

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Денис Ребриков, д. б. н., профессор

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА Александр Эттингер, д. м. н., профессор

РЕДАКТОРЫ Валентина Гейдебрект, к. б. н.; Надежда Тихомирова

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР Евгений Лукьянов

ПЕРЕВОДЧИКИ Надежда Тихомирова, Вячеслав Витюк

ДИЗАЙН И ВЕРСТКА Марины Дорониной

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Аверин, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)
М. Азизоглу, MD PhD (Стамбул, Турция)
Н. Н. Алипов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
В. К. Боженко, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)
Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)
Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)
Г. Е. Гендлин, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)
Л. Р. Горбачева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
И. Г. Гордеев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)
Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Т. В. Зарубина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Е. Каган, профессор (Питтсбург, США)
Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)
Б. А. Кобринский, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. В. Козлов, MD PhD (Вена, Австрия)
Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)
М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)
Н. Е. Мантурова, д. м. н. (Москва, Россия)
О. Ю. Милушкина, д. м. н., доцент (Москва, Россия)
З. Б. Митупов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)
А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)
Ю. П. Пивоваров, д. м. н., академик РАН, профессор (Москва, Россия)
Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. Ю. Разумовский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
О. Ю. Реброва, д. м. н. (Москва, Россия)
А. С. Рудой, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)
А. К. Рылова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
Н. А. Скоблина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. М. Смирнов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
А. Спаллоне, д. м. н., профессор (Рим, Италия)
В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)
С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Х. П. Тахчиди, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
У. Н. Туманова, д. м. н. (Москва, Россия)
О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Л. Филипенко, к. б. н. (Новосибирск, Россия)
Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)
М. А. Чундокова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Л. Н. Шишкина, д. б. н. (Новосибирск, Россия)
А. И. Щеголев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ <http://vestnikrgmu.ru/login>

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@vestnikrgmu.ru

АДРЕС РЕДАКЦИИ ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2023: 0,8

Журнал включен в WoS. JCR 2021: 0,5

Индекс Хирша (h²) журнала по оценке Google Scholar: 10

Scopus[®]

WEB OF SCIENCE™

Google
scholar

SCImago Journal & Country Rank 2020: 0,14

Журнал включен в Перечень 31.01.2020 (№ 507)

Здесь находится открытый архив журнала

SJR
Scimago Journal & Country Rank

 **ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)**

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2025-03

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Учредитель и издатель — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International www.creativecommons.org



Подписано в печать 30.06.2025

Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc, professor

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Alexander Oettinger, DSc, professor

EDITORS Valentina Geidebrekht, PhD; Nadezda Tikhomirova

TECHNICAL EDITOR Evgeny Lukyanov

TRANSLATORS Nadezda Tikhomirova, Vyacheslav Vityuk

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

Averin VI, DSc, professor (Minsk, Belarus)

Azizoglu M, MD PhD (Istanbul, Turkey)

Alipov NN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)

Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)

Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)

Gendlin GYe, DSc, professor (Moscow, Russia)

Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)

Gorbacheva LR, DSc, professor (Moscow, Russia)

Gordeev IG, DSc, professor (Moscow, Russia)

Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)

Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)

Zarubina TV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Kagan VE, professor (Pittsburgh, USA)

Kzyshkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)

Kobrinskii BA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Kozlov AV, MD PhD, (Vienna, Austria)

Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)

Lebedev MA, PhD (Darem, USA)

Manturova NE, DSc (Moscow, Russia)

Milushkina OYu, DSc, professor (Moscow, Russia)

Mitupov ZB, DSc, professor (Moscow, Russia)

Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)

Pivovarov YuP, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Razumovskii AYU, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Rebrova OYu, DSc (Moscow, Russia)

Rudoy AS, DSc, professor (Minsk, Belarus)

Rylova AK, DSc, professor (Moscow, Russia)

Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Skoblina NA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Smirnov VM, DSc, professor (Moscow, Russia)

Spallone A, DSc, professor (Rome, Italy)

Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)

Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Takhchidi KhP, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

Tumanova UN, MD (Moscow, Russia)

Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)

Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)

Khazipov RN, DSc (Marsel, France)

Chundukova MA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Schegolev AI, MD, professor (Moscow, Russia)

Shimanovskii NL, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)

Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

SUBMISSION <http://vestnikrgmu.ru/login?lang=en>

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

ADDRESS ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997

Indexed in Scopus. CiteScore 2023: 0,8



Indexed in WoS. JCR 2021: 0.5



Five-year h-index is 10



SCImago Journal & Country Rank 2020: 0.14



Listed in HAC 31.01.2020 (№ 507)



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Open access to archive



Issue DOI: 10.24075/brsmu.2025-03

The mass media registration certificate № 012769 issued on July 29, 1994

Founder and publisher is Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License www.creativecommons.org



Approved for print 30.06.2025
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОБЗОР	4
Интравитальная конфокальная микроскопия в изучении доставки противоопухолевых нанопрепаратов Е. В. Иванова, В. А. Науменко, А. С. Гаранина, М. А. Абакумов	
Intravital microscopy for assessment of anti-tumor nanotherapeutic delivery Ivanova EV, Naumenko VA, Garanina AS, Abakumov MA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	11
Применение метода количественной светоиндуцированной флуоресценции в определении уровня индивидуальной гигиены полости рта И. С. Копецкий, Л. В. Побожьева, А. И. Копецкая	
Application of quantitative light-induced fluorescence technique to determine individual oral hygiene levels Kopetskiy IS, Pobozhieva LV, Kopetskaya AI	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	17
Анализ осведомленности россиян о донорстве костного мозга и инфраструктуры Федерального регистра доноров костного мозга М. А. Бутунц, К. А. Дюжина, Е. С. Нифатова, Т. Г. Мурадян	
Analysis of the Russians' awareness of bone marrow donation and the Federal Bone Marrow Donor Registry infrastructure Butunts MA, Dyuzhina KA, Nifatova ES, Muradyan TG	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	24
Интраназальное введение липополисахарида крысам Sprague–Dawley как биомодель острого респираторного дистресс-синдрома В. В. Киселева, П. А. Вишнякова, А. М. Косырева, Е. Ю. Кананькина, И. И. Емельянов, А. В. Ельчанинов, Т. Х. Фатхудинов	
Intranasal lipopolysaccharide administration to Sprague–Dawley rats as a biomodel of acute respiratory distress syndrome Kiseleva VV, Vishnyakova PA, Kosyreva AM, Kananykhina EYu, Emelianov II, Elcharinov AV, Fatkhudinov TH	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	33
Неонатальный скрининг в Северной Осетии за 2023–2024 гг. Р. А. Зинченко, И. С. Тебиева, Е. Ю. Захарова, О. А. Щагина, Е. Е. Лотник, Ю. В. Габисова, А. В. Хохова, Н. В. Бакин, А. В. Марахонов	
Newborn screening in North Ossetia in 2023–2024 Zinchenko RA, Tebieva IS, Zakharova EYu, Shchagina OA, Lotnik EE, Gabisova YuV, Khokhova AV, Bakin NV, Marakhonov AV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	41
Индивидуальные особенности асимметрии биоэлектрической активности жевательных мышц в организации жевательной функции А. Ю. Шишелова, О. Ю. Гусева, И. С. Копецкий, В. Ансари	
Individual features of the masticatory muscle bioelectrical activity in organization of chewing function Shishelova AYU, Guseva OYu, Kopetskiy IS, Ansari V	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	50
Оценка роли печеночного метаболизма в биотрансформации сиднониминнов <i>in vivo</i> Н. С. Попов, В. М. Терехов, М. С. Баранов, В. Ю. Балабаньян, Д. Е. Каурова, И. Н. Мяснянко, Е. А. Терехова	
<i>In vivo</i> assessment of the role of liver metabolism in sydnone imine biotransformation Popov NS, Terekhov VM, Baranov MS, Balabanyan VYu, Kaurova DE, Myasnyanko IN, Terekhova EA	
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ	58
Клиническое наблюдение пациента с четырьмя первично-множественными злокачественными опухолями двенадцатиперстной и толстой кишки Е. С. Попова, А. Н. Агбальян, В. Д. Титов, В. П. Моисеева, С. В. Машин, В. А. Анфимиади, Г. М. Жуков, А. О. Бондаревская, Л. М. Гаврилюк	
Case report of the patient with four multiple primary malignant tumors in the duodenum and colon Popova ES, Agbalyan AN, Titov VD, Moiseeva VP, Mashin SV, Anfimiadi VA, Zhukov GM, Bondarevskaya AO, Gavrilyuk LM	

