориентированные в сагиттальной плоскости (рис. 1).

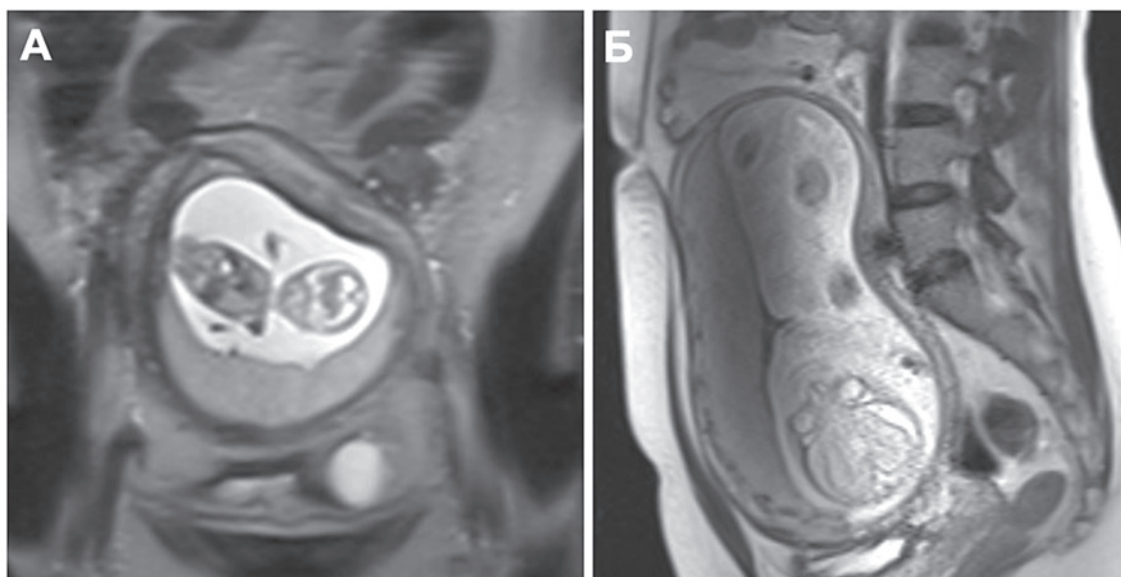


Рис. 3. Плацента во втором триместре беременности:

а — 14 неделя беременности; б — 22 неделя беременности

Конфигурация плаценты

Плацента может иметь округлую, овальную или неправильную форму; может быть двудольной с одинаковым или разным размером долей (рис. 2).

Наличие плаценты с добавочной долей имеет повышенный риск предлежания сосудов пуповины и их разрыва, что может привести к гибели плода.

Толщина плацентарного диска также различна и увеличивается с прогрессированием беременности, но на поздних сроках она не должна превышать 4 см [7, 8]. Измерения толщины плаценты рекомендуется проводить в области прикрепления пуповины перпендикулярно стенке матки. Плацента, расположенная по передней стенке матки, обычно тоньше, чем при локализации вдоль задней стенки и дна матки, в среднем на 0,7 см [9]. Таким образом, толщина плаценты вдоль передней стенки матки более 3,3 см и вдоль задней стенки матки более 4,0 см должна считаться как увеличенная [9]. Толщина плаценты постепенно уменьшается к периферии, и на аксиальных изображениях края плаценты имеют плавное заострение [10]. Локальные участки утолщения плаценты могут быть обусловлены наличием в плаценте участков нарушения кровообращения — зоны внутриплацентарного кровоизлияния или ишемии [10].

Структура плаценты

При МРТ оценивается интенсивность МР-сигнала от плацентарной ткани, ее однородность, наличие патологических включений [11]. Соот-

ношение интенсивности МР-сигнала «плацента/амниотическая жидкость» значительно снижается с увеличением срока гестации.

Исходя из УЗ-классификации Grannum P. A., et al. (1979) [12], адаптируя к МРТ, выделяют 4 стадии созревания плаценты:

Стадия 0: в первом триместре и примерно до 24 недель гестации. Плацента является незрелой и относительно тонкой (2–2,5 см), имеет однородную интенсивность МР-сигнала (рис. 3).

Стадия 1: определяется на 24–31 неделе беременности. Плацента продолжает созревать, увеличивается ее толщина, орган начинает приобретать дольчатое строение, и, соответственно, интенсивность МР-сигнала от нее постепенно становится неоднородной. Появляются формирующие котиледоны плаценты, неполные перегородки, отходящие от базальной пластинки в виде гипоинтенсивных полосок внутри паренхимы (рис. 4) [8, 11].

Стадия 2: преобладает на 32–35 неделе беременности. При нормально протекающей беременности в третьем триместре можно визуализировать более выраженные зоны гиперинтенсивного МР-сигнала на T2-ВИ вдоль базальной мембраны, что является отражением процесса нормального старения плаценты и не должно интерпретироваться как патологические изменения [13].

Стадия 3: зрелая плацента определяется с 36 недели беременности. В третьем триместре наличие локальных зон гипоинтенсивного МР-сигнала на T2-SSFSE и промежуточного изоинтенсивного МР-сигнала на изображениях SSFP, от так называемых «плацентарных озер», областей с замедлен-



Рис. 4. Структура плаценты на 26 неделе беременности.

Появляются гипоинтенсивные на T2-ВИ тонкие полоски внутри плацентарной паренхимы (указаны стрелками)



Рис. 5. Структура плаценты на 38 неделе беременности.

Стрелкой указан локальный участок гипоинтенсивного сигнала в толще плаценты — «плацентарное озеро»

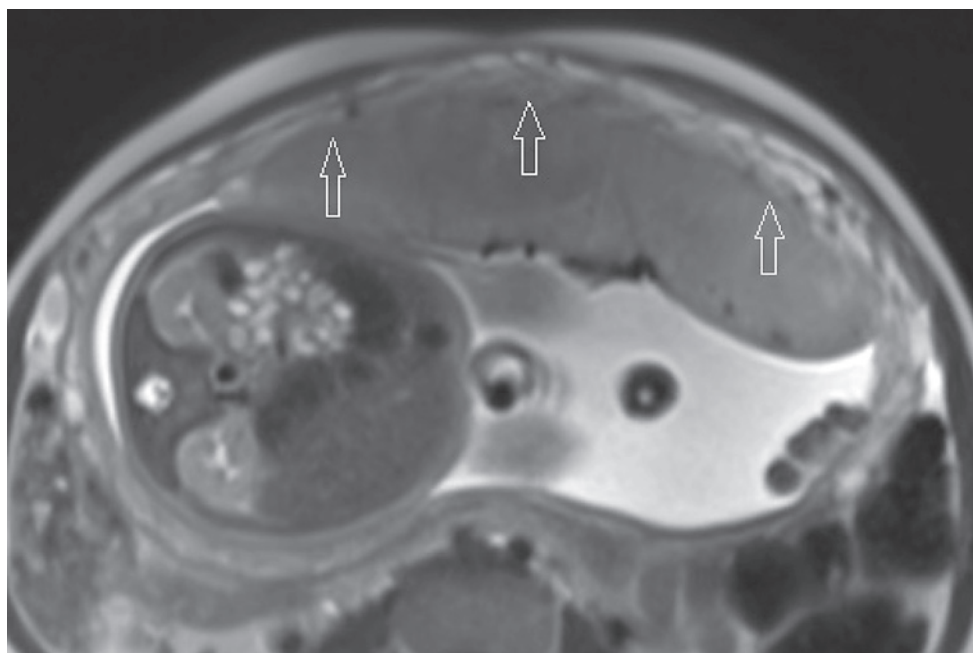


Рис. 6. Стрелками указана граница плацента-миометрий, 35 неделя беременности

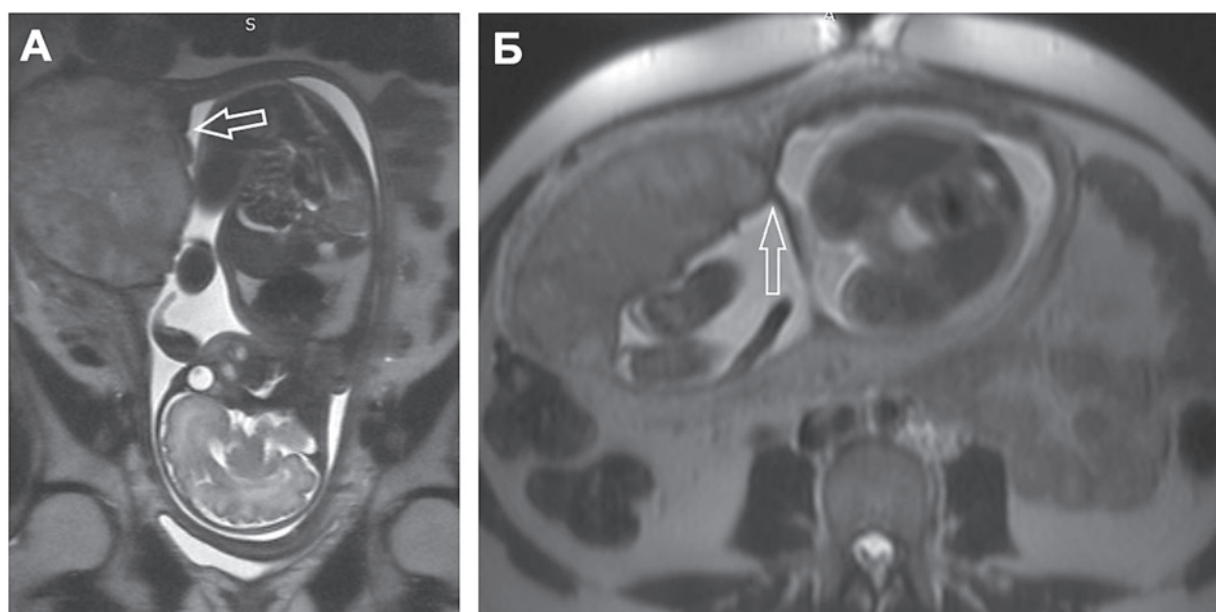


Рис. 7. Неполная перегородка матки (указана стрелкой), 31 неделя беременности.

От дна матки отходит неполная перегородка, к правой части которой частично прикрепляется плацента: а — корональная плоскость, б — аксиальная плоскость

ным кровотоком, является вариантом нормального ее «старения» (рис. 5).

Плацентарная сосудистая сеть в основном состоит из многочисленных мелких сосудов, которые обеспечивают диффузию между материнским и плодовым кровообращением в ворсинках хориона [14]. При МРТ, как правило, видны более крупные сосуды в месте прикрепления пуповины и субхори-

ального распределения; крупные внутриплацентарные сосуды при нормальном развитии и созревании плаценты обычно не визуализируются [14].

Граница плацента-миометрий

Нормальный миометрий выглядит трехслойным на Т2-ВИ с умеренно гиперинтенсивным средним слоем и тонкими гипоинтенсивными

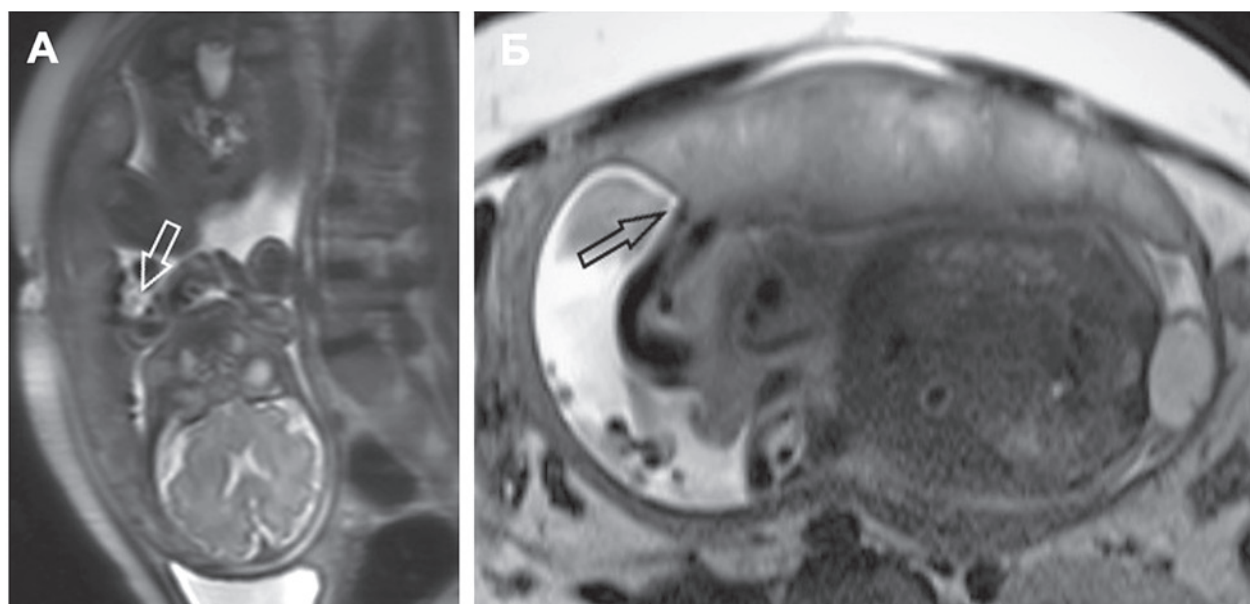


Рис. 8. Прикрепление пуповины к плаценте (указано стрелкой):

а — центральное, 33 неделя беременности, б — периферическое, 31 неделя беременности

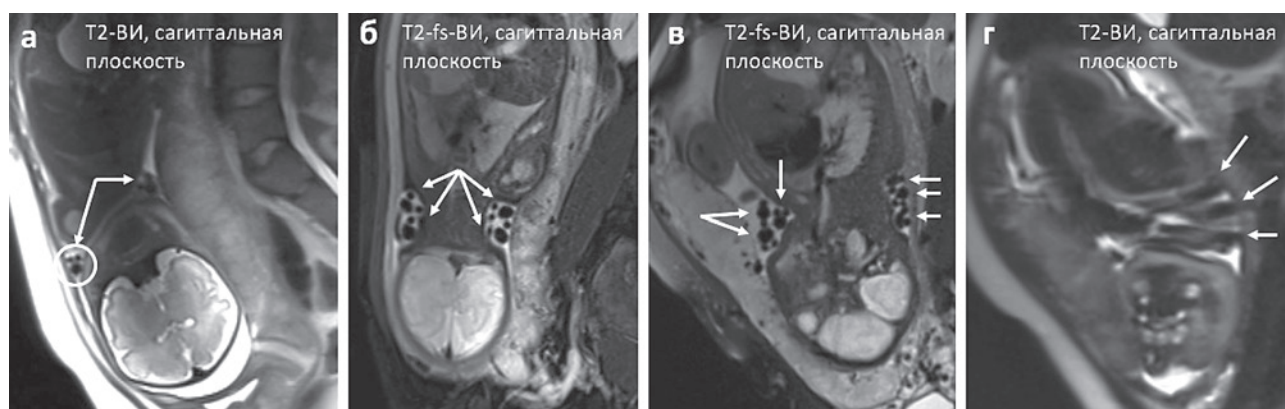


Рис. 9. Обвитие пуповины вокруг шеи плода:

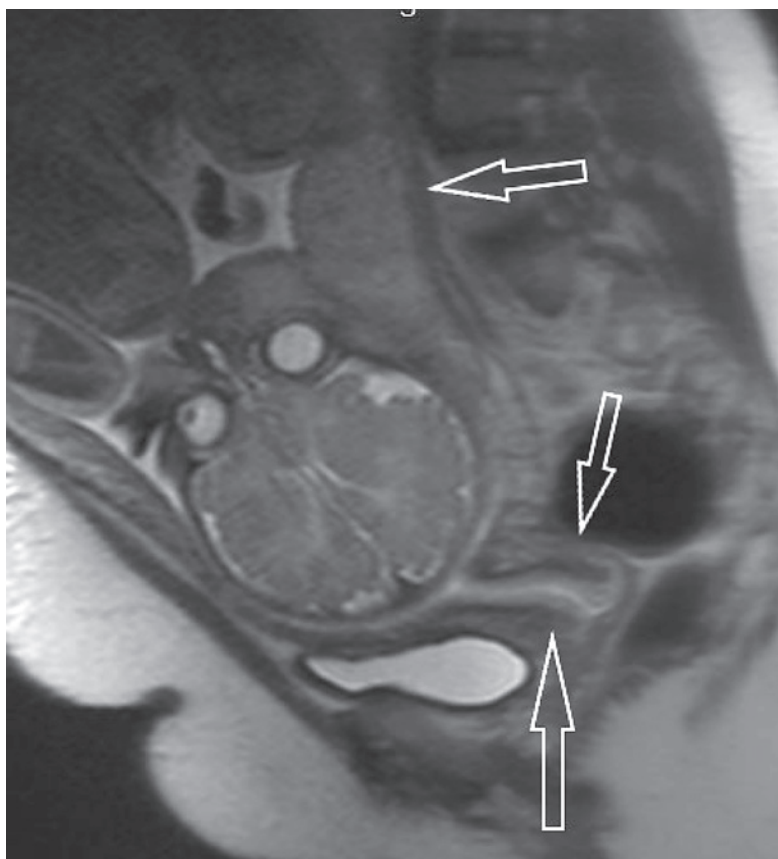
а — однократное (пуповина имеет вид «ушек Микки Мауса»), 34 неделя беременности; б — двойное (по обе стороны от шеи плода определяются 2 более крупные вены и 4 артерии), 34 недели; в, г — тройное, 36 недель

слоями с обеих сторон от него. Наилучшей импульсной последовательностью, обеспечивающей четкую визуализацию границы плацента-миометрий, является SSFP с хорошим отображением сосудов в среднем слое миометрия. Контраст между умеренно гиперинтенсивным МР-сигналом от плаценты, гипоинтенсивным внутренним слоем миометрия и гиперинтенсивным средним слоем миометрия из-за наличия сосудов создает трехцветный вид «ярко-темно-ярко» и обеспечивает оптимальную визуализацию границы между плацентой и миометрием (рис. 6). При МРТ плаценты матка должна быть оценена на предмет выявления аномалий мюллеровых протоков, особен-

но на наличие перегородки матки, так как может возникать имплантация плаценты в перегородку, которая имеет недостаточное кровоснабжение для поддержания децидуализации плаценты (рис. 7).

Место отхождения пуповины от плаценты

Пуповина может иметь центральное, периферическое, краевое или оболочечное прикрепление к плаценте. Первые два варианта прикрепления являются нормой. Краевое прикрепление пуповины к плаценте диагностируется, когда пуповина находится не дальше 2 см от плацентарного края (рис. 8) [15]. На МР-изображениях, ориентированных перпендикулярно оси пуповины, более крупная



**Рис. 10. Шейка матки, 35 неделя беременности.
Планта расположена вдоль задней стенки матки**

пупочная вена и две меньшие по диаметру пупочные артерии с обеих сторон от вены выглядят как «ушки Микки Мауса» (рис. 9).

При МРТ плаценты необходимо обращать внимание на положение пуповины относительно плода, так как обвитие пуповины вокруг шеи является наиболее частым осложнением родов [15]. Обвитие вокруг шеи может быть неполное и полное (рис. 9) [16].

Шейка матки у беременных имеет сходные МР-характеристики с небеременными женщинами: гиперинтенсивный секрет эндоцервикальных желез, промежуточная интенсивность МР-сигнала от слизистой оболочки, низкая интенсивность сигнала от фиброзной стромы шейки и промежуточная интенсивность сигнала от мышц (рис. 10) [4, 6].

В третьем триместре шейка матки обычно укорачивается. Важно измерять длину шейки матки, особенно у женщин, в анамнезе которых имеются преждевременные роды. Длина шейки матки менее 3 см после 24 недели и воронкообразная форма шейки являются предрасполагающими факторами к преждевременным родам [16, 17].

Внешние границы матки и смежные органы малого таза

Наличие тонкой гиперинтенсивной на T1-ВИ полосы жировой ткани между нижним сегментом матки и мочевым пузырем позволяет исключить инвазию плаценты в стенку мочевого пузыря. Также остальные органы, прилегающие к матке, должны быть оценены на момент плацентарной инвазии.