ИНТРАВИТАЛЬНАЯ КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИЗУЧЕНИИ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ НАНОПРЕПАРАТОВ

Е. В. Иванова¹✉, В. А. Науменко², А. С. Гаранина¹, М. А. Абакумов³

¹ Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В. П. Сербского, Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Разработка эффективных средств борьбы с онкологическими заболеваниями — одна из актуальнейших задач биомедицины. Несмотря на успех противоопухолевых нанопрепаратов, низкая эффективность целевой доставки остается основным лимитирующим фактором для их широкого внедрения в клиническую практику. Опухолевое микроокружение — сложная, многокомпонентная система, динамическое взаимодействие которой с наночастицами требует адекватных методов анализа. Интравитальная микроскопия представляет уникальную возможность для изучения препаратов и клеток организма *in vivo* в режиме реального времени. В обзоре описаны возможности и перспективы использования интравитальной микроскопии в изучении биораспределения и доставки нанопрепаратов к опухолевым клеткам на доклинических моделях на животных.

Ключевые слова: интравитальная конфокальная микроскопия, экспериментальная опухолевая модель, нанопрепараты

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-20077).

Вклад авторов: Е. В. Иванова, В. А. Науменко — написание текста, подготовка иллюстраций; А. С. Гаранина, М. А. Абакумов — редактирование текста.

✉ **Для корреспонденции:** Елизавета Викторовна Иванова
Ленинский проспект, д. 4, стр. 1, 119049; Москва, Россия; m1803014@edu.misis.ru

Статья получена: 17.06.2025 **Статья принята к печати:** 29.06.2025 **Опубликована онлайн:** 30.06.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.033

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

INTRAVITAL MICROSCOPY FOR ASSESSMENT OF ANTI-TUMOR NANOTHERAPEUTIC DELIVERY

Ivanova EV¹✉, Naumenko VA², Garanina AS¹, Abakumov MA³

¹ National University of Science and Technology MISIS, Moscow, Russia

² Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The development of effective relief for cancer is one of the most urgent tasks of biomedicine. Despite the success of anti-tumor nanotherapeutics, low targeted delivery effectiveness remains a major limiting factor for widespread introduction of those into clinical practice. Tumor microenvironment is a complex, multicomponent system, the dynamic interaction of which with nanoparticles requires adequate analysis methods. Intravital microscopy presents a unique opportunity for *in vivo* assessment of drugs and body's cells in the real-time mode. The review describes the possibilities and prospects of using intravital microscopy to study the nanotherapeutic biodistribution and delivery to tumor cells in preclinical animal models.

Keywords: intravital microscopy, preclinical tumor model, nanotherapeutics

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation grant (project No. 21-74-20077).

Author contribution: Ivanova EV, Naumenko VA — manuscript writing, design of the figures; Garanina AS, Abakumov MA — manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elizaveta V. Ivanova
Leninsky Prospect, 4, str. 1, 119049, Moscow, Russia; m1803014@edu.misis.ru

Received: 17.06.2025 **Accepted:** 29.06.2025 **Published online:** 30.06.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.033

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Успехи и проблемы доставки противоопухолевых нанопрепаратов

Наночастицы (НЧ) находят все более широкое применение в медицине, в том числе в таких областях, как химиотерапия, противомикробная терапия, лучевая терапия, диагностика (магнитно-резонансная терапия, или МРТ), компьютерная томография), регенеративная медицина, гипертермия [1]. В контексте борьбы с онкологическими заболеваниями можно выделить три основных сферы применения НЧ. Во-первых, в клиническую практику вошли наноформуляции химиопрепаратов (Доксил, Келикс, Онивид), использование которых позволяет повысить специфичность доставки лекарств и при этом снизить их накопление в здоровых тканях. Во-вторых, ферумокситол и другие НЧ металлов

успешно применяют для неинвазивного выявления опухолевых очагов методом МРТ. В-третьих, большим потенциалом для тераностики обладают наночастицы с радионуклидными компонентами. В этой области наибольшее распространение получили полимерные НЧ, липосомные носители, дендримеры, НЧ оксида железа, НЧ диоксида кремния, а также углеродные нанотрубки.