Заключение

Разработанный систематизированный подход к исследованию плаценты, включающий трехэтапную методику МР-исследования плаценты и алгоритм описания плаценты, предложенный в данной статье, поможет улучшить диагностические возможности метода МРТ для исследования плаценты в связи с востребованностью в настоящее время точной и правильной интерпретации этого органа *in vivo*.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Guttmacher AE, Maddox YT, Spong CY. The human placenta project: placental structure, development, and function in real time. *Placenta*. 2014; 35 (5): 303–304.
2. D'Antonio F, Iacovella C, Palacios-Jaraquemada J, et al. Prenatal identification of invasive placentation using magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014; 44 (1): 8–16.
3. Morita S, Ueno E, Fujimura M, et al. Feasibility of diffusion-weighted MRI for defining placental invasion. *J Magn Reson Imaging*. 2009; 30 (3): 666–671.
4. Reddy UM, Abuhamad AZ, Levine D, et al. Fetal imaging: executive summary of a joint Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, Society for Maternal-Fetal Medicine, American Institute of Ultrasound in Medicine, American College of Obstetricians and Gynecologists, American College of Radiology, Society for Pediatric Radiology, and Society of Radiologists in ultrasound fetal imaging workshop. *Am J Obstet Gynecol*. 2014; 210 (5): 387–397.
5. Varghese B, Singh N, George RAN, et al. Magnetic resonance imaging of placenta accreta. *Indian J Radiol Imaging*. 2013; 23 (4): 379–385.
6. Dashe JS, McIntire DD, Ramus RM, et al. Persistence of placenta previa according to gestational age at ultrasound detection. *Obstet Gynecol*. 2002; 99 (5 Pt 1): 692–697.
7. Elsayes KM, Trout AT, Friedkin AM, et al. Imaging of the placenta: a multimodality pictorial review. *Radiographics*. 2009; 29 (5): 1371–1391.
8. Allen BC, Leyendecker JR. Placental evaluation with magnetic resonance. *Radiol Clin North Am*. 2013; 51 (6): 955–966.
9. Lee AJ, Bethune M, Hiscock RJ. Placental thickness in the second trimester: a pilot study to determine the normal range. *J Ultrasound Med*. 2012; 31 (2): 213–218.
10. Bailey AA, Twickler DM, Leyendecker JR. MRI of the placenta. *MRI of Fetal and Maternal Diseases in Pregnancy*. 2016; 245–268.
11. Baughman WC, Corteville JE, Shah RR. Placenta accreta: spectrum of US and MR imaging findings. *Radiographics*. 2008; 28 (7): 1905–1916.
12. Grannum PA, Berkowitz RL, Hobbins JC. The ultrasonic changes in the maturing placenta and their relation to fetal pulmonary maturity. *Am J Obstet Gynecol*. 1979; 133 (8): 915–922.
13. Brown BP, Meyers ML. Placental magnetic resonance imaging Part II: placenta accreta spectrum. *Pediatr Radiol*. 2020; 50 (2): 275–284.
14. Fadl S, Moshiri M, Fligner CL, et al. Placental imaging: normal appearance with review of pathologic findings. *Radiographics*. 2017; 37 (3): 979–998.
15. Gagaev CHG. Human umbilical cord in normal and complicated pregnancy. Diss. ... doctor of medicine sciences: 14.01.01. M., 2015. In Russian [Гагаев Ч.Г. Пуповина человека при нормальной и осложненной беременности: дисс. ... доктора медицинских наук: 14.01.01. М., 2015].
16. Iams JD, Goldenberg RL, Meis PJ, et al. The length of the cervix and the risk of spontaneous premature delivery. National Institute of Child Health and Human Development Maternal Fetal Medicine Unit Network. *N Engl J Med*. 1996; 334 (9): 567–572.

17. Berghella V, Kuhlman K, Weiner S, et al. Cervical funneling: sonographic criteria predictive of preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1997; 10 (3): 161–166.

Информация об авторах:

Фокин Александр Владимирович, ординатор кафедры лучевой диагностики и медицинской визуализации ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Семенова Елена Сергеевна, врач-рентгенолог рентгеновского кабинета Перинатального центра ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Выshedkevich Елена Дмитриевна, ординатор кафедры лучевой диагностики и медицинской визуализации ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Шелепова Екатерина Сергеевна, врач акушер-гинеколог отделения патологии беременности Перинатального центра, ассистент кафедры акушерства и гинекологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Романов Геннадий Геннадиевич, к.м.н., доцент кафедры лучевой диагностики и медицинской визуализации ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Труфанов Геннадий Евгеньевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой лучевой диагностики и медицинской визуализации ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Машченко Ирина Александровна, к.м.н., ассистент кафедры лучевой диагностики и медицинской визуализации ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Fokin Aleksandr V., Resident of the Department of Radiology and Medical Visualization, Almazov National Medical Research Center;

Semenova Elena S., X-ray Room Radiologist of the Perinatal Center of the Almazov National Medical Research Center;

Vyshedkevich Elena D., Resident of the Department of Radiology and Medical Visualization, Almazov National Medical Research Center;

Shelepova Ekaterina S., Obstetrician-Gynecologist of the Department of Pregnancy Pathology of the Perinatal Center, Assistant of the Department of Obstetrics and Gynecology, Almazov National Medical Research Center;

Romanov Gennadiy G., PhD, Associate Professor at the Department of Radiology and Medical Imaging, Almazov National Medical Research;

Trufanov Gennadii E., MD, Dr. Sc., Professor, Head of the Department of Radiology and Medical Visualization, Almazov National Medical Research Center;

Mashchenko Irina A., PhD, Radiologist, Assistant of the Department of Radiology and Medical Visualization, Almazov National Medical Research Center.

ISSN 2311-4495
ISSN 2410-5155 (Online)
УДК 61:681.5

СОВРЕМЕННАЯ РОБОТОТЕХНИКА В МЕДИЦИНЕ

Мосоян М. С., Федоров Д. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Федоров Дмитрий Александрович,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.

E-mail: tvoiurolog@gmail.com

Статья поступила в редакцию 03.09.2020
и принята к печати 12.10.2020.

Резюме

На сегодняшний день робот-ассистированная хирургия и в целом применение роботов в медицине знаменует качественно новый этап развития минимально инвазивных технологий и эндовидеохирургии за счет высокого уровня точности, функциональности и эргономичности современных роботических систем. С помощью роботических технологий повышается качество диагностических манипуляций, улучшаются результаты терапевтических процедур и хирургических вмешательств, что в конечном итоге ведет к улучшению прогноза и качества жизни для пациентов, при этом также значительно расширяются возможности клиницистов. В данной обзорной статье приведены основные исторические вехи и предпосылки развития автоматизации и роботических технологий, применяемых в различных отраслях производства, с древних времен до настоящего времени. Кратко изложена история применения роботизированных процедур в разных областях медицины. Особое внимание уделено робот-ассистированной хирургии как одному из главных плацдармов применения современных технологий. На данный момент можно смело говорить, что медицинская робототехника играет очень важную роль в развитии хирургии будущего.

Ключевые слова: малоинвазивная хирургия, робот-ассистированные операции, роботическая хирургия, робототехника, урология.

Для цитирования: Мосоян М.С., Федоров Д.А. Современная робототехника в медицине. Трансляционная медицина. 2020; 7 (5): 91-108. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-91-108

MODERN ROBOTICS IN MEDICINE

Mosoyan M. S., Fedorov D. A.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Fedorov Dmitriy A.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: tvoiurolog@gmail.com

Received 03 September 2020; accepted
12 October 2020.

Abstract

Today, robot-assisted surgery and the use of robots in medicine marks a qualitatively new stage in the development of minimally invasive technologies and endovideosurgery, due to the high level of accuracy, functionality and ergonomics of modern robotic systems. With the help of robotic technologies, the quality of diagnostic manipulations as well as the results of therapeutic procedures and surgical interventions are significantly improved, which ultimately leads to an improved prognosis and quality of life for patients, while also expanding the capabilities of clinicians. This review article presents the main historical milestones and prerequisites for the development of automation and robotic technologies used in various industries, from ancient times to the present. The history of the use of robotic procedures in various fields of medicine is briefly described. Special attention is paid to robot-assisted surgery as one of the main bases for applying modern technologies. At the moment, we can safely say that medical robotics plays a very important role in the development of surgery of the future.

Key words: minimally invasive surgery, robot-assisted operations, robotic surgery, robotics, urology.

For citation: Mosoyan MS, Fedorov DA. Modern robotics in medicine. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020;7(5): 91-108. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-91-108

Список сокращений: ЛРП — лапароскопическая радикальная простатэктомия, ОРП — открытая радикальная простатэктомия, РАНЭ — робот-ассистированная радикальная нефрэктомия, РАП — робот-ассистированная пиелопластика, РАРП — робот-ассистированная радикальная простатэктомия, РАРЦ — робот-ассистированная радикальная цистэктомия/цистопростатэктомия, РРП — робот-ассистированная резекция почки.

Введение

Более ранняя диагностика, повышение эффективности проведения терапевтических мероприятий в сочетании с улучшением хирургических методов лечения привели к улучшению прогноза и функциональных результатов для пациентов, увеличению продолжительности жизни и постоянному расширению границ выживаемости. В результате роль клиницистов, несомненно, стала связана

с обработкой большого количества мультимодальной, многомерной, многомасштабной, интервенционной, метаболической и системной информации, помимо анатомических деталей. Ранняя диагностика обеспечивает меньший объем поражения органов патологическим процессом, требующий не только минимально инвазивного доступа, но и максимальной прецизионности вмешательства, зачастую сверхчеловеческой ловкости, видения, анализа и принятия решений. В этом отношении медицинская робототехника играет важную роль в развитии хирургии будущего.

История роботов

Философия автоматизации впервые была изложена древнегреческим мыслителем Аристотелем в IV веке до н. э. Существуют данные, что автоматические машины создавались на территории Древней Греции, Древнего Китая, Древнего Рима.

В 322 году до н. э. древнегреческий изобретатель Архит Тарентский сотворил деревянного голубя, летающего при помощи струй пара. Большой вклад в развитие механики, гидравлики и пневматики внесли александрийские математики и философы, Герон и Ктезибий, жившие в конце III века до н. э., многие изобретения которых перевернули представления о возможностях человека. В эпоху Средневековья значительная часть их изобретений, трудов и чертежей была уничтожена и утрачена, и развитие прогресса, в том числе в области механики, приостановилось [1].

В конце XV века великий художник и изобретатель Леонардо да Винчи для развлечения королевской семьи спроектировал механического рыцаря, облаченного в броню, которого можно назвать первым антропоморфным роботом. Внутри доспехов находился механизм, приводящий в движение искусственного человека при помощи системы тросов и роликов и позволявший ему имитировать человеческие движения. Подробные чертежи этого механизма были найдены в 1950-х годах [2]. К другим известным изобретателям эпохи Возрождения относятся Торриано, сконструировавший в 1540 году женщину, играющую на мандолине, Жак де Вокансон, создатель механической утки, способной двигаться, пить и есть, Пьер Жаке-Дро — часовщик, создавший сохранившихся по сей день «автоматов» (антропоморфных механизмов — художник, музыкант, каллиграф), Жозеф Мари Жаккар, Вольфганг фон Кемпелен [3].

Важной исторической вехой в робототехнике является конец XIX века. В 1898 году гениальный изобретатель Никола Тесла впервые продемонстрировал возможность дистанционного управления устройствами, создав лодку на радиоуправлении.

В начале XX века Генри Форд, благодаря внедрению в производство конвейера вместо ручной сборки, произвел настоящую революцию в машиностроении. Сошедший с конвейера Ford Model T ознаменовал начало новой эры промышленности, усложнение производства и неминуемый прогресс в индустрии создания машин и механизмов.

Сам термин «робот» появился лишь в 1920 году, благодаря чешскому писателю-фантасту Карелу Чапеку и его брату и соавтору Йозефу. В действие одной из своих пьес, «R.U.R.», автор ввел человекоподобные механизмы и назвал их «роботами» (от чешского «robota» — тяжелый физический труд). В литературе тему роботов развил писатель Айзек Азимов, а сборник рассказов «Я, робот» принес ему всемирную известность [4].

В 1951 году Рэймонд Гоерц, работавший в комиссии по атомной энергетике в США, спроекти-

ровал механический телеуправляемый манипулятор для работы с радиоактивными веществами, исключая непосредственный контакт с ними человека. Несколько лет спустя был создан первый промышленный робот «Unimate», использовавшийся для сварки и литья на заводах компании General Motors [5].

История роботов в медицине

Именно «Unimate» послужил прообразом первого робота, использовавшегося в медицине. В 1977 году В. Шайнман сконструировал роботическую систему PUMA 560 (Programmable Universal Machine for Assembly), которая была усовершенствована и использована в 1985 году в нейрохирургии для точного направления движения иглы при проведении биопсии головного мозга человека [6]. Этот момент считается отправной точкой в истории медицинских роботов. В 1988 году уролог Джон Уикхэм, которому принадлежит термин «минимально инвазивная хирургия», совместно с Брэйном Дэвисом из Имперского колледжа Лондона представил роботическую систему PROBOT, созданную специально для проведения трансуретральной резекции предстательной железы. Первая операция с использованием данной системы была успешно выполнена в Лондоне в 1991 году [7]. Годом позже компанией Integrated Surgical Systems была представлена хирургическая система ROBODOC для использования в ортопедии при эндопротезировании тазобедренного сустава [8]. В дальнейшем подобные устройства были разработаны для использования при замене коленного сустава (Acrobot, The Acrobot Company, Ltd., Лондон, Великобритания) и в хирургии височной кости (RX-130, Staubli Unimation Inc., Faverges, France), которые используются по сей день [9].

В 1993 году компанией Computer Motion Inc. было представлено роботизированное устройство для фиксации и изменения положения видеокamеры при проведении лапароскопических операций, которое получило название Aesop («Эзоп»). Хирургический комплекс прикреплялся к операционному столу или тележке и перемещал эндоскоп при помощи голосового управления либо позволял устанавливать эндоскоп вручную [5]. В 1995 году компания Computer Motion Inc. объединила два робота-манипулятора с инструментами и Aesop для создания системы ZEUS («Зевс»). Манипуляторы-руки роботического комплекса были телеуправляемы хирургом, который совершал движения с помощью инструментов управления («мастер-рук» или джойстиков) на консоли хирурга. Технически ZEUS не являлся роботом, поскольку

он не следовал запрограммированным движениям, а скорее был компьютерным телеманипулятором с интерактивными роботизированными руками. Чтобы повысить точность движения инструмента, ZEUS отфильтровывал тремор рук и мог масштабировать размашистые движения руки хирурга в короткие и точные движения инструмента. Хирургическая система ZEUS использовалась при проведении первой в истории трансатлантической хирургической операции (операции Линдберга). 7 сентября 2001 года французский профессор, хирург J. Marescaux из Нью-Йорка (США) выполнил холецистэктомию пациенту, находившемуся на расстоянии в несколько тысяч километров, в г. Страсбург (Франция) [10].

В 1999 году компания Intuitive Surgical Inc. (США) ввела в эксплуатацию роботическую хирургическую систему da Vinci. Как и ZEUS, da Vinci представляет собой телеуправляемую систему, которая состоит из трех компонентов:

- консоль хирурга, на которой расположены средства управления манипуляторами;
- тележка пациента, снабженная четырьмя руками-манипуляторами, одна из которых служит для фиксации эндоскопа, изображение с которого передается на монитор, встроенный в консоль хирурга, остальные же предназначены для фиксации инструментов;
- эндовидеохирургическая стойка.

Точность движения механических манипуляторов превосходит возможности рук человека, поскольку они имеют семь степеней свободы и способность изгиба на 90 градусов. На экран выводится 3D-изображение оперируемого участка. Хирург управляет манипуляторами с помощью сенсорных джойстиков, причем движения хирурга с абсолютной точностью воспроизводятся роботическими инструментами, обеспечивая улучшенную артикуляцию, которая увеличивает простоту наложения швов и позволяет выполнять сложнейшие манипуляции с максимальной точностью. В конечном итоге это обеспечивает высокое качество операции и повышает безопасность ее проведения. Несколько лет компания Computer Motion конкурировала с Intuitive Surgical, но в июне 2003 года произошло объединение двух компаний в Intuitive Surgical Inc., после чего было закрыто производство систем ZEUS и модернизировано производство Da Vinci [11].

Современные роботы в различных областях медицины

В 2001 году начались первые клинические исследования аппарата CyberKnife — кибернож (Accuray Inc., г. Саннивейл, Калифорния, США). Он представ-

ляет собой минимально инвазивную радиохирургическую роботизированную систему, используемую для лечения опухолей черепа и позвоночника (а также рака предстательной железы, легких, печени и поджелудочной железы) с использованием линейных ускорителей. В системе используются контроль по изображению и робот-манипулятор с компьютерным управлением, позволяющие непрерывно отслеживать перемещения опухоли и пациента на протяжении процедуры и производить соответствующие корректирующие действия. Благодаря своей исключительной точности системе не требуются инвазивные рамки для фиксации головы или других частей тела пациента, что значительно повышает гибкость системы. Радиохирургическая система обладает возможностью онлайн-трекинга мишени и облучения с синхронизацией дыхания. Эта система признана стандартной технологией радиотерапии онкологических заболеваний, более 100 000 пациентов проходят лечение по всему миру. CyberKnife является примером коммерчески доступного и широко используемого безрамного радиохирургического робота [12].

В 2007 году компанией Endocontrol (Франция) была разработана первая роботизированная система для лапароскопической хирургии с голосовым управлением, получившая название VIKY, которая используется в гинекологии, общей хирургии, урологии, торакальной хирургии и насчитывает порядка 150 устройств по всему миру [13].

В том же году была представлена роботизированная магнитная навигационная система Niobe (Stereotaxis, США) для эндоваскулярных операций на сердце, а также эндоскопических манипуляций в гастроэнтерологии (капсульная эндоскопия). Система состоит из двух магнитов с роботизированным управлением рядом с операционным столом. Во время процедуры врач использует 3D-навигацию, интуитивный компьютерный интерфейс для настройки магнитного поля вокруг пациента, что позволяет точно направлять движение катетера либо капсулы со встроенным магнитом [14].

Компания Hansen Medical в 2007 году выпустила специализированную роботическую систему для Sensei для проведения эндоваскулярных транскатетерных вмешательств на сердце, в частности коррекции наджелудочковой тахикардии, трепетания предсердий, а также сложных процедур аблации для лечения фибрилляции предсердий. Также, как и у системы Niobe, имеется удаленное управление, обеспечивающее стабильность, точное позиционирование и проведение катетера, однако интегрированной навигационной системой у Sensei является 3D-картирование, флюороскопия и УЗИ.

В 2009 году на базе Sensei была создана усовершенствованная система для эндоваскулярных вмешательств — Magellan. Еще одним примером этой группы медицинских роботов является система CorPath GRX, созданная несколькими годами позже компанией Corindus Vascular Robotics (США) [15, 16].

2009 год ознаменовался дальнейшим развитием управляемых гибких катетеров для эндолюминального доступа и работы в ограниченных областях, недоступных для ригидной лапароскопии.

В 2011 году американской компанией Mazor Robotics был разработан специализированный роботизированный комплекс Renaissance для нейрохирургии. Система предоставляет врачам возможность, благодаря специальной программе, заранее спланировать все этапы оперативного вмешательства, продумать размеры необходимых имплантатов и фиксирующих материалов. После установки роботической платформы непосредственно на позвоночный столб пациента и синхронизации разработанного хирургического плана с текущим положением платформы выполняется запланированный объем хирургического вмешательства с максимальной прецизионностью — до 1,5 мм. На данный момент большая часть мирового опыта выполнения роботизированных вмешательств на позвоночнике связана именно с Renaissance [17].

С течением времени приоритетным направлением в медицинской робототехнике становится создание более компактных, легких и безопасных роботических систем с усовершенствованным искусственным интеллектом, которые легко могут быть интегрированы в клинический рабочий процесс. Благодаря разработкам в сфере узкоспециализированных хирургических роботов в 2009–2013 годах миру были представлены ортопедические роботические системы Mako (Stryker, США) и Navio (Smith & Nephew, Великобритания). Оба аппарата представляют собой полуактивные роботизированные системы, используемые для замены коленного сустава. Mako использует 3D-модель коленного сустава пациента для предоперационного планирования хирургического вмешательства. Система обеспечивает как слуховую, так и тактильную обратную связь, ограничивая рабочее пространство бура. Navio не использует предоперационное КТ-сканирование, поскольку система постоянно отслеживает как анатомию пациента, так и роботизированное устройство с помощью инфракрасной камеры и оптических приборов. Mako является параллельным манипулятором (хирург и робот работают вместе для перемещения инструмента), Navio является последовательным манипулято-

ром (хирург удерживает и перемещает робота, который перемещает инструмент) [18].

В 2015 году Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA) была одобрена технология Flex Robotic System (Medrobotics, США), которая является первой специализированной хирургической платформой, основанной на управляемом и настраиваемом объеме робототехники, который обеспечивает доступ через естественные пути в отоларингологии и колоректальных процедурах. Гибкий многорульный эндоскоп, управляемый через единую точку доступа, может быть проведен по нелинейным извилистым анатомическим путям. Когда интересующая область достигнута, роботизированный эндоскоп становится жестким и служит устойчивой платформой, на которой визуализируются и управляются гибкие инструменты [19]. Еще одной роботической системой, применяющейся в ЛОР-хирургии, является μ RALP, разработанная Mattos и коллегами в 2015 году для микрохирургического лазерного лечения поражений гортани [20]. По тому же принципу работают и созданный в 2011 году J. Shang с коллегами робот i-Snake, и разработанный несколько позднее Micro-IGES, который уже прошел клинические испытания, нашедший себе применение в хирургическом лечении поражений желудочно-кишечного тракта, верхних дыхательных путей и бронхов [21]. Еще одной перспективной разработкой в области роботической эндоскопии является представленная в 2018 году компанией Auris Health Inc. система Monarch. Данная роботическая система создана для проведения диагностической и лечебной бронхоскопии, она обеспечивает доступ в бронхи субсегментарного порядка и, благодаря 3D-МСКТ-навигации в сочетании с изображением в высоком разрешении, передаваемым с эндоскопа, а также эргономичному управлению, позволяет выполнить прицельную биопсию периферических образований легких [22].

Роботы-хирурги

В 2018 году на симпозиуме Хэмлина в Лондоне компания Intuitive Surgical Inc. презентовала роботический хирургический комплекс нового поколения — Da Vinci SP, пришедший на смену предыдущим поколениям: da Vinci Xi, da Vinci X и da Vinci Si, которых на сегодняшний день в мире больше всего. Что касается генерации da Vinci S, da Vinci Standard, с 2018 года их техническое обслуживание прекратилось. Новейшая система da Vinci SP создана для однопортовой хирургии, т. е. через разрез длиной 2,5 см устанавливается единственный троакар, через который вводятся все 3 инструмента и эндоскоп,

причем и эндоскоп, и хирургические инструменты являются гибкими. Данные преимущества позволяют осуществлять доступ к анатомическим образованиям в пределах 360 градусов из одного порта, минимизировать инвазивность процедуры, а также существенно повысить эффективность трансоральных хирургических вмешательств [23].

В большинстве развитых стран мира уже достаточно давно ведутся разработки роботических систем для хирургии, чтобы создать продукт, который будет способен конкурировать с *da Vinci*, при этом инженеры стараются компенсировать недостатки уже известных систем и стремятся создать идеальную.

Одним из таких комплексов является созданный компанией TransEnterix (США) аппарат *Senhance*. Он представляет собой роботизированную платформу консольного типа, состоящую из пульта дистанционного управления, манипуляторов и узла соединения. Каждый из трех манипуляторов-рычагов установлен на отдельной тележке. Манипуляторы лапароскопического типа обеспечивают тактильную обратную связь от рычагов с тросовым приводом, которые обеспечивают 7 степеней свободы. На экран выводится 3D-изображение в высоком разрешении, имеется встроенная система управления камерой, которая центрирует изображение в точке, на которую смотрит хирург. Аппарат *Senhance* одобрен FDA в 2017 году и успешно применяется главным образом в гинекологии и колоректальной хирургии [24].

Еще один представитель Нового Света — *SPORT* (Single Port Orifice Robotic Technology) — однопортовая роботизированная хирургическая система (*Titan Medical Inc.*, Канада), которая состоит из рабочей станции и роботизированной платформы, управляемой хирургом с помощью ручных контроллеров, ножных педалей и сенсорного 3D-HD-экрана. Для операций используются гибкие многосуставные инструменты и эндоскоп. Хорошие результаты использования системы *SPORT* продемонстрированы в экспериментах на животных моделях [25].

В стадии разработки находятся системы *SurgiBot* и *SPIDER* (обе — компания TransEnterix, США) — роботизированные комплексы для однопортовой минимально инвазивной хирургии. Хирурги используют гибкие контролируемые инструменты, вводимые через единственный эндопорт. Обе роботизированные системы позволяют размещать несколько инструментов в рабочем канале, а также обеспечивают трехмерную визуализацию, эргономичное управление и точность движений с масштабированием. Главной целью создания этих

систем является обеспечение хирургическими роботами регионов с недостаточным их количеством с минимальными затратами на приобретение [26].

Одним из европейских проектов является роботический хирургический комплекс консольного типа *MiroSurge* (RMC, DLR, Немецкий аэрокосмический центр, Германия). Представляет собой систему телеманипулируемой малоинвазивной роботизированной хирургии, включающую в себя 3–5 индивидуальных инструментов с несколькими режимами управления и возможностью установки в различных позициях на направляющих операционного стола [27]. Также к европейским разработкам относится система *Versius* (*Cambridge Medical Robotics Ltd.*, Великобритания) — это легкая модульная роботизированная система, предназначенная для лапароскопических операций на верхней части желудочно-кишечного тракта, для гинекологических, колоректальных операций и операций на почках. Модульная конструкция обеспечивает гибкость и универсальность позиционирования в операционной, в то же время имеется возможность подключения многочисленных инструментов к манипуляторам [28].

Весьма перспективной представляется совместная разработка компаний Google и Ethicon — «*Verb Surgical*». Она представляет собой систему для консолидации данных, получаемых от роботических хирургических систем всех производителей по всем пациентам из медицинских учреждений (истории болезни, мед. карты) от врачей различных специальностей, для создания «идеального» роботического комплекса с системой «умной» визуализации, способностью к самообучению и самопроверке, универсального для пациента и для врача, а также для оптимизации цены [29].

Классификация медицинских роботов

С появлением медицинских роботизированных технологий появились новые термины. В частности, телехирургия — использование при хирургическом вмешательстве устройств «ведущий–ведомый», в которых ведущий и ведомый компоненты физически разделены. Хирург, который располагается на удаленном расстоянии от операционного стола осуществляет активное управление инструментами. Обмен данными между консолью хирурга и инструментами происходит по телекоммуникационной линии. Хотя устройства «ведущий–ведомый» обычно находятся в одном и том же помещении во время операции, процедура может быть выполнена с помощью хирургической консоли, расположенной в другой комнате или даже в другом регионе.

Сегодня всех существующих хирургических роботов можно разделить следующим образом:

- Пассивные роботы — не обладают автономией. Управляются вручную, самостоятельно движений не выполняют (например, Neuronavigator).
- Телеуправляемые роботы — не обладают автономией. Удерживают хирургические инструменты, которыми управляет человек дистанционно (например, da Vinci).
- Полуактивные (взаимодействующие) роботы — «истинные роботы-ассистенты». Оператор постоянно контролирует систему. Робот обеспечивает некоторое управление. Примеры включают роботов с виртуальными функциями (полуактивные — Renaissance, Navio; взаимодействующие — Mako).
- Активные роботы, обладающие автономностью в рамках конкретной задачи. Оператор осуществляет дискретный контроль, робот выполняет определенное задание автономно, но с инициативы оператора (например, ROBODOC).
- Активные роботы, которые автономно выполняют запланированное движение, условно автономные роботы. Оператор строит и подтверждает хирургический план/план лечения. Робот выполняет процедуру автономно под контролем оператора (например, CyberKnife).

Будущее роботической хирургии

- Роботы с высоким уровнем автономии — роботы способные принимать медицинские решения под контролем человека (на данный момент не существуют).
- Полностью автономные роботы, способные выполнять хирургическое вмешательство полностью без участия человека (на данный момент — научная фантастика).

Также медицинских роботов можно разделить по сфере их применения:

1. Хирургические роботы.

- Нейрохирургические — использующиеся при хирургических вмешательствах на позвоночном столбе и головном мозге (Neuromate, Renaissance).
- Эндоскопические — использующиеся при бронхоскопии (Auris Monarch), интрапросветных манипуляциях в ЛОР-хирургии (μ RALP), манипуляциях на органах ЖКТ и верхних дыхательных путях (Flex Robotic System, i-Snake).
- Эндоваскулярные — управляемые гибкие катетеры для проведения эндоваскулярных вмешательств на сердце и сосудах (Magellan, Niobe, Sensei, CorPath).
- Роботы для радиохирургии — CyberKnife.

- Универсальные лапароскопические роботы — телеуправляемые манипуляторы (Aesop/ZEUS, VIKY, Da Vinci).

2. Вспомогательные медицинские роботы.

- Реабилитационные — роботы ухода (Riba), роботы-компаньоны (PARO), роботы-экзоскелеты (ALEX, LOPES, RUPERT).
- Фармакологические — роботы-фармдиспенсеры (RPDS), роботы для таргетной доставки лекарственных препаратов через кровотоки (микро-роботы/микророботы/нанороботы).
- Обслуживающие (госпитальные) роботы — роботы для дезинфекции (Xenex Robot), роботы для наблюдения, обучения и телеприсутствия (InTouch tele-robotic system), автономные мобильные манипуляторы, для транспортировки медикаментов, оборудования, расходных материалов (TUG), социальные роботы-администраторы/секретари, способные распознавать десятки языков (Pepper, Nao).

3. Другие медицинские роботы.

- Роботическая система для пересадки волос (ARTAS).
- Робот для венопункции (Veebot).
- Роботические системы для реанимационных отделений (The AutoPulse Plus, LS-1).

Хирургия Da Vinci сегодня

В последние годы начала появляться конкуренция на рынке медицинских роботов, наиболее серьезными из потенциальных противников Intuitive Surgical являются компании TransEnterix, Titan Medical, Accuray, MAKO Surgical, Mazor Robotics, Hansen Medical и др. Несмотря на это, на данный момент именно компания Intuitive Surgical уже на протяжении длительного времени является фактически монополистом на мировом рынке роботизированных хирургических комплексов, во многом благодаря огромному количеству запатентованных технологий, использующихся в da Vinci. Компания обладает более 1700 национальных и международных патентов на технологии.

С тех пор как в 2000 году Управление по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США дало разрешение на проведение с помощью хирургического робота da Vinci операций, da Vinci является единственной в мире универсальной роботизированной системой с дистанционным управлением, распространенной и широко используемой на всех континентах. По данным Intuitive Surgical Inc., на сегодняшний день в мире установлено почти 5500 роботических хирургических систем da Vinci, из них около 3000 — в США, порядка 900 — в странах Европы.

Число выполняемых робот-ассистированных операций растет с каждым годом, на данный момент в мире выполнено более 6 000 000 роботических операций. Первый в России и странах СНГ роботический хирургический комплекс da Vinci был установлен в 2007 году в Свердловской областной клинической больнице № 1, где 4 ноября того же года была выполнена первая робот-ассистированная операция. На данный момент в России установлено в общей сложности 33 роботических хирургических комплекса, выполнено более 16 500 операций.

Валидация роботической хирургической системы da Vinci началась с кардиохирургии, однако в настоящее время лидирующими специальностями по применению данной технологии являются урология, гинекология и общая хирургия. Помимо этих специальностей, уже осуществляется либо планируется применение da Vinci в торакальной и кардиохирургии, колоректальной хирургии, ЛОР-хирургии, ортопедии. В России порядка 66 % всех робот-ассистированных операций выполняется урологами.

Неуклонно растет число публикаций по роботической хирургии. В 2017 год количество публикаций, связанных с роботической хирургией составляло более 13 500, причем количество публикуемых статей возросло до 2000 за год. За последние годы появились в том числе и длительные сравнительные многоцентровые исследования, мета-анализы и рандомизированные контролируемые исследования, доказывающие эффективность и безопасность роботической хирургии.

Робот-ассистированные операции

Робот-ассистированная радикальная простатэктомия

В нашей стране хирургическое лечение локализованного рака предстательной железы включает открытую радикальную простатэктомию (ОРП), которая может быть выполнена позадилобным либо промежностным способом, лапароскопическую радикальную простатэктомию (ЛРП) и робот-ассистированную радикальную простатэктомию (РАРП). Долгое время ОРП являлась «золотым стандартом» лечения локализованного рака предстательной железы, обеспечивающим удовлетворительные онкологические и функциональные результаты [30]. В нашей стране ОРП является наиболее распространенным методом лечения локализованного рака простаты, операция выполняется во многих регионах России на протяжении многих лет. Основными недостатками данного метода являются травматичность и сравнительно большой объем кровопотери. ЛРП была впервые выполнена в 1991 году W. Schuessler с коллегами. В течение десятилетия методика претерпевала различные модификации и в конечном итоге, по мере накопления опыта, в начале 2000-х, стала альтернативой открытой хирургии. В России первая ЛРП была выполнена в 2000 году В. Л. Медведевым. С середины 2000-х годов ЛРП успешно применялось в России в хорошо оснащенных экспертных клиниках. В 2000 году в США была выполнена первая РАРП [31]. В России данное вмешательство было выполнено впервые в 2008 года



Рис. 1. Робот-ассистированная операция в НМИЦ им. В. А. Алмазова



**Рис. 2. Начало робот-ассистированной резекции почки (оперирует профессор М. С. Мосоян).
Этап установки эндопортов и «докинг» роботического хирургического комплекса**

в клинике урологии Московского государственного медико-стоматологического университета им. А. И. Евдокимова. Оперировал американский роботический хирург V. Patel совместно с главным урологом Минздрава России Д. Ю. Пушкарём. Первые результаты были опубликованы в 2010 году. Профессор Д. Ю. Пушкарё и соавторы представили свои данные по 80 РАРП, причем результаты лечения были схожи с аналогичными, достигнутыми при внедрении роботической программы за рубежом [32]. Первая робот-ассистированная простатэктомия в Северо-Западном регионе была выполнена в НМИЦ им. В. А. Алмазова. На сегодняшний день Центр Алмазова — одно из российских учреждений, которое имеет большой опыт по проведению данной операции (рис. 1).

Робот-ассистированная резекция почки

Несмотря на то, что «золотым стандартом» лечения локализованного рака почки долгое время считалась радикальная нефрэктомия, на сегодняшний день органосохраняющие вмешательства на почке приняты в качестве стандартного подхода при опухолях почек, поскольку обеспечивают лучшие функциональные результаты, а также связаны с меньшим риском возникновения кардиоваскулярных осложнений [33]. Ранее считалось, что выполнение резекции почки целесообразно только при опухолях маленьких размеров либо при опухоли единственной функционирующей почки, однако позднее показания к органосохраняющим

операциям при почечно-клеточном раке расширились — в настоящее время в медицинских центрах экспертного класса выполняются резекции почки при здоровой контралатеральной почке, при крупных новообразованиях почек, в том числе до 7 см в наибольшем измерении [34]. В 1993 году Н. N. Winfield впервые сообщил о лапароскопической резекции почки, впоследствии многие авторы докладывали об успешных долгосрочных онкологических и не онкологических результатах минимально инвазивной резекции почки при опухолях. С момента, когда было сообщено о первом успешном опыте робот-ассистированной резекции почки (РРП) [35], было опубликовано множество исследований, доказывающих выполнимость, эффективность и безопасность данного вмешательства. Первая РРП в России была выполнена в 2010 году в Санкт-Петербурге профессором Д. Ю. Семеновым (совместно с М. С. Мосояном, С. Х. Аль-Шукри), позднее было сообщено об успешных результатах лечения 4 пациентов (рис. 2) [36]. На данный момент РРП, по сравнению с открытой резекцией почки, обеспечивает сопоставимые онкологические и функциональные результаты при меньших рисках развития периоперационных осложнений (по Clavien-Dindo). По сравнению с ЛРП, РРП связана с меньшим риском интраоперационных осложнений, а также лучшим сохранением функции почки [37].

На сегодняшний день именно робот-ассистированная радикальная простатэктомия и робот-ас-

систированная резекция почки являются наиболее распространенными урологическими вмешательствами, выполняемыми в России.

Другие робот-ассистированные урологические операции

Робот-ассистированная радикальная нефрэктомия (РАНЭ). Несмотря на то, что в последние годы были существенно расширены показания для органосохраняющих операций при раке почки, радикальная нефрэктомия выполняется повсеместно, при опухолях стадии T2, а также при определенных характеристиках опухоли, не позволяющих планировать органосохраняющее лечение. РАНЭ была впервые описана D. W. Klinger и соавторами [38]. В России данное вмешательство было впервые осуществлено в 2010 году в Центре Алмазова. С тех пор в нашей стране накоплен большой опыт выполнения подобных вмешательств, они проводятся практически во всех медицинских центрах, имеющих комплексы da Vinci, демонстрируя удовлетворительные онкологические и функциональные результаты в сравнении с открытой методикой, при этом обладая всеми преимуществами минимально инвазивной хирургии [36].

Робот-ассистированная пиелопластика (РАП). Робот-ассистированная пластика пиелоретерального сегмента успешно выполняется с 2001 года. Первым хирургом, выполнившим такое вмешательство, является австриец M. Gettman, опубликовавший в 2002 году результаты лечения 9 пациентов, доказав тем самым эффективность и безопасность методики [39]. Впоследствии было опубликовано множество исследований, в том числе многоцентровых, согласно которым выполнение РАП целесообразно, связано с минимальной послеоперационной морбидностью и имеет многообещающие показатели проходимости и долгосрочные результаты [40]. В России робот-ассистированная пиелопластика выполняется в нескольких учреждениях, однако эти операции выполняются гораздо реже, чем роботические вмешательства при раке почки и предстательной железы.

Робот-ассистированная радикальная цистэктомия/цистопростатэктомия (РАРЦ). В 2003 году M. Menon выполнил первую робот-ассистированную радикальную цистопростатэктомию у мужчины с мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря. В том же году выполнена цистэктомия у женщины, причем отведение мочи осуществлялось как путем формирования илеокондуита, так и путем создания ортотопического мочевого пузыря [41]. В настоящее время имеются данные, в том числе

рандомизированных контролируемых исследований, которые гласят, что РАРЦ связана с меньшей послеоперационной морбидностью, а также меньшей длительностью госпитализации по сравнению с открытым методом при аналогичных онкологических результатах [42]. В нашей стране РАРЦ выполняется всего в нескольких центрах.

Робот-ассистированная радикальная нефрэктомия с тромбэктомией из нижней полой вены. Впервые данная операция была описана в 2011 году R. Abaza, который имеет наибольший опыт в мире по таким вмешательствам. Позднее было опубликовано многоцентровое исследование, по данным которого роботизированная нефрэктомия, при наличии опухолевого тромба в нижней полой вене, является приемлемым методом хирургического лечения и может быть выполнена безопасно и эффективно у отобранных пациентов. Несмотря на техническую сложность вмешательства, в данном исследовании демонстрируются благоприятные результаты и воспроизводимость при должном опыте в роботической хирургии [43]. В России робот-ассистированная радикальная нефрэктомия с тромбэктомией из нижней полой вены с предварительной эндоваскулярной эмболизацией почечной артерии впервые была успешно выполнена в 2017 году в НМИЦ им. В. А. Алмазова д.м.н. М. С. Мосояном [44]. Всего, по нашим данным, в России выполнено 2 подобных операции, обе — в Центре Алмазова.

Робот-ассистированная аденомэктомия. Робот-ассистированная аденомэктомия впервые была описана в 2008 году R. Sotelo с соавторами [45]. По данным недавних мета-анализов, роботизированная аденомэктомия представляет из себя приемлемый способ лечения гиперплазии предстательной железы при большом объеме простаты, потенциально связана с меньшей инвазивностью, более коротким временем катетеризации и длительностью госпитализации, а также с более низкой общей стоимостью лечения [46]. В России данная техника пока не нашла широкого применения.

Робот-ассистированная адреналэктомия. Техника операции описана в 2002 году урологом I. S. Gill [47]. Недавние систематические обзоры и мета-анализы современных данных показывают, что робот-ассистированная адреналэктомия может быть выполнена безопасно и эффективно с сопоставимой с лапароскопической адреналэктомией длительностью операции и частотой осложнений. Кроме того, роботизированная техника может обеспечить потенциальное преимущество в виде меньшей длительности госпитализации и меньшей кровопотери, однако связана с большей стоимо-

стью [48]. В России одними из первых учреждений, где начали выполнять подобные оперативные вмешательства, стали: НМХЦ им. Н. И. Пирогова, НМИЦ хирургии им. А. В. Вишневского (г. Москва) и НМИЦ им. В. А. Алмазова (г. Санкт-Петербург). Причем эти вмешательства выполняются в подавляющем большинстве общими хирургами [49].

Сообщалось также о нескольких успешных случаях выполнения в центрах экспертного уровня роботического уретероцистонеоанастомоза и нефроретерэктомии с резекцией стенки мочевого пузыря, а также робот-ассистированных операций по поводу внеорганных образований малого таза, мегауретера и неинвазивных опухолей мочевого пузыря [50]. В 2020 году уникальная операция была проведена в НМИЦ им. В. А. Алмазова — девятилетнему ребенку было выполнено робот-ассистированное удаление гигантского дивертикула мочевого пузыря. Операцию проводил профессор М. С. Мосоян совместно с командой детских хирургов.

Робот-ассистированные операции в гинекологии

Управление по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США одобрило роботическую хирургическую систему для гинекологических операций в 2005 году, и в настоящее время гинекологические операции, наряду с урологическими, являются наиболее распространенными хирургическими процедурами, выполняемыми с помощью робота da Vinci в мире.

На сегодняшний день наиболее часто выполняемыми роботизированными операциями при доброкачественных заболеваниях женских половых органов являются гистерэктомия, миомэктомия, реанастомоз маточных труб при бесплодии, сакрокольпопексия при пролапсе тазовых органов, хирургическое лечение урогенитальных свищей, а также эндометриоза. Робот-ассистированные вмешательства при данных патологиях являются эффективными и безопасными, результаты сопоставимы с открытыми и лапароскопическими методиками [51, 52]. В онкогинекологии роботические операции выполняются при раке эндометрия, шейки матки и яичников. Робот-ассистированная радикальная гистерэктомия с тазовой лимфаденэктомией является выполнимой, эффективной и безопасной процедурой и связана с меньшей длительностью госпитализации и меньшей послеоперационной морбидностью. Недавние мета-анализы и вышедшие рандомизированные исследования показывают, что робот-ассистированный подход обеспечивает меньшую кровопотерю, меньший койко-день и меньший риск развития периопера-

ционных осложнений при большей стоимости лечения [53]. Современные данные свидетельствуют о том, что робот-ассистированная хирургия является безопасным методом лечения рака эндометрия, особенно у тучных женщин, однако требуется больше данных по общей и безрецидивной выживаемости. Кроме того, сообщения о клинических случаях показывают, что робот-ассистированная трахелэктомия может обеспечить удовлетворительные результаты у женщин, стремящихся сохранить фертильность, из-за лучшей визуализации сосудистых структур и соединительной и жировой тканей параметрия, которые должны быть изолированы во время процедуры. Что касается рака яичников, доказательств использования робот-ассистированной хирургии все еще недостаточно, но у отдельных пациенток с ранней стадией заболевания роботический метод может иметь преимущества. Тем не менее применение малоинвазивной хирургии у пациенток с поздней стадией или рецидивом рака яичников требует дальнейшего изучения.

В России наибольший опыт робот-ассистированных гинекологических операций принадлежит Московскому областному научно-исследовательскому институту акушерства и гинекологии. С 2013 года в учреждении выполнено более 450 операций, в числе которых сакрокольпопексия, гистерэктомия, пангистерэктомия с тазовой лимфодиссекцией, миомэктомия, метропластика, хирургическое лечение эндометриоза, циркуляж матки и т. д. Учитывая специфику работы ГБУЗ МО МОНИ-ИАГ, большинство роботических операций в клинике выполняется по поводу выпадения женских половых органов [54].

Первая гинекологическая роботическая операция несовершеннолетней пациентке была выполнена 14 ноября 2018 года. Шестнадцатилетней пациентке было успешно проведено робот-ассистированное удаление образования яичника интегративной бригадой взрослых и детских врачей-хирургов НМИЦ им. В. А. Алмазова: акушерами-гинекологами медицинским директором клиники Института перинатологии и педиатрии д.м.н. Э. В. Комличенко, и заведующей отделением гинекологии для детей и подростков Детского лечебно-реабилитационного комплекса д.м.н. Надеждой Анатольевной Кохреидзе.