Эффективность всех вышеперечисленных способов диагностики и терапии напрямую зависит от степени накопления НЧ в тканях. Очевидно, что в биораспределении препарата чрезвычайно важную роль играет путь его введения. В большинстве экспериментальных исследований, а также в клинической практике НЧ используют в виде внутриопухолевых (интратуморальных, локальных) или внутривенных (системных) инъекций. В первом

случае достигается высокая концентрация препарата в опухолевом очаге и удается значительно снизить его накопление в здоровых тканях. К сожалению, данный путь введения применим лишь в особых клинических ситуациях, а именно при наличии легкодоступного и четко визуализируемого первичного опухолевого очага без метастазирования. Напротив, системное введение теоретически позволяет нанопрепаратам достичь с кровотоком опухоли любой локализации и размера, однако существенным недостатком данной стратегии является низкая эффективность доставки, связанная с наличием нескольких биологических барьеров. Так, на пути к опухолевым клеткам НЧ должны избежать захвата органами ретикулоэндотелиальной системы, выйти из кровотока (экстравазировать) в локусе новообразования и проникнуть к опухолевым клеткам через плотную соединительную ткань. Следует отметить, что, несмотря на указанные сложности, именно системное введение препарата является наиболее перспективным методом борьбы с многообразием новообразований.

На протяжении более 30 лет считалось, что при системном введении специфическое накопление НЧ в опухоли обусловлено так называемым EPR-эффектом (от англ. *enhanced permeability and retention*) — повышенной проницаемостью кровеносных сосудов и сниженным лимфатическим дренажем [2, 3]. Однако в последние годы концепция EPR-эффекта вызывает резкую критику из-за серии неудач нанопрепаратов в клинических испытаниях [4, 5]. Есть мнение, что этот пассивный механизм доставки характерен в большей мере для моделей на животных, но не работает на людях. В связи с этим все большее внимание исследователей привлекает возможность активной доставки НЧ, в том числе с использованием клеточных носителей [6, 7]. Нейтрофилы [8–11], моноциты [12, 13], макрофаги [14] и стволовые клетки [15] были предложены в качестве потенциальных кандидатов для доставки нанопрепаратов к раковым клеткам.

Для разработки новых стратегий противоопухолевой терапии необходим детальный анализ процессов, происходящих в опухолевом микроокружении в ходе канцерогенеза и в ответ на лечение. Микроокружение опухоли представляет собой сложную систему, включающую как злокачественные, так и нормальные клетки, заключенные в плотный матрикс внеклеточного белка, а также хаотичную сеть кровеносных сосудов. Благодаря своим уникальным свойствам опухолевое микроокружение можно считать особым типом ткани. Особенности поведения иммунных клеток в этой ткани позволяют говорить об опухолевом микроокружении как одном из отличительных признаков рака [16]. Все большее внимание привлекают новые методы лечения, направленные на неопухолевые клетки опухолевого микроокружения, например, антиангиогенная терапия или иммунотерапия. Однако для повышения эффективности указанных терапевтических подходов необходимо детальное понимание взаимодействий между клетками опухолевого микроокружения и нанопрепаратами.

Выяснение механизмов доставки и противоопухолевой активности НЧ долгое время было непростой задачей из-за отсутствия адекватных методов оценки динамических взаимодействий между нанообъектами и клетками организмами *in situ*. До недавнего времени арсенал доступных методов исследования опухоли был ограничен микроскопией фиксированных образцов и биохимическим анализом — методами, не позволяющими

изучать поведение нанопрепаратов в организме в режиме реального времени. Ситуация качественно изменилась с появлением интравитальной микроскопии (ИВМ), предоставляющей возможность исследовать динамические процессы в живых тканях на клеточном и субклеточном уровне [17, 18]. Данный метод, успешно зарекомендовавший себя в исследовании различных биологических процессов [19–21], может быть использован для изучения механизмов доставки и противоопухолевой активности нанопрепаратов на качественно новом уровне [22].

В России использование ИВМ для исследования биораспределения и доставки НЧ в опухоль было внедрено в процесс доклинического исследования кандидатных противоопухолевых препаратов. В данном обзоре представлены пилотные результаты и перспективы использования метода ИВМ в разработке инновационных методов противоопухолевой терапии.