Робот-ассистированные операции в общей хирургии

Роботическая хирургия к этому моменту хорошо зарекомендовала себя в лечении колоректального рака. Анализ современных данных свидетельствует о том, что робот-ассистированная колорек-

тальная хирургия обладает преимуществами над лапароскопической методикой, поскольку имеет меньший риск конверсии при сопоставимых онкологических результатах [55]. В последнее время появляются также данные об успешном использовании роботической хирургии в лечении воспалительных заболеваний кишечника — болезни Крона и неспецифического язвенного колита, причем робот-ассистированные операции при таких заболеваниях обеспечивают сопоставимые функциональные результаты, периоперационную морбидность и частоту конверсий при большей длительности вмешательства [56]. Имеются данные рандомизированных исследований, демонстрирующие эффективность и безопасность, а также сопоставимую длительность операции при выполнении робот-ассистированной вентральной ректопексии при пролапсе и инвагинации прямой кишки.

Использование робота da Vinci при хирургической патологии растет, в частности в лечении онкологических заболеваний желудка, пищевода, поджелудочной железы, печени, кишечника [57]. Также за последнее десятилетие все чаще робот da Vinci применяется в бариатрической, гепатобилиарной и эндокринной хирургии, а также в лечении грыж и хирургии пищевода, несмотря на то, что роботизированный подход обычно редко использовался для этих процедур [58, 59].

На сегодняшний день наибольший опыт в нашей стране по общехирургическим робот-ассистированным операциям имеют сотрудники НМХЦ им. Н. И. Пирогова, НМИЦ хирургии им. А. В. Вишневского (оба центра — г. Москва), а также Городской больницы № 40 (г. Санкт-Петербург). В данных центрах выполняются в том числе роботические вмешательства при колоректальном раке, опухолях двенадцатиперстной кишки и поджелудочной железы [60–62].

Другие робот-ассистированные хирургические вмешательства

Наибольший опыт в торакальных робот-ассистированных вмешательствах в нашей стране накоплен в Национальном медицинском исследовательском центре имени академика Е. Н. Мешалкина, Национальный медико-хирургический центр имени Н. И. Пирогова, а также в Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии. Производятся вмешательства при опухолях легких, плевры и средостения, а в ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России производится также хирургическое лечение туберкулеза легких [63, 64].

В нескольких учреждениях в нашей стране выполняются роботические сердечно-сосудистые

операции. Так, в 2010 году впервые в России и Восточной Европе на базе НМХЦ им. Н. И. Пирогова выполнено робот-ассистированное коронарное шунтирование на работающем сердце, а затем — робот-ассистированная имплантация электродов электрокардиостимулятора [65, 66].

В 2018 году первый опыт нескольких роботических сосудистых операций был представлен клиникой Башкирского государственного медицинского университета (г. Уфа). Исходя из первичных результатов, использование роботического хирургического комплекса da Vinci позволяет выполнять сосудистые операции с минимальной кровопотерей и травматизацией тканей, что в свою очередь способствует сокращению послеоперационного и восстановительного периода после подобных вмешательств [67].

Роботические операции на органах головы и шеи, в том числе трансоральная роботическая хирургия (TORS), в нашей стране пока широко не применяются, хотя первый опыт подобных вмешательств уже описан [68].

Роботическая хирургия в НМИЦ им. В. А. Алмазова

Один из первых в нашей стране роботический хирургический комплекс был установлен в 2009 году в Федеральном Центре сердца, крови и эндокринологии имени В. А. Алмазова (ныне — НМИЦ им. В. А. Алмазова), где выполнять высокотехнологичные вмешательства начали общие, торакальные хирурги, урологи, а также гинекологи.

Именно в Центре Алмазова в 2010 году была выполнена первая в России робот-ассистированная резекция почки. С этого момента в Центре регулярно выполняются урологические роботические операции, главным образом радикальные простатэктомии, резекции почки, радикальные нефрэктомии, пиелопластики. До 2017 года урологические пациенты лечились в отделении хирургических методов лечения онкологических больных.

В 2016 году в НМИЦ им. В. А. Алмазова образована первая в России кафедра урологии с курсом роботической хирургии, структурными подразделениями которой являются урологическое отделение на 15 коек с консультативно-диагностическим подразделением поликлиники, центр роботической хирургии, открытые в 2017 году.

В настоящее время в центре роботической хирургии продолжается выполнение сложнейших, высокотехнологичных операций в регулярном режиме. Благодаря мощнейшей анестезиологической и кардиологической поддержке НМИЦ им.



Рис. 3. Профессор М. С. Мосоян за хирургической консолью da Vinci

В. А. Алмазова, специалисты центра роботической хирургии оказывают квалифицированную помощь пациентам с выраженной сопутствующей патологией, в частности кардиоваскулярной, которым зачастую отказывают другие медицинские учреждения. Ежегодно только урологической бригадой выполняется порядка 150 робот-ассистированных вмешательств. Результаты лечения не уступают ведущим европейским клиникам.

Кафедра урологии с курсом роботической хирургии

Кафедра урологии с курсом роботической хирургии лечебного факультета Института медицинского образования Центра Алмазова является первой подобной кафедрой в России.

С момента основания в 2016 году кафедрой заведует д.м.н. профессор Мкртич Семенович Мосоян, который также является медицинским директором клиники урологии и роботической хирургии и бессменным руководителем центра роботической хирургии (рис. 3). Профессор М. С. Мосоян является опытным роботическим хирургом, на его счету более 1500 вмешательств, официальным экспертом Intuitive Surgical da Vinci в России, автором более 70 научных трудов. Профессор М. С. Мосоян обучил более 70 % всех роботических хирургов-урологов в стране, в том числе в клиниках Санкт-Петербурга (Городская больница № 40, г. Сестрорецк), Москвы (Клиническая больница Управления делами Президента Российской Федерации, Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, МГМСУ им. А. И. Евдокимова, Центральная клиническая больница гражданской

авиации), Краснодара (Краевая клиническая больница № 1), Ростова-на-Дону (КДЦ «Здоровье»), Ханты-Мансийска (Окружная клиническая больница), Уфы (Клиника урологии Башкирского государственного медицинского университета).

Клиническими базами кафедры являются урологическое отделение и центр роботической хирургии, а также урологическое подразделение клиничко-диагностического центра НМИЦ им. В. А. Алмазова, урологические отделения Городской больницы № 26, Госпиталя для ветеранов войн, Ленинградской областной клинической больницы, НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, а также Городской поликлиники № 51.

Кроме того, активно развивается сотрудничество с кафедрой урологии ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, кафедрой урологии Военно-медицинской академии имени С. М. Кирова, отделением урологии медицинского центра «Измилрян» (Республика Армения), клиникой урологии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова. Приглашенными специалистами для проведения лекций, авторских циклов и мастер-классов являются мировые эксперты: президент Американской урологической ассоциации, профессор Ричард Бабаян (США), профессор Вальтер Артибани (Италия), профессор Пьер-Тьерри Пешо (Франция), профессор Ян Шрамл (Чехия), профессор Эрик Мандрон (Франция).

Обучение клинических ординаторов, аспирантов, слушателей циклов дополнительного профессионального образования на кафедре урологии с курсом роботической хирургии НМИЦ им. В. А. Алмазова реализуется в виде лекций, практических занятий, самостоятельной работы, симу-

ляционных занятий с применением телемедицинских технологий. Обучающиеся на кафедре могут не только наблюдать, но также непосредственно участвовать в выполнении самых современных и высокотехнологичных оперативных вмешательств на сегодняшний день — робот-ассистированных операций. Для этих целей сотрудниками кафедры был создан специальный программно-аппаратный комплекс, при помощи которого осуществляется трансляция из операционной изображения, получаемого с эндоскопа роботического хирургического комплекса da Vinci, на экраны телевизоров, компьютеров, смартфонов и других гаджетов обучающихся с возможностью двусторонней аудиосвязи, а также телестрации. Трансляция ведется в том числе в конференц-зал кафедры, вмещающий в себя до 30 человек, на широкоформатный телевизионный экран в высоком разрешении с возможностью передачи 3D-изображения. Это позволяет оптимизировать количество обучающихся, находящихся непосредственно в операционной, минимизировать риск передачи инфекций и т. д. Кроме того, данный программно-аппаратный комплекс позволяет опытному хирургу-наставнику следить за выполнением операции начинающим хирургом, контролируя и корректируя действия последнего вербально посредством двусторонней аудиосвязи, а также при помощи телестрации с экрана своего устройства (смартфон, персональный компьютер и т. д.).

На кафедре разработаны уникальные обучающие циклы по основам роботической хирургии, в рамках которых врачи могут ознакомиться с базовыми принципами работы роботического хирургического комплекса da Vinci, поприусутствовать

и выступить в качестве помощника ассистента на роботической хирургической операции, а также попробовать себя в базовых мануальных упражнениях робот-ассистированной хирургии. С 2019 года ведутся работы по созданию роботического тренинг-центра, с возможностью проведения операций на животных.

Сотрудники кафедры и клиники регулярно принимают участие, в том числе с докладами, в отечественных и зарубежных урологических конгрессах и конференциях. Только за последние 3 года на ежегодных конгрессах Европейской ассоциации урологов продемонстрировано 3 доклада, на различных отечественных и зарубежных конференциях и симпозиумах — 26 докладов, проведено 9 мастер-классов с сеансами «живой хирургии» (рис. 4–6).

Основными направлениями научной деятельности кафедры являются онкоурология, роботическая хирургия в урологии, оперативное лечение рака предстательной железы, почечно-клеточного рака, хирургическое лечение урологической патологии у пациентов с сопутствующей кардиоваскулярной патологией.

По материалам клинической работы защищена одна докторская диссертация на тему «Оптимизация подходов к робот-ассистированным, лапароскопическим и открытым операциям при локализованном раке почки», автор М. С. Мосоян. Проводится подготовка 4 кандидатских диссертаций. Количество опубликованных научных и учебно-методических работ — 70, в том числе входящих в перечень ВАК, в международных изданиях — 18. Получено 3 патента на изобретение, в том числе: «Способ проведения робот-ассистированной радикальной простатэктомии с передней реконструк-

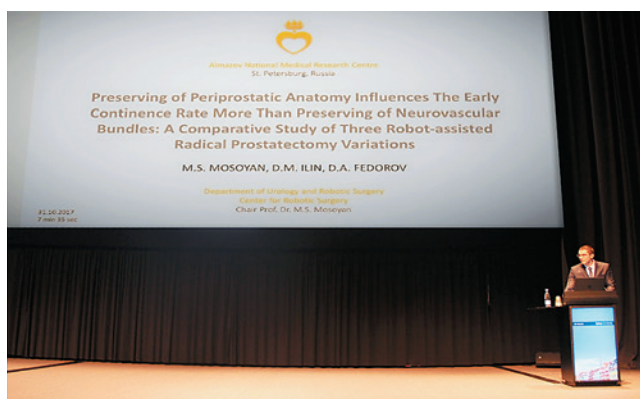


Рис. 4. Доклад сотрудников кафедры урологии с курсом роботической хирургии НМИЦ им. В. А. Алмазова на ежегодном конгрессе Европейской ассоциации урологов (г. Копенгаген, 2018 г.)



Рис. 5. Сотрудники кафедры урологии с курсом роботической хирургии НМИЦ им. В. А. Алмазова после успешного выступления на ежегодном конгрессе Европейской ассоциации урологов (г. Барселона, 2019 г.)



Рис. 6. Коллектив кафедры урологии, центра роботической хирургии и урологического отделения НМИЦ им. В. А. Алмазова

цией малого таза в лечении рака предстательной железы»; «Способ проведения робот-ассистированной радикальной простатэктомии с задней реконструкцией малого таза в лечении рака предстательной железы»; «Способ проведения робот-ассистированной радикальной простатэктомии с латеральной фиксацией шейки мочевого пузыря в лечении рака предстательной железы». Помимо этого, 2 патента отправлено в Федеральный институт промышленной собственности, еще 3 — находятся в стадии разработки.

Заключение

Развитие, совершенствование и активное внедрение в клиническую практику медицинских роботов может обеспечить повышение уровня автоматизации, облегчение и повышение производительности труда врачей, медицинских сестер, фармацевтов и других специалистов, улучшить результаты хирургических вмешательств (повышение сложности и технологичности, уменьшение инвазивности), реабилитационных мероприятий. С каждым годом растет число робот-ассистированных операций, в том числе в урологии, в России и во всем мире. Разработаны методики и накоплен большой опыт выполнения таких вмешательств в разных областях медицины, доступны результаты многочисленных исследований с высоким уровнем доказательности.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Hernigou P. Ambroise Paré IV: the early history of artificial limbs (from robotic to prostheses). *Int Orthop*. 2013; 37 (6): 1195–1197.
2. Yates DR, Vaessen C, Roupert M. From Leonardo to da Vinci: the history of robot-assisted surgery in urology. *BJU Int*. 2011; 108 (11): 1708–1713.
3. Kalan S, Chauhan S, Coelho RF, et al. History of robotic surgery. *J Robot Surg*. 2010; 4 (3): 141–147.
4. Hegarty NJ, Gill IS. Robotic urologic surgery: an introduction and vision for the future. *Robotic Urologic Surgery*. London: Springer; 2007: 1–4.
5. Sánchez-Martín FM, Jiménez Schlegel P, Millán Rodríguez F., et al. History of robotics: from archytas of tarentum until Da Vinci robot. (Part II). *Actas Urol Esp*. 2007; 31 (3): 185–196.
6. Beecher R. C. Puma: Programmable universal machine for assembly. In: Dodd GG, Rossol L, ed. *Computer vision and sensor-based robots*. Springer, Boston, MA, 1979: 141–152.
7. Harris SJ, Arambula-Cosio F, Mei Q, et al. The Probot — an active robot for prostate resection. *Proc Inst Mech Eng H*. 1997; 211 (4): 317–325.
8. Bargar WL, Bauer A, Börner M. Primary and revision total hip replacement using the Robodoc system. *Clin Orthop Relat Res*. 1998; 354: 82–91.
9. Jakopec M, Harris SJ, y Baena FR, et al. The Acrobot® system for total knee replacement. *Industrial Robot*. 2003; 30 (1): 61–66.
10. Marescaux J, Rubino F. The ZEUS robotic system: experimental and clinical applications. *Surg Clin North Am*. 2003; 83 (6): 1305–1315.
11. Kim HL, Schulam P. The PAKY, HERMES, AESOP, ZEUS, and da Vinci robotic systems. *Urol Clin North Am*. 2004; 31 (4): 659–669.
12. Kilby W, Dooley JR, Kuduvalli G, et al. The CyberKnife robotic radiosurgery system in 2010. *Technol Cancer Res Treat*. 2010; 9 (5): 433–452.
13. Voros S, Haber GP, Menudet JF, et al. ViKY robotic scope holder: initial clinical experience and preliminary re-

sults using instrument tracking. IEEE/ASME transactions on mechatronics. 2010; 15 (6): 879–886.

14. Carpi F, Pappone C. Stereotaxis Niobe magnetic navigation system for endocardial catheter ablation and gastrointestinal capsule endoscopy. Expert Rev Med Devices. 2009; 6 (5): 487–498.

15. Rao S. Endovascular robotic catheters: an emerging transformative technology in the interventional radiology suite. Journal of Radiology Nursing. 2016; 35 (3): 211–217.

16. Smitson CC, Ang L, Pourdjabbbar A, et al. Safety and feasibility of a novel, second-generation robotic-assisted system for percutaneous coronary intervention: first-in-human report. J Invasive Cardiol. 2018; 30 (4): 152–156.

17. Mazor Robotics Renaissance. Neurosurgical robotic systems. Functional Neurosurgery and Neuromodulation. 2018; 236.

18. Jacofsky DJ, Allen M. Robotics in arthroplasty: a comprehensive review. J Arthroplasty. 2016; 31 (10): 2353–2363.

19. Wong JYY, Ho KY. Robotics for advanced therapeutic colonoscopy. Clin Endosc. 2018; 51 (6): 552–557.

20. Mattos LS, Andreff N. The μ RALP project: new technologies and systems for robot-assisted laser phonomicrosurgery. 3rd Joint Workshop on New Technologies for Computer/Robot Assisted Surgery; 2013.

21. Di Marco AN, Jeyakumar J, Pratt PJ, et al. Evaluating a novel 3D stereoscopic visual display for transanal endoscopic surgery: a randomized controlled crossover study. Ann Surg. 2016; 263 (1): 36–42.

22. Graetzel CF, Sheehy A, Noonan DP. Robotic bronchoscopy drive mode of the Auris Monarch platform. 2019 International Conference on Robotics and Automation (ICRA). IEEE; 2019: 3895–3901.

23. Troccaz J, Dagnino G, Yang G-Z. Frontiers of medical robotics: from concept to systems to clinical translation. Annu Rev Biomed Eng. 2019; 21: 193–218.

24. Stark M, Pomati S, D'Ambrosio A, et al. A new tele-surgical platform — preliminary clinical results. Minim Invasive Ther Allied Technol. 2015; 24 (1): 31–36.

25. Seeliger B, Diana M, Ruurda JP, et al. Enabling single-site laparoscopy: the SPORT platform. Surg endosc. 2019; 33 (11): 3696–3703.

26. Solis M. New frontiers in robotic surgery: the latest high-tech surgical tools allow for superhuman sensing and more. IEEE Pulse. 2016; 7 (6): 51–55.

27. Konietschke R, Hagn U, Nickl M, et al. The DLR MiroSurge — a robotic system for surgery. 2009 IEEE International Conference on Robotics and Automation. IEEE; 2009: 1589–1590.

28. Haig F, Medeiros A, Chitty K, et al. Usability assessment of Versius, a new robot-assisted surgical device for use in minimal access surgery. BMJ Surg Interv Health Technologies. 2020; 2.

29. Peters BS, Armijo PR, Krause C, et al. Review of emerging surgical robotic technology. Surg Endosc. 2018; 32 (4): 1636–1655.

30. Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. J Urol. 1994; 152 (5 Pt 2): 1831–1836.

31. Binder J, Kramer W. Robotically-assisted laparoscopic radical prostatectomy. BJU Int. 2001; 87 (4): 408–410.

32. Pushkar DY, Rasner PI, Kolontarev KB. Robot-assisted radical prostatectomy: analysis of the first 80

cases. Oncourologiya=Oncourology. 2014; 6 (3): 37–42. In Russian [Пушкар Д.Ю., Раснер П.И., Колонтарев К.Б. Радикальная простатэктомия с роботической ассистенцией: анализ первых 80 случаев. Онкоурология. 2014; 6 (3): 37–42].

33. Van Poppel H, Da Pozzo L, Albrecht W, et al. A prospective randomized EORTC intergroup phase 3 study comparing the complications of elective nephron-sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma. Eur Urol. 2007; 51 (6): 1606–1615.

34. Weight CJ, Larson BT, Gao T, et al. Elective partial nephrectomy in patients with clinical T1b renal tumors is associated with improved overall survival. Urology. 2010; 76 (3): 631–637.

35. Gettman MT, Blute ML, Chow GK, et al. Robotic-assisted laparoscopic partial nephrectomy: technique and initial clinical experience with DaVinci robotic system. Urology. 2004; 64 (5): 914–918.

36. Al'-Shukri SK, Mosoyan MS, Semenov DYU, et al. Experience of 424 robot-assisted operations in St-Petersburg: radical prostatectomy, partial and radical nephrectomy. Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova=Bulletin of surgery I.I. Greeks. 2016; 175 (5): 74–77. In Russian [Аль-Шукри С.Х., Мосоян М.С., Семенов Д.Ю. и др. Опыт 424 робот-ассистированных вмешательств в Санкт-Петербурге: радикальная простатэктомия, резекция почки и нефрэктомия. Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2016; 175 (5): 74–77].

37. Cacciamani GE, Medina LG, Gill T, et al. Impact of surgical factors on robotic partial nephrectomy outcomes: comprehensive systematic review and meta-analysis. J Urol. 2018; 200 (2): 258–274.

38. Klingler DW, Hemstreet GP, Balaji KC. Feasibility of robotic radical nephrectomy — initial results of single-institution pilot study. Urology. 2005; 65 (6): 1086–1089.

39. Gettman MT, Neururer R, Bartsch G, et al. Anderson-Hynes dismembered pyeloplasty performed using the da Vinci robotic system. Urology. 2002; 60 (3): 509–513.

40. Buffi NM, Lughezzani G, Hurler R, et al. Robot-assisted surgery for benign ureteral strictures: experience and outcomes from four tertiary care institutions. European urology. 2017; 71 (6): 945–951.

41. Menon M, Hemal AK, Tewari A, et al. Robot-assisted radical cystectomy and urinary diversion in female patients: technique with preservation of the uterus and vagina. J Am Coll Surg. 2004; 198 (3): 386–393.

42. Lenfant L, Parra J, Verhoest G, et al. Multicentric comparison of surgical outcomes obtained after open radical cystectomy and robot-assisted laparoscopic radical cystectomy for muscle-invasive bladder cancer. European Urology Supplements. 2018; 17 (2): e1027–e1028.

43. Abaza R, Shabsigh A, Castle E, et al. Multi-institutional experience with robotic nephrectomy with inferior vena cava tumor thrombectomy. J Urol. 2016; 195 (4 Part 1.): 865–871.

44. Mosoyan MS, Chernyavskiy MA, P'yagay VI, et al. A case report of simultaneous mini-invasive treatment of a patient with kidney tumor and tumor thrombus in inferior vena cava. Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya=Pathology of the circulatory and cardiac surgery. 2018; 22 (3): 69–74. In Russian [Мосоян М.С., Чернявский М.А., Пягай В.И. и др. Клинический случай одномоментного малоинвазивного хирургического лечения пациента с новообразованием почки и опухолевым тромбом

- в нижней полой вене. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2018; 22 (3): 69–74].
45. Sotelo R, Clavijo R, Carmona O, et al. Robotic simple prostatectomy. *J Urol*. 2008; 179 (2): 513–515.
 46. Novara G, Morlacco A, Autorino R, et al. Robot-assisted simple prostatectomy. In: Hemal AK, Menon M, ed. *Robotics in genitourinary surgery*. 2nd ed. Switzerland, Cham: Springer, 2018: 443–450.
 47. Desai MM, Gill IS, Kaouk JH, et al. Robotic-assisted laparoscopic adrenalectomy. *Urology*. 2002; 60 (6): 1104–1107.
 48. Kahramangil B, Berber E. Robotic adrenalectomy. In: Tsuda S, Kudsi OYU, ed. *Robotic-assisted minimally invasive surgery. A comprehensive textbook*. Switzerland, Cham: Springer, 2019: 109–115.
 49. Semenov DYU, Tonoyan AG, Pankova PA, et al. Robot-assisted laparoscopic adrenalectomy. The first experience. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova* = Bulletin of surgery I.I. Greeks. 2011; 170 (5): 35–37. In Russian [Семенов Д.Ю., Тоноян А.Г., Панкова П.А. и др. Робот-ассистированная лапароскопическая адреналэктомия. Первый опыт. Вестник хирургии им. И. И. Грекова. 2011; 170 (5): 35–37].
 50. Kriger AG, Teplov AA, Berelavichus SV, et al. Robot-assisted operations in pelvic region. *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova* = Surgery. Journal named after N.I. Pirogov. 2013; 12: 29–36. In Russian [Кригер А.Г., Теплов А.А., Берелавичус С.В. и др. Робот-ассистированные операции в полости малого таза. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2013; 12: 29–36].
 51. Gala RB, Margulies R, Steinberg A, et al. Systematic review of robotic surgery in gynecology: robotic techniques compared with laparoscopy and laparotomy. *J Minim Invasive Gynecol*. 2014; 21 (3): 353–361.
 52. Truong M, Kim JH, Scheib S, et al. Advantages of robotics in benign gynecologic surgery. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2016; 28 (4): 304–310.
 53. Kristensen SE, Mosgaard BJ, Rosendahl M, et al. Robot-assisted surgery in gynecological oncology: current status and controversies on patient benefits, cost and surgeon conditions – a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017; 96 (3): 274–285.
 54. Popov AA, Atroshenko KV, Manannikova TN, et al. Robotic surgery in gynecology. *Akusherstvo i ginekologiya Sankt-Peterburga* = Obstetrics and Gynaecology of Saint-Petersburg. 2017; 2: 65–69. In Russian [Попов А.А., Атрошенко К.В., Мананникова Т.Н. и др. Место робот-ассистированной лапароскопии в оперативной гинекологии. Акушерство и гинекология Санкт-Петербурга. 2017; 2: 65–69].
 55. Sun X-Y, Xu L, Lu J-Y, et al. Robotic versus conventional laparoscopic surgery for rectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Minim Invasive Ther Allied Technol*. 2019; 28 (3): 135–142.
 56. Renshaw S, Silva IL, Hotouras A, et al. Perioperative outcomes and adverse events of robotic colorectal resections for inflammatory bowel disease: a systematic literature review. *Tech Coloproctol*. 2018; 22 (3): 161–177.
 57. Hussain A, Malik A, Halim MU, et al. The use of robotics in surgery: a review. *Int J Clin Pract*. 2014; 68 (11): 1376–1382.
 58. Ng ATL, Tam PC. Current status of robot-assisted surgery. *Hong Kong Med J*. 2014; 20 (3): 241–250.
 59. Toro JP, Lin E, Patel AD. Review of robotics in foregut and bariatric surgery. *Surg Endosc*. 2015; 29 (1): 1–8.
 60. Karpov OE, Maksimenko AV, Stepanjuk IV, et al. Laparoscopic and robotic technologies in treatment of patients with rectal cancer. *Vestnik Nacional'nogo mediko-hirurgicheskogo Centra im. N.I. Pirogova* = Bulletin of the National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov. 2016; 11 (2): 49–53. In Russian [Карпов О.Э., Максименко А.В., Степанюк И.В. и др. Лапароскопические и роботические технологии в лечении больных раком прямой кишки. Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2016; 11 (2): 49–53].
 61. Kriger AG, Berelavichus SV, Smirnov AV, et al. Comparative results of open, robot-assisted and laparoscopic distal pancreatic resection. *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova* = Surgery. Journal them. N.I. Pirogov. 2015; 1: 23–29. In Russian [Кригер А.Г., Берелавичус С.В., Смирнов А.В. и др. Сравнительные результаты открытой робот-ассистированной и лапароскопической дистальной резекции поджелудочной железы. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2015; 1: 23–29].
 62. Kriger AG, Berelavichus SV, Gorin DS, et al. Robot-assisted resection of duodenal inferior horizontal part and duodeno-jejunal transition. *Khirurgiya. Zhurnal im. N.I. Pirogova* = Surgery. Journal them. N.I. Pirogov. 2015; 3: 34–37. In Russian [Кригер А.Г., Берелавичус С.В., Горин Д.С. и др. Робот-ассистированная резекция нижней горизонтальной части двенадцатиперстной кишки и дуоденоюнального перехода. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2015; 3: 34–37].
 63. Yablonsky PK, Kudryashov GG, Vasilyev IV, et al. Efficiency and safety of robot-assisted thoracoscopic lobectomies when managing pulmonary tuberculosis. *Tuberkulez i bolezni legkih* = Tuberculosis and Lung Diseases. 2018; 96 (5): 28–35. In Russian [Яблонский П.К., Кудряшов Г.Г., Васильев И.В. и др. Эффективность и безопасность робот-ассистированных торакоскопических лобэктомий при туберкулезе легких. Туберкулез и болезни легких. 2018; 96 (5): 28–35].
 64. Kudryavtsev AS, Yarmoshchuk SV, Zheravin AA, et al. Robotic interventions in thoracic tumors (experience of 30 primary operations). *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova* = Bulletin of surgery I.I. Greeks. 2017; 176 (2): 107–111. In Russian [Кудрявцев А.С., Ярмошук С.В., Жеравин А.А. и др. Роботические вмешательства при опухолях торакальной локализации (опыт первых 30 операций). Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2017; 176 (2): 107–111].
 65. Shevchenko YuL, Borshchev GG, Fedotov PA. Robot-assisted myocardial revascularization in patient with coronary heart disease (CHS). *Vestnik Nacional'nogo mediko-hirurgicheskogo Centra im. N.I. Pirogova* = Bulletin of the National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov. 2011; 6 (2): 138–140. In Russian [Шевченко Ю.Л., Борщев Г.Г., Федотов П.А. Робот-ассистированная реваскуляризация миокарда у пациента с ИБС. Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2011; 6 (2): 138–140].
 66. Shevchenko YuL, Popov LV, Borshchev GG. Robot-assisted cardiac surgery – history, realities and perspective. *Vestnik Nacional'nogo mediko-hirurgicheskogo Centra im. N.I. Pirogova* = Bulletin of the National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov. 2015; 10 (1): 111–113. In Russian [Шевченко Ю.Л., Попов Л.В., Борщев Г.Г. Робот-ассистированная кардиохирургия — история, реалии, перспективы. Вестник Национального медико-

хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2015; 10 (1): 111–113].

67. Pavlov VN, Plechev VV, Safiullin RI, et al. Preliminary experience of the aorto-femoral shunting using the Da Vinci surgical system. *Kreativnaya hirurgiya i onkologiya*=Creative Surgery and Oncology. 2018; 8 (1): 7–13. In Russian [Павлов В.Н., Плечев В.В., Сафиуллин Р.И. и др. Первичные результаты аорто-бедренного шунтирования с применением робот-ассистированной хирургической системы Da Vinci. Креативная хирургия и онкология. 2018; 8 (1): 7–13].

68. Kropotov MA, Mosin SV, Petrova AL, et al. The first experience of transoral robot-assisted surgery in a patient with oropharyngeal cancer (clinical observation). *Opuholi golovy i shei*=Head and neck tumors. 2017; 7 (2): 106–110. In Russian [Кропотов М.А., Мосин С.В., Петрова А.Л. и др. Первый опыт трансоральной роботизированной операции при раке ротоглотки (клиническое наблюдение). Опухоли головы и шеи. 2017; 7 (2): 106–110].

Информация об авторах:

Мосоян Мкртич Семенович, д.м.н., заведующий кафедрой урологии с курсом роботической хирургии, руководитель центра роботической хирургии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Федоров Дмитрий Александрович, врач-уролог центра роботической хирургии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Mosoyan Mkrtich S., MD, PhD, Dr. Sc., Professor and Chair of the Department of Urology and Robotic Surgery and Head of Centre for Robotic Surgery at Almazov National Medical Research Centre;

Fedorov Dmitriy A., MD, Department of Urology and Robotic Surgery at Almazov National Medical Research Centre.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ ПОНЯТИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАЛЬНЫХ ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ФИГУР И КОНТУРНЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ В КАЧЕСТВЕ СТИМУЛОВ У ДЕТЕЙ В ВОЗРАСТЕ 4–5 ЛЕТ

Голубева И. Ю.¹, Тихонравов Д. Л.^{2,3}, Войтенков В. Б.^{4,5,6},
Пашков А. Ю.⁴, Первунина Т. М.³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский
научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального
медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

⁵Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный научный центр реабилитации инвалидов им.
Г. А. Альбрехта» Министерства труда и социальной защиты
Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

⁶Академия постдипломного образования Федерального
государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-
клинический центр специализированных видов медицинской помощи
и медицинских технологий Федерального медико-биологического
агентства», Москва, Россия

Контактная информация:

Голубева Инна Юрьевна,
ФГБУН «Институт физиологии им.
И. П. Павлова» РАН,
наб. Макарова, д. 6, Санкт-Петербург,
Россия, 199034.
E-mail: GolubevaIU@infran.ru

*Статья поступила в редакцию 26.06.2020
и принята к печати 12.10.2020.*

Резюме

Актуальность. В дошкольном возрасте наблюдаются возрастные изменения принципов обработки информации, поэтому формирование понятий является удобным подходом для сравнительного изучения когнитивных способностей здоровых детей и детей с высоким риском нарушений формирования интеллекта. **Цель.** Провести сравнительное исследование формирования понятий с использованием реальных геометрических фигур и плоскостных контурных изображений в качестве стимулов у 4–5-летних детей. **Материалы и методы.** Применялся оригинальный методический подход, при котором ребенок в условиях одновременного предъявления четырех объектов самостоятельно выявлял определенную закономерность при выборе стимулов. **Результаты.** Скорость формирования понятий «размер» и «форма»/«форма контура» достоверно не различалась у детей 4–5 лет, однако формирование обоих понятий требовало достоверно более длительного обучения при использовании изображений в качестве стимулов в сравнении с фигурами. Обнаружена неоднородность выборки детей 4–5 лет по скорости формирования понятий.

Мы предполагаем качественные различия в обработке информации, связанные с использованием индуктивной и дедуктивной функций рассудка. У детей с длительным обучением происходил синтез отдельных эмпирических представлений за счет индуктивной функции рассудка. Часть участников, вероятно, уже владела данными понятиями, и они могли сразу соотнести подкрепляемые стимулы с этими понятиями с помощью дедуктивной функции рассудка. **Заключение.** Экспериментальный психологический метод с использованием контурных изображений может использоваться в клинической практике с последующим переходом к стимулам на экране монитора компьютера с одновременной записью мозговой активности для изучения динамики психического развития ребенка и выявления задержек и отклонений в когнитивной сфере.

Ключевые слова: дедуктивная функция рассудка, дети дошкольного возраста, индуктивная функция рассудка, клинические методы исследования, эмпирические понятия.

Для цитирования: Голубева И.Ю., Тихонравов Д.Л., Войтенков В.Б. и др. Сравнительное исследование формирования понятий с использованием реальных геометрических фигур и контурных изображений в качестве стимулов у детей в возрасте 4–5 лет. Трансляционная медицина. 2020; 7 (5): 109-118. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-109-118

COMPARATIVE STUDY OF THE FORMATION OF CONCEPTS USING REAL GEOMETRIC FIGURES AND CONTOUR IMAGES AS STIMULI IN CHILDREN AT THE AGE OF 4 TO 5 YEARS

Golubeva I. U.¹, Tikhonravov D. L.^{2,3}, Voitenkov V. B.^{4,5,6},
Pashkov A. Y.⁴, Pervunina T. M.³

¹Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences,
Saint Petersburg, Russia

²Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

³Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

⁴Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint
Petersburg, Russia

⁵Albrecht Federal Scientific Center of Rehabilitation of the Disabled,
Saint Petersburg, Russia

⁶Academy of postgraduate education under FSBU FSCC of FMBA of
Russia, Moscow, Russia

Corresponding author:

Golubeva Inna U.,
Pavlov Institute of Physiology RAS,
Makarova emb., 6, Saint-Petersburg, Russia,
199034.
E-mail: golubevaiu@infran.ru

Received 26 June 2020; accepted 12 October
2020.

Abstract

Background. In preschool age, age-related changes in the principles of information processing are observed. The formation of concepts is a convenient approach for the comparative study of the cognitive abilities of healthy children and children with a high risk of the impairment of the intelligence formation. **Objective.** The goal of the work was to conduct the comparative study of the formation of concepts using real geometric figures and flat contour images as stimuli in 4–5-year-old children. **Design and methods.** The original method was used in which a child independently revealed a certain pattern of choosing stimuli under the conditions of the simultaneous presentation of four objects or images. **Results.** The speed of forming the concepts of the "size" and "shape"/"contour shape" did not significantly differ in the 4-5-year-old children. However, the formation of both the concepts required the longer learning period with using the contour images compared to the the learning

period with using real objects as stimuli. The heterogeneity of the 4–5-year-old children group was related to the difference of the speed of forming concepts. This fact implies the qualitative differences in the processing of information. In the children with long-lasting training, the synthesis of separate empirical representations took place due to the inductive function of abstract thinking. Some children probably have already possessed those concepts and they could quickly relate rewarded concrete stimuli to those concepts using the deductive function of abstract thinking. **Conclusion.** Our experimental psychological method using contour images can be used in clinical practice with the subsequent transition to stimuli on a computer screen with the simultaneous recording of brain activity to study the dynamics of the children mental development, as well as to identify delays and deviations in their cognitive sphere.

Key words: clinical research methods, deductive function of abstract thinking, empirical concepts, inductive function of abstract thinking, preschool children.

For citation: Golubeva IU, Tikhonravov DL, Voitenkov VB, et al. Comparative study of the formation of concepts using real geometric figures and contour images as stimuli in children at the age of 4 to 5 years. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020; 7 (5): 109-118. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-109-118

Введение

Идентификация объектов внешнего мира — важнейшее условие познавательного развития ребенка. Предметное восприятие, начиная от склонности детей сосредоточиться на объектах, развивается в онтогенезе и зависит от обучения [1, 2]. Обнаружены возрастные изменения принципов восприятия объектов в сторону глобальной оценки и формирования широких категориальных понятий [3] от конкретного к символическому представлению [4, 5], сдвиг от анализа объектов в сторону реляционной обработки между объектами [6], развитие стратегий обучения от пассивного, непреднамеренного к сознательному и словесно опосредуемому аналитическому познанию [7, 8]. Это приводит к увеличению производительности и повышению исполнительской способности ребенка при выполнении когнитивных задач. Нарушение в развитии этих компонентов можно обнаружить при некоторых заболеваниях. Например, сосредоточение на локальных характеристиках стимула наблюдается при аутизме [9], неспособность к сосредоточению внимания на одном измерении стимула и стратегическому познанию, а также использование стратегии обнаружения многомерного сходства обнаружено у умственно отсталых и у импульсивных детей, а также у взрослых, страдающих депрессией [10].

С возрастом у ребенка происходит увеличение абстрактных понятий, и все более значимым становится получение знаний по аналогичной проекции из знакомых базовых областей [11]. Формирование понятий является удобным методическим подходом как для онтогенетического изучения когнитивных способностей, так и для сравнительного изучения способностей здоровых детей

и детей из групп с высоким риском нарушений формирования когнитивных функций (например, недоношенные, дети с задержкой внутриутробного развития и т. п.).

Целью исследования была разработка методики, позволяющей сравнивать способности ребенка дошкольного возраста формировать или актуализировать эмпирические понятия. В данной работе тестировались дети 4–5 лет, однако в дальнейшем планируется тестирование детей еще более младшего возраста, а также испытуемых с нарушениями в психо-речевой сфере, когда понимание вербальных инструкций затруднено. Основная особенность применяемого подхода состояла в том, что дети самостоятельно, без инструкций, искали решение задачи на формирование (актуализацию) понятий.

В предыдущей работе [12] изучалась возможность применения методики формирования понятий размера и формы у детей дошкольного возраста с использованием реальных геометрических фигур в качестве стимулов для клинических исследований. Однако для параллельной записи биоэлектрической активности головного мозга (электроэнцефалография, вызванные потенциалы и др.) у детей более подходящим вариантом выполнения данной задачи является компьютерное тестирование, в котором стимулами становятся плоскостные изображения. Исходя из этого, в данном исследовании мы поставили задачу провести сравнительное исследование формирования или актуализации отдельных понятий при использовании реальных геометрических фигур и плоскостных контурных изображений в качестве стимулов у 4–5-летних детей.

Материалы и методы

Работа выполнялась в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта» с поправками 2013 года и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава России № 266 от 19.06.2003 г.

Изучение способности формирования эмпирических понятий проводилось у 19 детей (средний возраст — 4 года 6 месяцев: минимальный возраст — 3 года 7 месяцев, максимальный возраст — 6 лет 1 месяц). Использовался разработанный дизайн эксперимента [13], апробированный на макаках-резусах и в исследованиях с участием детей 4–5 лет [12, 14].

Девять детей (средний возраст $4,5 \pm 1,0$, шесть мальчиков и три девочки) выполняли задание с реальными геометрическими фигурами на базе ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства». Эта группа участников проходила плановое реабилитационное лечение в связи с терапией последствий невропатии лицевого нерва. Дети не имели когнитивных нарушений, исследование не мешало основной терапии.

Десять детей (средний возраст $4,5 \pm 0,5$, пять мальчиков и пять девочек) выполняли задания со стимулами-контурными изображениями. Эти участники посещали среднюю группу детского сада № 81 Санкт-Петербурга и проходили тестирование на базе этого учреждения. Все родители подписали согласие на участие детей в исследовании.

Методика формирования понятий с геометрическими фигурами описана в предыдущей работе

[12]. Модификация методики представляла собой замену реальных геометрических фигур на пластиковые карточки (размеры — 60×80 мм) с контурными изображениями различных объектов, которые отличались по форме контура (гладкие и зубчатые) и размеру (большие — 50×50 мм, средние — 25×25 мм и малые — $12,5 \times 12,5$ мм). Таким образом, было шесть групп контурных изображений: большие гладкие, большие зубчатые, средние гладкие, средние зубчатые, малые гладкие и малые зубчатые (рис. 1а). Алфавит стимулов содержал 20 разных образцов (рис. 1б), каждый из которых включал в себя шесть вышеуказанных групп. Таким образом, всего было 120 изображений. Большое количество изображений препятствовало запоминанию отдельных стимулов. У детей формировали понятия «большого» или «меньшего» изображения, а также «гладкого» или «зубчатого» контуров без отнесения к конкретному изображению и/или месту на экспериментальной панели.

Исследование проводилось в отдельной комнате за столом, в которой находился исследователь и ассистент, хорошо знакомые ребенку (один день был посвящен установлению контакта с детьми в их группе). Перед ребенком располагалась установка, содержащая систему экранов (непрозрачного и прозрачного), открывающих доступ к экспериментальной панели. Панель предназначена для одновременного предъявления четырех стимулов, зафиксированных с помощью горизонтальных направляющих с возможностью свободного передвижения по ним в горизонтальной плоскости (рис. 1в). Под каждым из четырех стимулов было углубление для подкрепления, под одним (правильным) стимулом помещали цветную звездочку или наклейку.

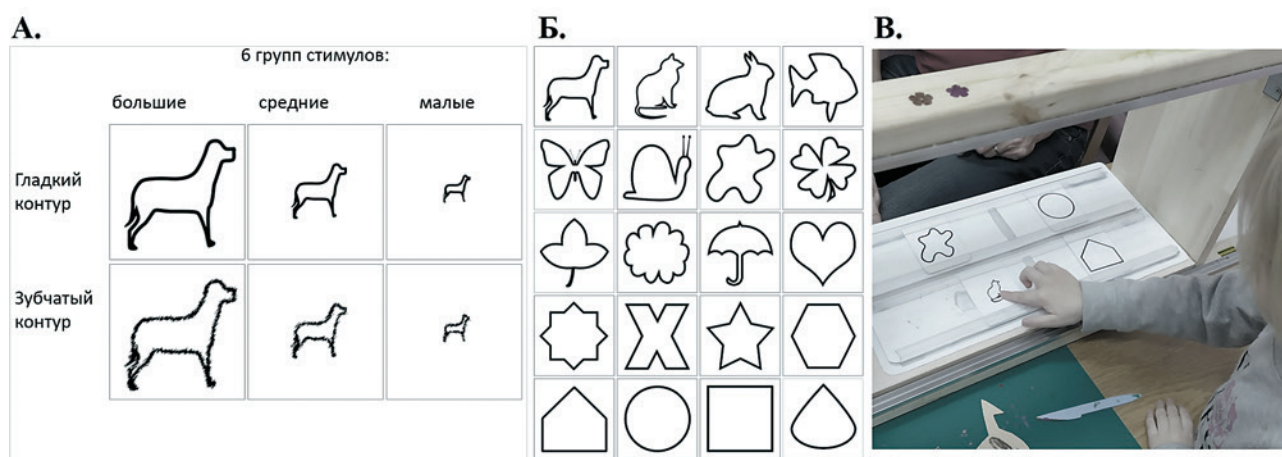


Рис. 1. Стимульный материал:

а — шесть групп стимулов: большие гладкие, большие зубчатые, средние гладкие, средние зубчатые, малые гладкие и малые зубчатые; б — алфавит стимулов-изображений (представлены только большие изображения с гладким контуром); в — экспериментальная панель со стимулами

Испытуемый должен был сдвинуть в сторону только один стимул. Наличие положительного подкрепления указывало ребенку на правильность выбора. Исследование было построено в форме игры, в которой исследователь «прячет клад», а ребенок его ищет. Чтобы успешно выполнить задачу, ребенку нужно самостоятельно, без инструкций, выявить определенную закономерность при выборе фигур. Исследование занимало 20–30 минут, за это время ребенок 21 раз выполнял задание, а в промежутках между заданиями вместе с ассистентом занимался творческой деятельностью (рисование, поделки и т. п.). Любая проба начиналась с опускания непрозрачного экрана, и в течении 5 секунд ребенок видел панель с четырьмя стимулами-изображениями через прозрачный экран. Затем опускается прозрачный экран, и ребенок получал доступ к панели. Расположение четырех стимулов на панели при каждом предъявлении производилось в псевдослучайном порядке. Исследование включало не более 21 пробы за один день и было направлено на выработку одного из двух понятий по трем условиям. Условия охватывали стимулы из шести групп в разных сочетаниях. Например, три условия при формировании понятия «больший размер»: «большое гладкое в сочетании с тремя малыми гладкими», «большое гладкое в сочетании с тремя средними гладкими», «среднее гладкое в сочетании с тремя малыми гладкими»; и три условия при формировании понятия «зубчатый контур»: «малое зубчатое в сочетании с тремя малыми гладкими», «среднее зубчатое в сочетании

с тремя средними гладкими», «большое зубчатое в сочетании с тремя большими гладкими».

Задание считалось выполненным после однократного достижения или превышения 70 % уровня реализации по каждому условию задания на формирование понятия. Исследования проводились ежедневно, в один день вырабатывалось одно понятие. Анализировали количество предъявлений, необходимое для достижения 70 % критерия по каждому условию.

Понятие считалось сформированным, когда критерий был достигнут для всех трех условий одного понятия в один опытный день.

При анализе данных использовали статистический пакет программ Graph Pad InStat. и StatSoft Statistica 10.0. Для выборок, прошедших тест нормальности, применяли однофакторный и двухфакторный критерии ANOVA. Для выборок, не прошедших тест нормальности, использовали Kruskal-Wallis Test.

Результаты

Исследование показало, что все дети успешно сформировали понятия размера и формы/формы контура как со стимулами реальными геометрическими фигурами, так и со стимулами-изображениями и имели высокую мотивацию при выполнении заданий.

На рисунке 2а представлены данные по количеству предъявлений, необходимых для достижения или превышения 70 % уровня реализации каж-

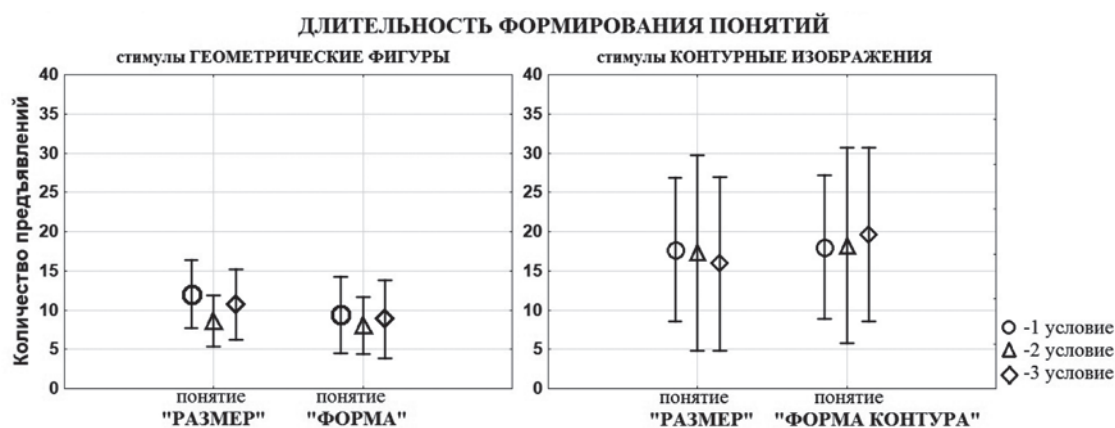


Рис. 2. Сравнительный анализ количества предъявлений (среднее арифметическое $\pm$ 95 %-ный доверительный интервал), необходимых для достижения 70 % уровня правильных ответов при выполнении каждой задачи на формирование понятий у детей 4–5 лет с использованием реальных геометрических фигур (а) и контурных изображений (б) в качестве стимулов.

По оси абсцисс: три условия задачи формирования понятия «размер» (большая/меньшая геометрическая фигура; большее/меньшее изображение); три условия задачи формирования понятия «форма/форма контура» (объемная/плоская фигура; гладкий/зубчатый контур изображения). По оси ординат: количество предъявлений

дого условия задачи при формировании понятия «размер» и понятия «форма» при использовании реальных геометрических фигур в качестве стимулов. Статистический анализ не выявил достоверных различий в скорости достижения критерия обученности при формировании этих двух понятий по трем условиям [однофакторный критерий ANOVA: $F(3, 14) = 0,44$; $p = 0,73$].

На рисунке 2б представлены данные по количеству предъявлений, необходимых для достижения или превышения 70 % уровня реализации каждого условия задачи при формировании понятия «размер» и понятия «форма контура» при использовании контурных изображений в качестве стимулов. Статистический анализ также не выявил достоверных различий в скорости достижения критерия успешности при формировании этих двух понятий [однофакторный критерий ANOVA: $F(3, 16) = 0,16$; $p = 0,92$].

Поскольку понятие считалось сформированным только после достижения 70 % критерия для всех трех условий, мы суммировали показатели по условиям для понятия «размер» и для понятия «форма/форма контура».

Чтобы проверить, связана ли длительность обучения детей с типом задания или с типом стимулов, мы использовали двухфакторный дисперсионный анализ с учетом двух факторов: фактор ПОНЯТИЯ (понятие «размер» VS понятие «форма»/«форма контура») и фактор СТИМУЛЫ (реальные геометрические фигуры VS контурные изображения) (рис. 3). Оказалось, что эффекта для фактора ПОНЯТИЯ не наблюдалось [$F(1, 36) = 0,26$; $p = 0,61$, двухфакторный критерий ANOVA],

но был выявлен основной эффект для фактора СТИМУЛЫ ($F(1, 36) = 4,32$, $p < 0,05$, двухфакторный критерий ANOVA). Взаимодействия между этими двумя факторами не наблюдалось [$F(1, 36) = 0,002$; $p = 0,97$, двухфакторный критерий ANOVA]. Таким образом, было выявлено, что формирование обоих понятий требовало более длительного обучения при использовании контурных изображений в качестве стимулов в сравнении с использованием реальных геометрических фигур.

Как видно из рисунка 2б, у детей 4–5 лет наблюдался значительный разброс значений по каждому условию при формировании понятия «размер» изображения и понятия «форма контура» изображения. Для рассмотрения причины неоднородности выборки был проведен индивидуальный анализ показателей каждого ребенка из группы детей, выполняющих задания со стимулами-изображениями. Оказалось, что детям было достаточно достигнуть критерия 70 % правильных ответов при выполнении одного условия, чтобы сразу успешно выполнить и остальные два условия при формировании понятия. При этом детей можно было разделить на три группы. Дети 1 группы (три человека) достигали критерия обученности по каждому условию как первого, так и второго понятий в течении первой 21 пробы, т. е. в первый день обучения. Дети 2 группы (пять человек) достигали критерия обученности по каждому условию одного из двух понятий в первый день исследования, тогда как другое понятие требовало двух и более сеансов. Детям 3 группы (два человека) требовалось два или более сеансов для формирования как первого, так и второго понятия. Сравни-

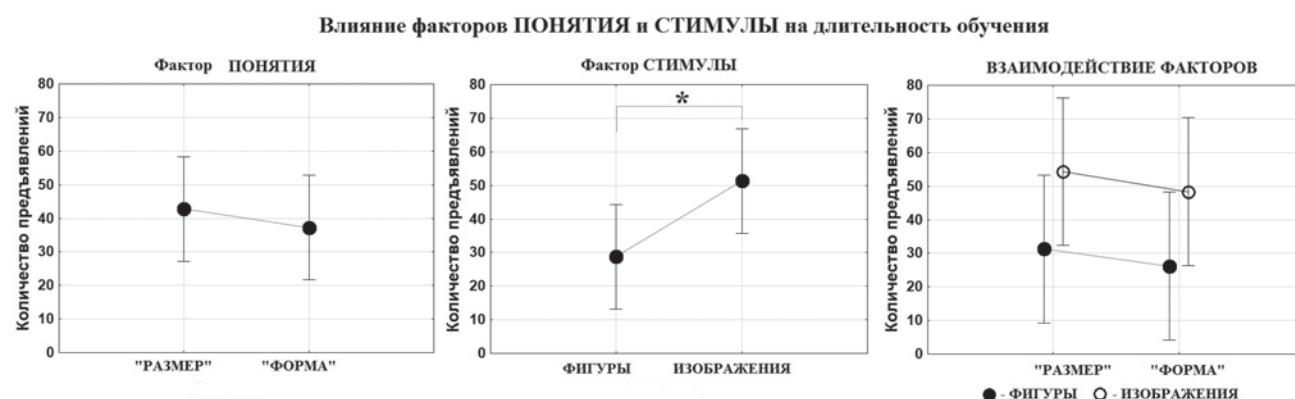


Рис. 3. Влияние типа задания (понятие «размер» и понятие «форма») и типа стимулов (реальные фигуры и контурные изображения) на длительность обучения у детей.

Остальные обозначения как на рис. 2. Группы данных прошли тест на нормальность. Двухфакторный критерий ANOVA: основной эффект для фактора ПОНЯТИЯ $F(1, 36) = 0,26$; $p = 0,61$, основной эффект для фактора СТИМУЛЫ $F(1, 36) = 4,32$; $p < 0,05$, основной эффект взаимодействия факторов $F(1, 36) = 0,002$; $p = 0,97$. Достоверные различия обозначены как * $p < 0,05$

тельный анализ среднего количества предъявлений, необходимых для достижения 70 % критерия одного условия (анализировались все шесть условий обоих понятий), показал, что данный показатель достоверно различался у детей трех групп [Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$; $H(2, n = 50) = 23,431$]. Оказалось, что у детей 3 группы наблюдалось достоверно более длительное обучение при формировании понятий в сравнении с детьми 1 группы и 2 группы (Dunn's Multiple Comparisons Test: $p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно). Дети 1 и 2 группы достоверно не различались ($p = 0,073$) по этому показателю (рис. 4).

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что все дети формировали понятия с использованием контурных изображений в качестве стимулов также успешно, как и с использованием реальных геометрических фигур. Как и в предыдущей работе с реальными геометрическими фигурами [12], в данном исследовании показано отсутствие значимых различий между длительностью формирования

понятий «размер» и «форма контура» изображения, что может свидетельствовать о том, что эти понятия не различаются по сложности для детей в возрасте 4–5 лет. В то же время формирование понятий с контурными изображениями было более длительным в сравнении с выполнением аналогичных задач с реальными фигурами, что свидетельствует о том, что данный вид деятельности сложнее. Однако все испытуемые смогли достигнуть установленного критерия и завершить задание, что подразумевает возможность использования методики формирования понятий с применением изображений в качестве стимулов для последующего перехода к виртуальному тестированию с параллельной записью биоэлектрической активности головного мозга в клинических условиях.

Известно, что для решения задач на понимание отношений между предметами необходим процесс сравнения [6]. Обнаружено, что формирование понятий в данной работе осуществлялось быстрее в сравнении со скоростью выявления значимого признака в условиях дифференцирования двух стимулов [15]. Мы предполагаем, что в условиях

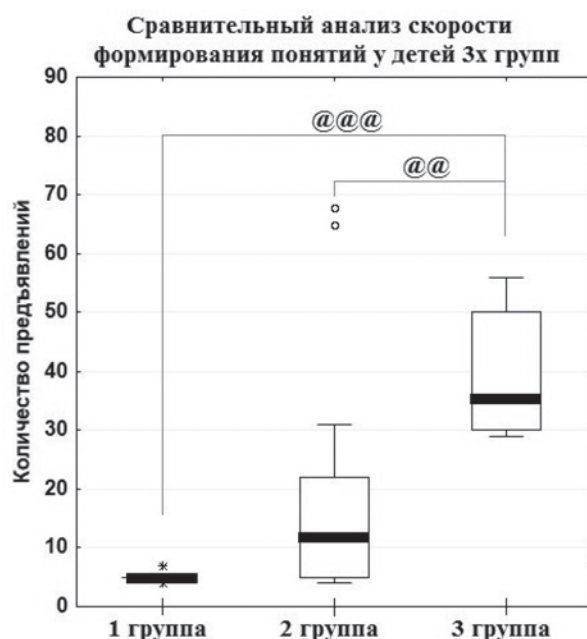


Рис. 4. Сравнительный анализ количества предъявлений для достижения 70 %-го критерия за одно условие заданий на формирование понятий у детей трех групп.

Обозначения: боксы — межквартильный диапазон (50 % значений в диапазоне от 25 до 75-го перцентиля), черные линии — медианы (анализируются все шесть условий понятий «размер» и «форма контура» изображений). Усы — максимальные и минимальные значения, исключая выбросы. Выбросы обозначены кружками, которые по меньшей мере в 1,5 раза превышают межквартильный диапазон. Экстремумы обозначены звездочками, которые имеют как минимум трехкратный межквартильный интервал. Группы данных не прошли тест на нормальность. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$; $H(2, n = 50) = 23,431$. Статистически достоверные различия, полученные в ходе Dunn's Multiple Comparisons Test, обозначены как *** $p < 0,001$ и ** $p < 0,01$)

одновременного предъявления четырех стимулов, несмотря на увеличение вероятности ошибки, легче выявить общность отношений между объектами. Кроме этого, использование поискового поведения поддерживает высокую мотивацию к выполнению заданий, а прикосновение к стимулу (сдвигание стимула открывает доступ к подкреплению) способствует концентрации внимания на его особенностях.

Обращает на себя внимание, что детям было достаточно успешно выполнить одно условие задачи, чтобы по аналогии понять и остальные два условия при формировании каждого понятия. Так, например, при формировании понятия «меньшее» средний стимул является положительным в сочетании со стимулами из группы больших и отрицательным в сочетании со стимулами из группы малых. Таким образом, ребенок не просто выделяет определенный признак изображений, а объединяет эти признаки в новое понятие, что позволяет ему в дальнейшем связывать новые объекты с этим понятием. Считается, что первоначально дети делают выводы, основанные на сходстве целых объектов, и постепенно приобретают способность делать выводы, основываясь на реляционных ролях, которыми связаны эти объекты. При этом аналогичное сравнение является основной движущей силой когнитивного развития детей, так как приводит к формированию новых реляционных абстракций [11, 16, 17].

При использовании контурных изображений в качестве стимулов был выявлен значительный разброс количества предъявлений, необходимых для формирования понятий, что позволило разделить выборку детей на три группы. Статистический анализ скорости формирования понятий у детей разных групп подтвердил неоднородность выборки. Мы предполагаем качественные различия процесса выполнения заданий у разных групп детей. Согласно И. Канту [18] существуют 3 составляющие интеллекта: рассудок (его индуктивная функция), способность суждения (дедуктивная функция рассудка) и разум. В процессе выполнения когнитивной задачи процесс принятия решений может быть осуществлен с помощью этих трех высших специфических когнитивных функций.

Вероятно, у детей 3 группы, отличавшихся длительным формированием обоих понятий, в процессе выполнения заданий происходил синтез отдельных эмпирических представлений (наглядных образов). Таким образом, на основе длительного метода «проб и ошибок» осуществлялось формирование эмпирических понятий за счет индуктивной функции рассудка. Дети 1 группы, вероятно, уже

владели понятиями «размера» и «формы контура», и у них происходила только их актуализация. Сравнив четыре одновременно предъявленных стимула, они могли быстро соотнести подкрепляемые объекты с этим понятием с помощью дедуктивной функции рассудка. Большинство детей (2 группа) формировали одно понятие и актуализировали другое. По данным литературы, увеличение абстрактных обобщений у ребенка дошкольного возраста приводит к тому, что обучение по аналогичной проекции из знакомых базовых областей становится все более значимым, при этом сформированные понятия усиливают более отдаленные сравнения посредством прогрессивного выравнивания [11, 17]. Это согласуется с полученными в настоящем исследовании результатами, что у 4–5-летних детей при формировании понятий «размер» и «форма контура» дедуктивная функция рассудка, которая в меньшей степени предполагает присутствие метода «проб и ошибок», начинает преобладать над индуктивной функцией, перед которой всегда имеет место длительный метод «проб и ошибок». Таким образом, с возрастом дети все больше используют уже имеющиеся у них понятия (актуализируют их, извлекая из памяти), а не формируют новые понятия.

Заключение

1. Дети 4–5 лет способны сформировать понятия «размер» и «форма/форма контура» с использованием реальных геометрических фигур и контурных изображений. Формирование понятий с использованием стимулов-изображений было достоверно более длительным в сравнении с использованием реальных фигур в качестве стимулов.

2. Выборка детей 4–5 лет, выполняющих формирование понятий с использованием контурных изображений в качестве стимулов, оказалась неоднородной: одни дети были способны сразу сформировать понятие, другим требовалось длительное обучение. Предполагается качественно разный подход к выполнению данной когнитивной задачи.

3. Разработанный экспериментальный дизайн эксперимента с одновременным предъявлением четырех стимулов-изображений без инструкций со стороны исследователя и использованием поискового поведения, ведущего к самостоятельному нахождению решения, может быть положен в основу психологического метода для изучения динамики психического развития ребенка и выявления задержек и отклонений в когнитивной сфере у детей дошкольного возраста, а также детей с проблемами в психо-речевой сфере.

Благодарности / Acknowledgments

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-015-00269 и в рамках государственных заданий № 0134-2019-0005 (ИФ РАН) и № 075-00776-19-02 (ИЭФБ РАН).

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare that there are no conflicts of interest.

Список литературы / References

1. Haun DBM, Call J, Janzen G, et al. Evolutionary psychology of spatial representations in the hominidae. *Curr Biol*. 2006; 16 (17): 1736–1740.
2. Xu F, Cote M, Baker A. Labeling guides object individuation in 12-month-old infants. *Psychol Sci*. 2005; 16 (5): 372–377.
3. Dukette D, Stiles J. Children's analysis of hierarchical patterns: evidence from a similarity judgment task. *J Exp Child Psychol*. 1996; 63 (1): 103–140.
4. Piazhе Zh. Child's speech and thinking. M.: Pedagogika-Press, 1999. 528 p. In Russian [Пиаже Ж. Речь и мышление ребенка. М.: Педагогика-Пресс, 1999. 528 с.].
5. Perlmutter M, Ricks M. Recall in preschool children. *J Exp Child Psychol*. 1979; 27 (3): 423–436.
6. Gentner D, Namy LL. Comparison in the development of categories. *Cognitive Development*. 1999; 14 (4): 487–513.
7. Vygotskij LS. Selected psychological studies. Thinking and speech. Problems of the psychological development of the child. M.: Izdatel'stvo Akademii pedagogicheskikh nauk RSFSR, 1956. 520 p. In Russian [Выготский Л.С. Избранные психологические исследования. Мышление и речь. Проблемы психологического развития ребенка. М.: Издательство Академии педагогических наук РСФСР, 1956. 520 с.].
8. Ashby FG, O'Brien JB. Category learning and multiple memory systems. *Trends Cogn Sci*. 2005; 9 (2): 83–89.
9. Brosnan MJ, Scott FJ, Fox S, et al. Gestalt processing in autism: failure to process perceptual relationships and the implications for contextual understanding. *J Child Psychol Psychiatry*. 2004; 45 (3): 459–469.
10. Smith JD, Tracy JI, Murray MJ. Depression and category learning. *J Exp Psychol Gen*. 1993; 122 (3): 331–346.
11. Gentner D, Hoyos C. Analogy and abstraction. *Top Cogn Sci*. 2017; 9 (3): 672–693.
12. Tikhonravov DL, Voitenkov VB, Golubeva IU, et al. Use of the method for the formation of the concepts of size and shape in preschool children for clinical research. *Pediatr=Pediatrician*. 2019; 10 (6): 45–52. In Russian [Тихонравов Д.Л., Войтенков В.Б., Голубева И.Ю. и др. Применение методики формирования понятий размера и формы у детей дошкольного возраста в клинических исследованиях. *Педиатр*. 2019; 10 (6):45–52].
13. Tikhonravov DL. Can primates form the empirical ideas of the elementary reason that is the highest cognitive function according to Immanuel Kant? The Sixth International conference on cognitive science. 2014: 97–99.

14. Tikhonravov DL, Dubrovskaya NM, Zhuravin IA. The notions of size and shape in old world monkeys: a comparative analysis of the formation process. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2018; 54 (3): 205–211. In Russian [Тихонравов Д.Л., Дубровская Н.М., Журавин И.А. Сравнительный анализ процесса формирования понятий размера и формы у низших обезьян (*Macaca mulatta*). *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2018; 54 (3): 205–211].

15. Golubeva IU, Kuznetsova TG, Shuvaev VT, et al. Identification of significant information by 4–9-year-old children. *Prilozhenie mezhdunarodnogo nauchnogo zhurnala «Vestnik psihofiziologii»=Application of the international scientific journal “Bulletin of Psychophysiology”*. 2018; 2:15–18. In Russian [Голубева И.Ю., Кузнецова Т.Г., Шувяев В.Т. и др. Выявление значимой информации детьми 4–9 лет. Приложение международного научного журнала «Вестник психофизиологии». 2018; 2: 15–18].

16. Richland LE, Morrison RG, Holyoak KJ. Children's development of analogical reasoning: insights from scene analogy problems. *J Exp Child Psychol*. 2006; 94 (3): 249–273.

17. Doumas LAA, Hummel JE, Sandhofer CM. A theory of the discovery and predication of relational concepts. *Psychol Rev*. 2008; 115 (1): 1–43.

18. Kant I. Critique of pure reason. M.: Misl', 1994. 591 p. In Russian [Кант И. Критика чистого разума. М.: Мысль, 1994. 591 с.].

Информация об авторах:

Голубева Инна Юрьевна, к.б.н., научный сотрудник лаборатории физиологии высшей нервной деятельности, ФГБУН «Институт физиологии им. И. П. Павлова» РАН;

Тихонравов Дмитрий Леонидович, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории сравнительной физиологии и патологии центральной нервной системы ИЭФБ РАН; доцент кафедры физиологии лечебного факультета Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Войтенков Владислав Борисович, к.м.н., заведующий отделением функциональных методов диагностики ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России; ассистент кафедры физической и реабилитационной медицины ФГБУ ФНЦРИ им. Г. А. Альбрехта Минтруда России; доцент кафедры нервных болезней Академии постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России;

Пашков Артём Юрьевич, врач-невролог отделения реабилитации ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России;

Первунина Татьяна Михайловна, д.м.н., директор Института перинатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Golubeva Inna U., PhD, Researcher, Laboratory of physiology of the Higher Nervous Activity, Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences;

Tikhonravov Dmitrii L., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Comparative Physiology and Pathology of the Central Nervous System, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences; Assistant Professor, Department of Physiology, Medical Faculty, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre;

Voitenkov Vladislav B., MD, PhD, Head of the Department of Functional Diagnostic Methods, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases; assistant, Department of Physical and Rehabilitation Medicine, Albrecht Federal Scientific Center of Rehabilitation of the Disabled; Assistant Professor, Department of Nervous Diseases, Academy of postgraduate education under FSBU FSCC of FMBA of Russia;

Pashkov Artem Y., Neurologist, Rehabilitation Department, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases;

Pervunina Tatiana M., MD, PhD, Director of the Institute of Perinatology and Pediatrics, Almazov National Medical Research Centre.

ОЦЕНКА КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Тютин К. В., Гуцин Я. А., Макарова М. Н., Макаров В. Г.

ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Тютин Ксения Владимировна,
ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации»,
пос. Кузьмолковский, стр. 245,
Всеволожский район, Ленинградская область, Россия, 188663.
E-mail: tyutina.kv@doclinika.ru

Статья поступила в редакцию 06.05.2020
и принята к печати 12.10.2020.

Резюме

Актуальность. Исследование красного костного мозга (ККМ) в доклинических исследованиях является важной составляющей программы изучения лекарственного средства. **Цель.** Провести сравнительную оценку результатов, получаемых в параллельных исследованиях материала от одного и того же животного двумя разными методами для крыс, кроликов и мышей (цитологическое исследование материала, полученного из бедренной кости, и гистологическое исследование материала, полученного из грудины). **Материалы и методы.** Был изучен костный мозг, полученный от интактных животных. Цитологический препарат окрашивали по Романовскому–Гимзе, а гистологический подготавливали обычным образом и окрашивали гематоксилин-эозином. Окрашенные препараты исследовали с помощью микроскопа. **Результаты.** В результате данного исследования были получены массивы данных миелограмм с лейкоэритробластным соотношением и индексом созревания нейтрофилов. **Заключение.** При проведении доклинических исследований наиболее целесообразными можно признать забор костного мозга из бедренной кости; забор можно проводить как для цитологического исследования, так и для гистологического; с учетом высокой вариативности показателей в доклинических исследованиях миелограмм необходимо иметь группы интактных животных того же вида, не получавших исследуемый препарат; наименее вариативны оказались миелограммы у кроликов как по результатам собственных исследований, так и при сравнении с литературными данными, что позволяет признать кроликов наилучшим объектом для изучения состава и функции красного костного мозга. При сравнении литературных данных существенных закономерностей по количеству клеток в разных возрастных периодах у изученных видов животных не наблюдалось, и, следовательно, в доклинических исследованиях с анализом ККМ можно использовать животных любого возраста.

Ключевые слова: гистологическое исследование, красный костный мозг, лейкоциты, миелограмма, цитологическое исследование.

Для цитирования: Тютин К.В., Гуцин Я.А., Макарова М.Н. и др. Оценка красного костного мозга в доклинических исследованиях. Трансляционная медицина. 2020; 7 (5): 119-130. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-119-130

EVALUATION OF BONE MARROW IN PRECLINICAL STUDIES

Tyutina K. V., Gushchin Y. A., Makarova M. N., Makarov V. G.

Saint Petersburg Institute of Pharmacy, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Tyutina Ksenia V.,
Saint Petersburg Institute of Pharmacy,
Kuzmolovskiy settl. 245, Vsevolozhsk
district, Leningrad region, Russia, 188663.
E-mail: tyutina.kv@doclinika.ru

Received 06 May 2020; accepted 12 October
2020.

Abstract

Background. The study of red bone marrow in preclinical studies is an important component of the study program of the drug. **Objective.** To compare the results obtained in parallel studies of the material from the same animal by two different methods for rats, rabbits and mice (cytological examination of the material obtained from the femur and histological examination of the material obtained from the sternum). **Design and methods.** Bone marrow obtained from intact animals was studied. Cytological preparation was stained according to Romanowski–Giemsa, histological preparation was prepared in the usual way and stained with hematoxylin-eosin. Stained preparations were examined by microscope. **Results.** As a result of this study was sets of myelograms with leuko-erythroblast ratio and neutrophil maturation index. **Conclusion.** A number of conclusions were made: when conducting preclinical studies, the most appropriate can be considered a bone marrow sampling from the femur; the fence can be carried out both for cytological examination, and for histological; taking into account the high variability of indicators in preclinical studies of myelograms, it is necessary to have control groups of (intact) animals of the same species that did not receive the study drug; Myelograms in rabbits turned out to be the least varied, both according to the results of our own studies (with histological and cytological studies), and when compared with literature data, which allows us to recognize rabbits as the best object for studying the composition and function of red bone marrow; when comparing the literature data, significant patterns in the number of cells at different age periods were not observed in the studied animal species, and, therefore, in preclinical studies using KKM analysis, animals of any age can be used

Key words: cytological examination, histological examination, leukocytes, myelogram, red bone marrow.

For citation: Tyutina KV, Gushchin YA, Makarova MN, et al. Evaluation of bone marrow in preclinical studies. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020; 7 (5): 119-130. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-5-119-130

Список сокращений: ККМ — красный костный мозг.

Введение

Исследование красного костного мозга (ККМ) в доклинических исследованиях является важной составляющей программы изучения лекарственного средства. Необходимость в этом возникает при оценке противоопухолевых, противосудорожных, некоторых противомикробных и противовоспалительных препаратов. При исследовании препарата, для которого заранее известно или предполагается

с большой долей вероятности, что он может влиять на ККМ, необходимо предусмотреть процедуру извлечения костного мозга для расчета миелограммы и иметь специалиста, способного провести подобный анализ. Если изучаемый лекарственный препарат абсолютно новый или это препарат, для которого влияние на ККМ ранее не было проверено, а в ходе исследования выявлены существенные изменения формулы периферической крови, то принятие решения об исследовании ККМ должно произойти пока исследование не вступило в завершающую фазу.

Существует несколько способов исследования ККМ, среди которых самые распространенные методы цитологического и гистологического анализа. Чаще в качестве оценки используют цитологическое исследование костного мозга. Однако появляется все больше данных о гистологической диагностике таких нарушений, хотя их гистологическая верификация довольно сложна и требует высокой квалификации оператора, проводящего анализ.

Цитологическое исследование ККМ позволяет оценить процентное соотношение различных фракций клеток крови и их предшественников, косвенно оценить цитоз и состояние мегакариоцитарного ростка. Плюсами этого метода исследования считаются достаточно высокая информативность при небольших материальных затратах, сравнительная быстрота исследования и получение количественных характеристик исследуемого объекта [1–3]. К недостаткам этого метода в доклинических исследованиях можно отнести тот факт, что, как правило, анализ периферической крови проводится одновременно или после эвтаназии животных, а при обнаружении отклонений уже невозможно забрать ККМ на анализ, то есть требуется дополнительное исследование для выявления наличия/отсутствия изменений в ККМ. Также исследование трудоемкое как на этапе получения образцов, так и на этапе анализа. Приготовленные для анализа образцы не рекомендуют долго хранить (до 1 недели в нативном виде).

В отличие от цитологического исследования костного мозга, гистологическое позволяет более точно оценить клеточность костного мозга, соотношение и локализацию клеток различных ростков гемопоэза, состояние стромы, васкуляризацию костного мозга, наличие реактивных изменений, наличие плазматических клеток, гистиоцитов, макрофагов, тучных клеток, нарушение обмена железа [4–5]. К недостаткам метода можно отнести длительность приготовления гистологических препаратов (до 2 недель), но при этом материал может быть забран в ходе эвтаназии животных еще при отсутствии информации о необходимости исследования ККМ и сохранен до 1 года без потерь.

Целью данного исследования стала сравнительная оценка результатов, получаемых в параллельных исследованиях материала от одного и того же животного двумя разными методами для крыс, кроликов и мышей (цитологическое исследование материала, полученного из бедренной кости, и гистологическое исследование материала, полученного из грудины). Также чуть позднее дополнительно было проведено гистологическое исследование

материала, полученного из бедренной кости от животных тех же видов.

Материалы и методы

В нашем исследовании был изучен костный мозг, полученный от интактных животных, используемых в ходе работ, проводимых в организации, то есть специально для данного эксперимента эвтаназию животных не проводили. Цитологический препарат окрашивали по Романовскому–Гимзе, а гистологический подготавливали обычным образом [4–5] и окрашивали гематоксилин-эозином. Окрашенные препараты исследовали с помощью микроскопа (ув. $\times 1000$).

В результате данного исследования были получены массивы данных миелограмм с лейко-эритробластным соотношением и индексом созревания нейтрофилов (табл. 1–3).

Соотношение лейкоцитов (Leu) и эритроцитов (Er) рассчитывали по формуле:

$$\text{Соотношение Leu/Er} = (\text{Миелоциты (\%)} + \text{Метамиелоциты (\%)} + \text{Палочкоядерные нейтрофилы (\%)} + \text{Сегментоядерные нейтрофилы (\%)}) / (\text{Предшественники эритроцитов (\%)}).$$

Индекс созревания нейтрофилов рассчитывали по формуле:

$$\text{Индекс созревания нейтрофилов} = (\text{Миелоциты (\%)} + \text{Метамиелоциты (\%)}) / (\text{Палочкоядерные нейтрофилы (\%)} + \text{Сегментоядерные нейтрофилы (\%)}).$$

Для массивов каждого из видов были рассчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего.

Результаты

Как видно из данных, представленных в таблице 1, при гистологическом анализе клеточного состава ККМ грудины наиболее вариативными показателями являются бластные клетки (% ошибки у разных видов животных составляет от 60 до 76 %), что связано с относительным разобщением эритроцитарного и лимфоцитарного ростков кроветворения, а также сложностью получения монослоя клеток в срезе, в результате чего затруднена дифференцировка клеток. Относительно высокий процент ошибки наблюдался и при оценке лимфоцитов (от 40 до 60 %).

Такая высокая вариабельность, как было указано выше, связана со сложностью анализа препаратов, а также с длительным процессом декальцинации,

Таблица 1. Результаты исследования ККМ, полученного из грудины, гистологическим методом ($M \pm m$, %)

Параметр \ Вид животных	Кролики, n = 7		Мыши, n = 5		Крысы, n = 7	
	$M \pm m$	% ошибки	$M \pm m$	% ошибки	$M \pm m$	% ошибки
Предшественники эритроцитов	$20 \pm 4,5$	22	$27 \pm 6,6$	24	$25 \pm 4,3$	17
Миелоциты и метамиелоциты	$20 \pm 7,1$	35	$21 \pm 4,5$	21	$32 \pm 5,6$	17
Палочкоядерные и с/я нейтрофилы	$33 \pm 7,1$	22	$35 \pm 7,4$	21	$28 \pm 4,8$	17
Предшественники эозинофилов	$8 \pm 2,8$	35	$4 \pm 1,9$	46	$6 \pm 1,9$	30
Моноциты	$8 \pm 2,5$	32	$4 \pm 1,5$	40	$2 \pm 1,0$	41
Лимфоциты	$10 \pm 6,3$	64	$8 \pm 3,0$	40	$6 \pm 2,3$	41
Бластные клетки	$1,60 \pm 1,07$	67	$0,88 \pm 0,53$	60	$1,41 \pm 1,07$	76
Индекс созревания нейтрофилов	$0,68 \pm 0,36$	53	$0,64 \pm 0,27$	42	$1,20 \pm 0,38$	32
Соотношение Leu/Er	$3,16 \pm 0,74$	24	$2,33 \pm 0,70$	30	$2,74 \pm 0,56$	20

Таблица 2. Результаты исследования ККМ, полученного из бедренной кости, гистологическим методом ($M \pm m$, %)

Параметр \ Вид животных	Кролики, n = 7		Мыши, n = 10		Крысы, n = 7	
	$M \pm m$	% ошибки	$M \pm m$	% ошибки	$M \pm m$	% ошибки
Предшественники эритроцитов	$23 \pm 2,2$	10	$27 \pm 4,1$	15	$23 \pm 2,4$	11
Миелоциты и метамиелоциты	$20 \pm 3,4$	17	$28 \pm 3,2$	11	$36 \pm 4,7$	13
Палочкоядерные и с/я нейтрофилы	$37 \pm 3,2$	9	$28 \pm 3,9$	14	$20 \pm 3,6$	19
Предшественники эозинофилов	$9 \pm 0,4$	5	$7 \pm 1,1$	15	$9 \pm 2,6$	30
Моноциты	$4 \pm 0,9$	20	$4 \pm 0,9$	24	$5 \pm 1,9$	36
Лимфоциты	$5 \pm 1,2$	22	$5 \pm 1,1$	22	$5 \pm 1,3$	24
Бластные клетки	$1,49 \pm 0,77$	51	$1,07 \pm 0,72$	67	$1,48 \pm 0,63$	43
Индекс созревания нейтрофилов	$0,55 \pm 0,14$	25	$1,00 \pm 0,18$	18	$1,96 \pm 0,77$	39
Соотношение Leu/Er	$2,96 \pm 0,34$	11	$2,41 \pm 0,51$	21	$2,81 \pm 0,42$	15

что приводит к значительным искусственным изменениям в финальном препарате (рис. 1–4).

Если сравнить вариабельность показателей между разными видами животных, то наименее

«вариабельными» животными можно считать крыс (за исключением показателя бластных клеток).

Как видно из данных, представленных в таблице 2, при гистологическом анализе клеточного состава

ККМ бедренной кости вариabельность по всем видам животных существенно ниже, чем при анализе грудины. Наиболее вариативными показателями также являются бластные клетки (% ошибки у разных видов животных составляет от 43 до 67 %). При оценке лимфоцитов вариabельность при такой локализации забора ККМ существенно ниже (от 22 до 24 %).

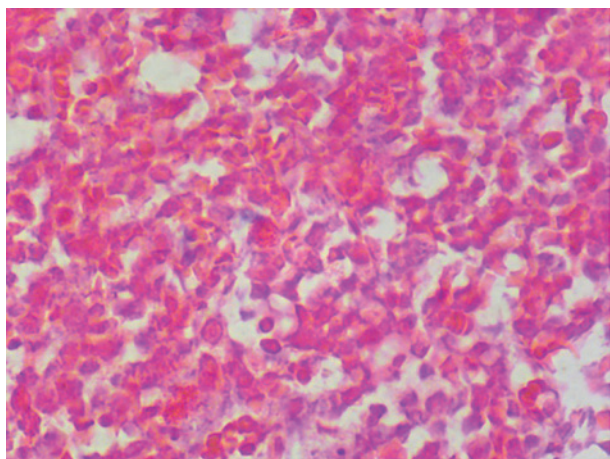


Рис. 1. Срез грудины крысы. Клетки искусственно изменены после декальцинации, толстый срез. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение ×400

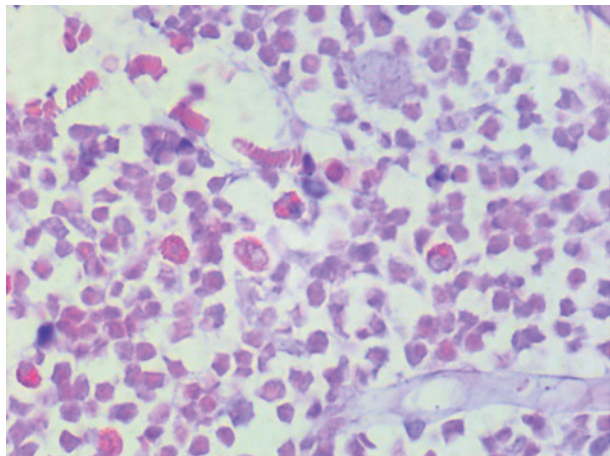


Рис. 2. Срез грудины кролика. Клетки искусственно изменены после декальцинации. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение ×400

Если сравнить вариabельность показателей между разными видами животных, то наименее «вариabельными» животными можно считать кроликов.

При изготовлении препаратов костного мозга, взятого из бедренной кости животных, большинство имело удовлетворительное качество изготовления. Основная проблема состояла в получении достаточно тонкого среза. Но из-за скудного объема получаемого

материала (особенно у мышей) не удалось получить тонкий срез на значительном протяжении, что затрудняло дифференцировку клеток. Еще одним фактором является «деликатность» материала и его сжатие в процессе гистологической проводки (рис. 5–8).

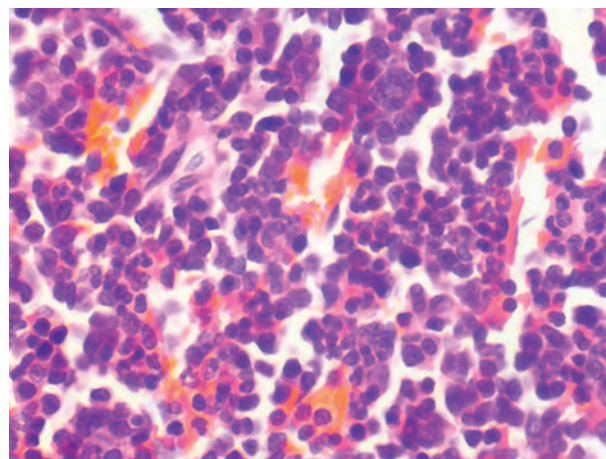


Рис. 3. Срез грудины кролика. Клетки частично искусственно изменены после декальцинации, толстый срез. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение ×400

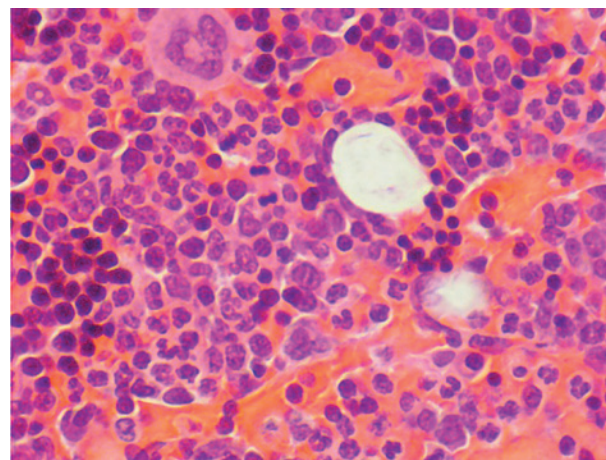


Рис. 4. Срез грудины крысы. Клетки в меньшей степени искусственно изменены после декальцинации, срез 2–4 слоя клеток, возможна дифференцировка клеток. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение ×400

В целом можно сделать вывод, что гистологический метод исследования костного мозга грудины не оправдал себя. В то же время материал, полученный из бедренной кости, при исключении этапа декальцинации, пригоден для анализа, хотя для получения более достоверных данных, вероятно, необходимо увеличить количество анализируемых клеток в 1,5–2 раза, что, однако, значительно удлинит время анализа.

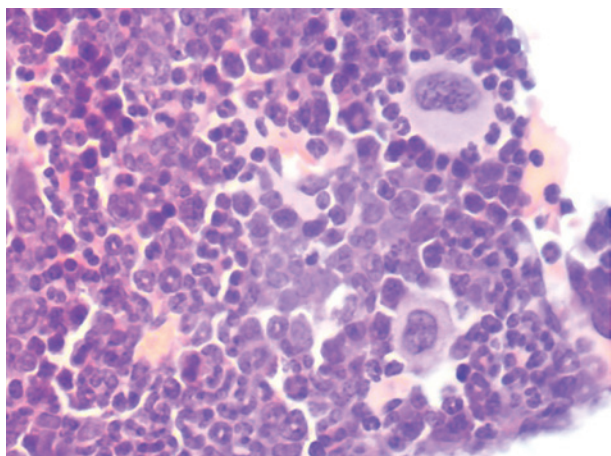


Рис. 5. Срез костного мозга из бедренной кости крысы. Толстый срез. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 400$

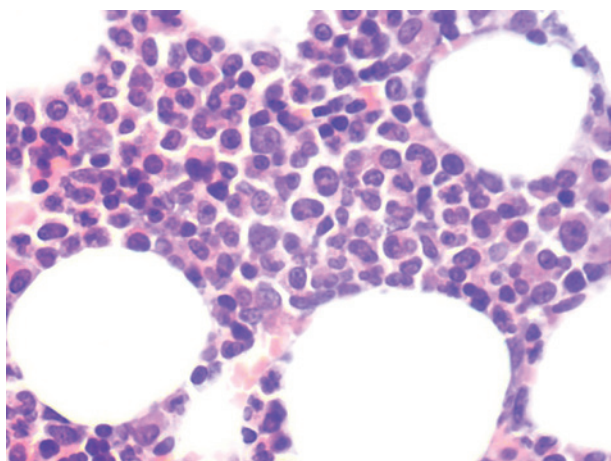


Рис. 6. Срез костного мозга из бедренной кости крысы. Удовлетворительная толщина среза в 2–3 слоя клеток, хорошее качество окраски. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 400$

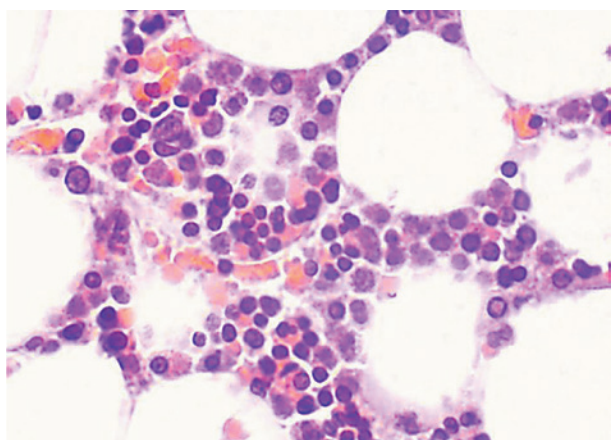


Рис. 7. Срез костного мозга из бедренной кости мыши. Удовлетворительная толщина среза в 2–3 слоя клеток, хорошее качество окраски. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 400$

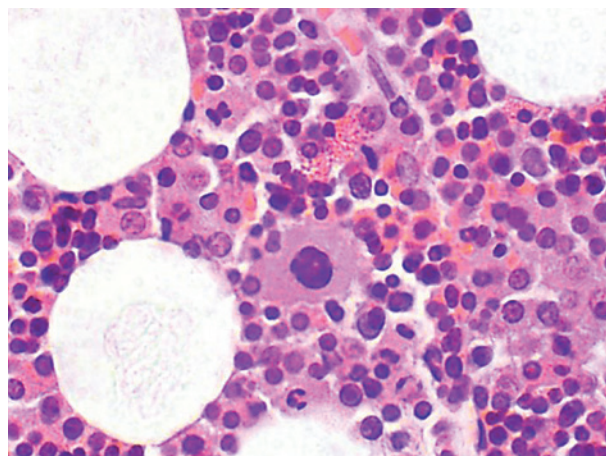


Рис. 8. Срез костного мозга из бедренной кости кролика. Удовлетворительная толщина среза в 2–3 слоя клеток, хорошее качество окраски. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 400$

Как видно из данных, представленных в таблице 3, при цитологическом анализе клеточного состава ККМ бедренной кости вариативность по всем видам животных довольно высока. Наиболее вариативным показателем оказались также бластные клетки (% ошибки у разных видов животных составляет от 42 до 99 %). На увеличение вариативности оказывают влияние многие факторы, в том числе нарушение структуры ККМ при изготовлении препарата (смещение клеток во время выполнения мазка, нарушение микроархитектоники ткани), особенности окрашивания (более толстые участки препарата хуже прокрашиваются при стандартном протоколе окрашивания, однако, если намеренно увеличивать время окрашивания или концентрацию красителя, и более тонкие участки «перекрашиваются», что создает трудности для интерпретации видов клеток) (рис. 9, 10). Очень высокая вариативность отмечена также для моноцитов при исследовании ККМ от крыс (199 %) и мышей (87 %), а также для предшественников эозинофилов от крыс (91 %) и от мышей (149 %).

Интересно, что полученные данные совпадали с литературными (табл. 4–6), где также наблюдалась наибольшая вариативность у крыс и мышей по моноцитам, а у мышей и кроликов по показателю лимфоцитов. Если сравнить вариативность показателей между разными видами животных, то наименее вариативными животными можно считать кроликов.

Статистически значимых различий между результатами, полученными с помощью всех трех использованных методик, обнаружено не было (был использован t-критерий Стьюдента). Примечательно, что нет различий между результатами гистоло-

Таблица 3. Результаты исследования ККМ, полученного из бедренной кости, цитологическим методом ($M \pm m$, %)

Вид животных Параметр	Кролики, n = 7		Мыши, n = 5		Крысы, n = 7	
	$M \pm m$	% ошибки	$M \pm m$	% ошибки	$M \pm m$	% ошибки
Предшественники эритроцитов	$39 \pm 3,0$	8	$34 \pm 5,6$	17	$28 \pm 5,6$	20
Миелоциты и метамиелоциты	$11 \pm 1,3$	12	$14 \pm 4,3$	31	$19 \pm 7,9$	41
Палочкоядерные и с/я нейтрофилы	$33 \pm 3,6$	11	$32 \pm 6,4$	20	$37 \pm 8,6$	23
Предшественники эозинофилов	$7 \pm 1,8$	27	$0 \pm 0,3$	149	$2 \pm 1,7$	91
Моноциты	$2 \pm 0,3$	15	$0 \pm 0,2$	87	$0 \pm 0,7$	199
Лимфоциты	$5 \pm 3,9$	74	$19 \pm 8,1$	43	$13 \pm 4,6$	35
Бластные клетки	$2,26 \pm 2,24$	99	$1,34 \pm 0,56$	42	$0,60 \pm 0,54$	90
Индекс созревания нейтрофилов	$0,35 \pm 0,04$	13	$0,44 \pm 0,11$	25	$0,54 \pm 0,21$	38
Соотношение Leu/Eg	$1,30 \pm 0,10$	8	$1,41 \pm 0,37$	26	$2,18 \pm 0,65$	30

гического исследования ККМ, полученного от разных животных из бедренной кости и из грудины.

Данные, полученные в результате подсчета миелограмм в цитологических препаратах, совпадают с данными, представленными нами ранее в справочнике «Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных» [6].

Данные цитологического исследования ККМ, представленные в литературе [2, 7, 8–15], очень разнообразны и различаются между собой, при анализе обращает на себя внимание факт отсутствия единой системы подсчета миелограмм, отсутствие единого принципа анализа полученных данных и большая вариативность. Процитированные нами авторы приводят результаты по разному набору групп клеток, используя либо абсолютные значения подсчета клеток, либо процентное соотношение по отдельным группам клеток, например отдельный пересчет на 100 % эритроидного и миелоидного ростков, либо процентные соотношения по всем группам клеток. В сравнении с полученными нами данными, принятыми за 100 %, данные различных публикаций отличались на 20–1600% (табл. 4–6), при этом наименьшие различия были обнаружены в литературных данных, полученных для кроликов, где отличия составили 20–250 %, тогда как для мышей и для крыс различия достигали больших значений (50–1200 % для крыс и 50–1600 % для мышей).

Значение процентного соотношения вычислялось по формуле:

$$\text{Процентное соотношение} = (A \times 100 \%) / B,$$

где А — значение (в %) группы клеток по отношению ко всему числу клеток, указанное в литературных источниках, В — значение (в %) группы клеток по отношению ко всему числу клеток, полученное в рамках проведенного нами исследования.

Высокая сходимость данных, полученных нами в 2013 [6] и 2020 гг., связана с тем, что для получения и тех, и других результатов использовались животные из одного источника, а аналитические манипуляции проводились по единому протоколу, при этом существенных закономерностей по количеству клеток в разных возрастных периодах у крыс не наблюдалось, но наблюдались существенные отличия у самцов и самок.

Заключение

Проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. При проведении доклинических исследований наиболее целесообразным можно признать забор костного мозга из бедренной кости.
2. Забор можно проводить как для цитологического исследования, так и для гистологического. При этом вариативность гистологического исследова-

Таблица 4. Процентное соотношение показателей миелограм относительно полученных нами значений у крыс

Литературные источники	Hulse E. V. (1964)		Endicott K. M., & Ott M. (1945)		Справочник (2013)										M ± m, %*
	15 мес.	16 мес.	< 60 дней	> 60 дней	♂ 8 нед.	♂ 12 нед.	♂ 20 нед.	♂ 32 нед.	♂ 36 нед.	♀ 8 нед.	♀ 12 нед.	♀ 20 нед.	♀ 32 нед.	♀ 36 нед.	
Пол, возраст животных	102	103	191	110	107	117	122	118	120	105	100	101	105	109	115 ± 23
Предшественники эритроцитов	58	38	43	78	49	41	49	48	47	40	43	45	44	47	48 ± 10
Миелоциты и метамиелоциты	59	56	43	78	77	73	64	64	63	76	70	66	70	67	66 ± 9
Палочкоядерные и с/я нейтрофилы	228	207	249	430	57	57	52	57	57	110	78	84	102	87	133 ± 109
Предшественники эозинофилов	609	487	—	—	2557	2313	2161	2648	2617	87	143	131	117	118	1166 ± 1160
Моноциты	139	187	114	103	131	170	162	162	162	124	135	124	124	124	140 ± 25
Лимфоциты	417	317	217	317	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	317 ± 82
Бластные клетки	95	66	87	49	63	55	75	73	72	82	95	106	98	108	80 ± 19
Индекс созревания нейтрофилов	62	53	28	88	105	110	87	96	101	104	100	100	100	96	88 ± 24
Соотношение Leu/Eg															

Примечание: * — среднее значение по всем литературным источникам относительно, полученных нами значений.

Таблица 5. Процентное соотношение показателей миелограмм относительно полученных нами значений у кроликов

Литературные источники	Справочник (2013)		Sabin F. R., et al. (1936)					Дико-винова Н. В., 1957	M ± m, %
	Самцы	Самки	1 мес.	2 мес.	3 мес.	4 мес.	5 мес.		
Пол, возраст животных									
Предшественники эритроцитов	105	105	118	153	140	97	132	108	120 ± 20
Миелоциты и метамиелоциты	94	36	88	42	40	35	44	91	59 ± 27
Палочкоядерные и с/я нейтрофилы	269	271	113	90	108	140	119	91	150 ± 76
Предшественники эозинофилов	33	36	6	10	40	13	16	21	22 ± 13
Моноциты	76	80	—	—	—	—	—	67	74 ± 6
Лимфоциты	270	250	—	—	—	—	—	221	247 ± 24
Бластные клетки	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Индекс созревания нейтрофилов	110	103	78	47	37	25	37	100	67 ± 35
Соотношение Leu/Et	107	115	84	47	62	110	69	78	84 ± 25

дования меньше, чем цитологического, что может быть связано со смещением материала, нарушением архитектоники костного мозга (в отличие от материала для гистологического анализа).

3. С учетом высокой вариативности показателей в доклинических исследованиях миелограмм необходимо иметь группы контроля (интактных) животных того же вида, не получавших исследуемый препарат.

4. Наименее вариативны оказались миелограммы у кроликов как по результатам собственных исследований (при гистологическом и при цитологическом исследованиях), так при сравнении с литературными данными, что позволяет признать кроликов наилучшим объектом для изучения состава и функции красного костного мозга.

5. При сравнении литературных данных существенных закономерностей по количеству клеток в разных возрастных периодах у изученных видов животных не наблюдалось, а, следовательно, в доклинических исследованиях при анализе ККМ можно использовать животных любого возраста.

Полученные данные предполагается использовать в качестве норм для выполнения исследовательских работ. Для проведения оценки изменений в ККМ в течение одного исследования следует

придерживаться какой-либо одной методики получения миелограмм — цитологической или гистологической. Также рекомендуется для каждой отдельной научно-исследовательской организации или лаборатории вырабатывать собственные правила подсчета миелограммы и выводить средние значения, так как миелограммы животных из разных источников могут различаться, особенности интерпретации элементов костного мозга оператором также могут иметь место.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Valli VE, Villeneuve DC, Reed B, et al. Evaluation of blood and bone marrow, rat. In: Jones TC, Ward JM, Mohr U, et al., eds. Hemopoietic System. Berlin: Springer-Verlag, 1990: 9–26.
2. Bolliger AP. Cytologic evaluation of bone marrow in rats: indications, methods, and normal morphology. Vet Clin Pathol. 2004; 33 (2): 58–67.
3. Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. Toxicol Pathol. 2006; 34 (5): 548–565.
4. Travlos GS. Histopathology of bone marrow. Toxicol Pathol. 2006; 34 (5): 566–598.

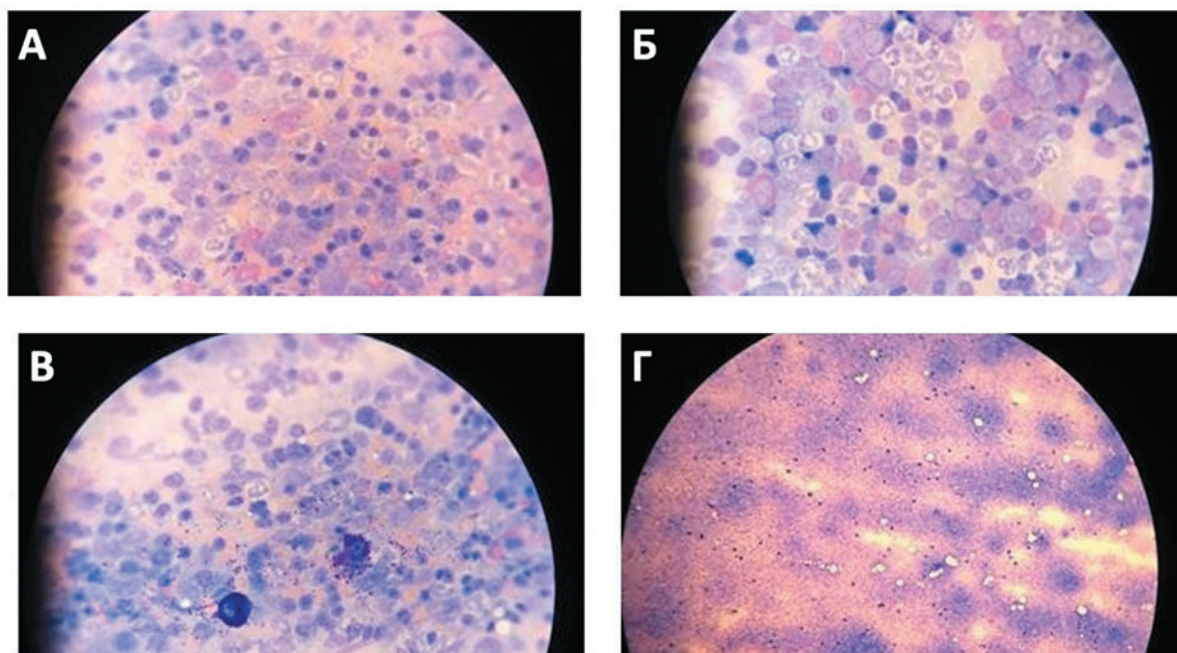


Рис. 9. Микрофотографии препаратов ККМ мышей (а), крыс (б), кроликов (в, г):

а, б — поля зрения с хорошим качеством мазка и окрашивания, заметны предшественники эозинофилов ($\times 1000$, иммерсия), в — тучные клетки в препарате костного мозга кролика ($\times 1000$, иммерсия), г — мегакариоциты в костном мозге кролика ($\times 100$, иммерсия)

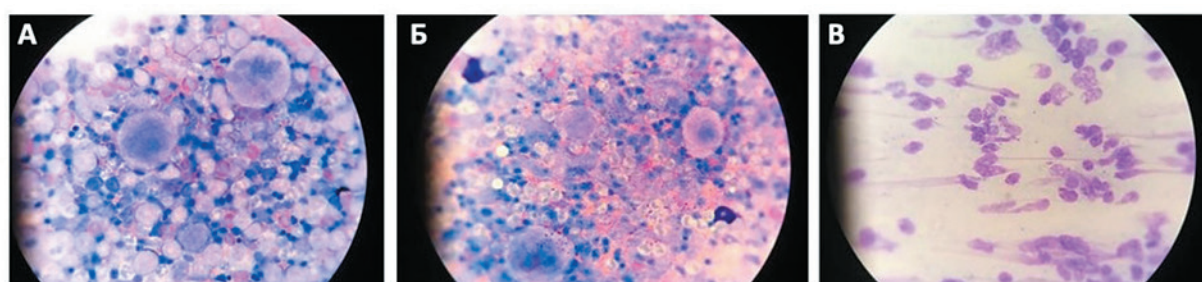


Рис. 10. Микрофотографии препаратов ККМ мышей (а), кроликов (б), крыс (в):

а, б — недостаточное окрашивание препарата в толстом слое ($\times 1000$, иммерсия), в — разрушенные клетки в результате приготовления мазка ($\times 1000$, иммерсия)

5. Reagan WJ, Irizarry-Rovira A, Poitout-Belissent F, et al. Best practices for evaluation of bone marrow in nonclinical toxicity studies. *Toxicol Pathol.* 2011; 39 (2): 435–448.

6. Makarov VG, Makarova MN. Physiological, biochemical and biometric indicators of the norm of experimental animals: reference book. SPB.: LEMA, 2013. 116 p. In Russian [Макаров В.Г., Макарова М.Н. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных: справочник. СПб.: ЛЕМА, 2013. 116 с.].

7. Endicott KM, Ott M. The normal myelogram in albino rats. *The Anatomical Record.* 1945: 61–69.

8. Hulse EV. Quantitative cell counts of the bone marrow and blood and their secular variations in the normal adult rat. *Acta Haematol.* 1964; 31: 50–63.

9. Sabin FR, Miller FR, Smithburn KC, et al. Changes in the bone marrow and blood cells of developing rabbits. *J Exp Med.* 1936; 64 (1): 97–120.

10. Dikvinova NV. The absolute number of cells in bone marrow and myelograms of normal rabbits. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 1957: 1129–1132.

11. Chervenick PA, Boggs DR, Marsh JC, et al. Quantitative studies of blood and bone marrow neutrophils in normal mice. *Am J Physiol.* 1968; 215 (2): 353–360.

12. Matsumoto K, Futamura Y. Cell counts in peripheral blood and bone marrow of male CBA/N mice. *J Vet Med Sci.* 1995; 57 (4): 755–756.

13. Vorob'eva OV. Dynamics of the morphofunctional state of bone marrow cell-differons as a hematopoietic organ. *Zhurnal anatomii i gistopatologii=Journal of Anatomy and Histopathology.* 2017; 6 (2): 26–29. In Russian [Воробье-

Таблица 6. Процентное соотношение показателей миелиогранм относительно полученных нами значений у мышей

Литературные источники	Cher-venick P. A., et al. (1968)	Matsumoto K., et al. (1994)							Воро-бьева О. В. (2017)	Min Yang, et al. (2013)	Endicott K. M., et al. (1950)		M ± m, %
		SCID			C.B-17						C-57	CFW Strain	
		1 мес.	2 мес.	7 мес.	1 мес.	2 мес.	7 мес.						
Пол, возраст, линия животных													
Предшественники эритроцитов	56	111	68	88	116	98	61	85	75	90	80	84 ± 19	
Миелоциты и метамиелоциты	90	94	194	145	57	113	153	40	37	90	115	102 ± 48	
Палочкоядерные и с/я нейтрофилы	52	101	124	115	63	109	124	83	95	65	76	92 ± 25	
Предшественники эозинофилов	1591	628	358	805	508	426	589	4000	1136	4545	3409	1636 ± 1569	
Моноциты	–	971	677	656	407	585	421	–	4364	–	–	1154 ± 1428	
Лимфоциты	204	51	23	30	149	60	65	60	113	130	122	92 ± 56	
Бластные клетки	–	–	–	–	–	–	–	254	–	22	60	112 ± 124	
Индекс созревания нейтрофилов	169	91	153	123	87	101	120	47	38	135,6	147	110 ± 42	
Соотношение Leu/Eg	110	93	216	145	56	115	226	80	157	100	126	129 ± 53	

ва О.В. Динамика морфофункционального состояния клеточных дифферонов костного мозга как органа кроветворения. Журнал анатомии и гистопатологии. 2017; 6 (2): 26–29].

14. Yang M, Büsche G, Ganser A., et al. Morphology and quantitative composition of hematopoietic cells in murine bone marrow and spleen of healthy subjects. Ann Hematol. 2013; 92 (5): 587–594.

15. Endicott KM, Gump H. Hemograms and myelograms of healthy female mice of C-57 brown and CFW strains. Blood. 1947; 1: 60–63.

Информация об авторах:

Тютин Ксения Владимировна, младший научный сотрудник группы фармакокинетики ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации»;

Гущин Ярослав Александрович, руководитель отдела гистологии и патоморфологии ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации»;

Макарова Марина Николаевна, д.м.н., заместитель директора по науке ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации»;

Макаров Валерий Геннадьевич, д.м.н., директор ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации».

Author information:

Tyutina Kseniya V., Junior Researcher of Pharmacokinetic Department Saint Petersburg Institute of Pharmacy;

Gushchin Yaroslav A., Head of the Department of Histology and Pathomorphology, pathomorphologist Saint Petersburg Institute of Pharmacy;

Makarova Marina N., Dr. Sc., Deputy Director for Science Saint Petersburg Institute of Pharmacy;

Makarov Valeriy G., Dr. Sc., Director of Saint Petersburg Institute of Pharmacy.