Интравитальная микроскопия в исследовании путей доставки противоопухолевых нанопрепаратов

Взаимодействие НЧ с клетками иммунной системы может играть как отрицательную, так и положительную роль в эффективности терапии нанопрепаратами. Так, секвестрация НЧ в резидентных макрофагах печени и селезенки снижает эффективность целенаправленной доставки терапевтических средств к опухолям [23, 24]. Напротив, стационарные лейкоциты, захватывающие НЧ в микроокружении опухоли, могут выполнять роль депо препарата, длительный и постепенный выход которого в ткани улучшает противоопухолевый ответ [25]. Наконец, сохранение подвижности лейкоцитами крови при связывании с НЧ позволяет им транспортировать препарат на большие расстояния и преодолевать физиологические барьеры [26], что лежит в основе концепции клеточно-опосредованной доставки. Использование нейтрофилов для транспортировки нанопрепаратов в опухоль было предложено совсем недавно, и, в отличие от пассивного механизма накопления, факторы, которые способствуют или препятствуют активной доставке НЧ, еще недостаточно изучены.

Метод ИВМ позволил нам наблюдать за поведением в опухоли НЧ различного типа. В работе были использованы наночастицы магнетита (НЧМ), ковалентно связанные с цианиновым красителем Cy5, и липосомы, в состав которых был включен липофильный краситель (DiD). Было показано, что НЧМ могут преодолевать сосудистый барьер как путем пассивного транспорта, так и с использованием нейтрофилов в качестве «троянского коня». Последний механизм был впервые зафиксирован в режиме реального времени: НЧ адсорбируются на поверхности нейтрофила, который, выходя за пределы сосуда, переносит их в опухолевую ткань (рис. 1А). Интересно, что транзитная элиминация нейтрофилов из кровотока привела к снижению накопления НЧМ в опухолях. Эти результаты подтверждают участие нейтрофилов в доставке НЧМ к опухолевым клеткам [27].

Механизмы доставки липосом в опухоль существенно отличались от механизмов доставки НЧМ [28]. Чаще всего выявляли локальные утечки в периваскулярную область (микроутечки) (рис. 1Б). Для этого типа экстравазации характерны ограниченная площадь утечки и глубина проникновения не более 20 мкм от сосудов. Интенсивность флуоресценции была равномерной внутри микроутечки и значительно превосходила таковую в просвете сосуда.

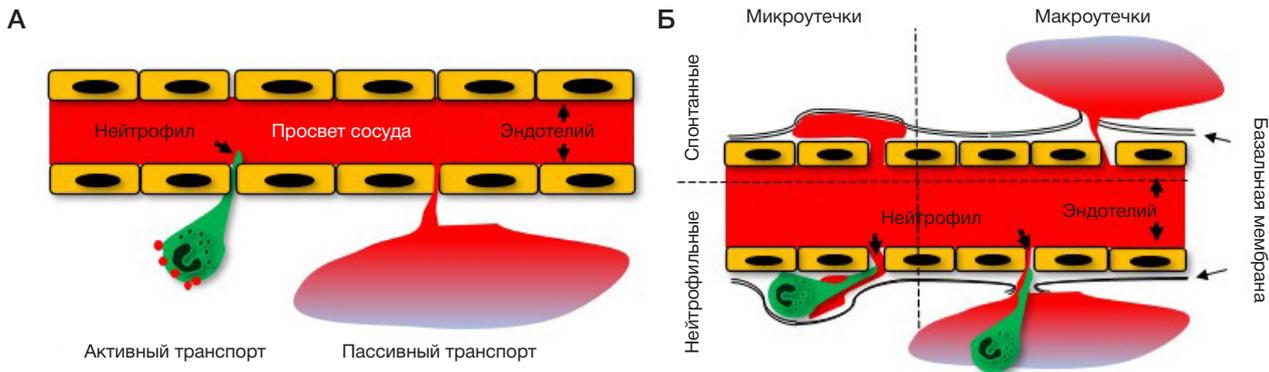


Рис. 1. Роль лейкоцитов в доставке противоопухолевых нанолекарств. **А.** Механизмы экстравазации наночастиц магнетита в микроциркуляторном русле опухолей. **Б.** Механизмы экстравазации липосом в микроциркуляторном русле опухолей

Формирование микроутечек обычно происходило быстро (в течение нескольких минут), и в дальнейшем зона микроутечки практически не изменялась.

Другой, более редкий, тип утечки (рис. 1Б) охватывал обширную область интестииции, проникая в ткани на глубину нескольких сотен микрон. Эти макроутечки были нестабильны в пространстве и во времени, демонстрируя градиент диффузии и динамические изменения в интенсивности сигнала, который, однако, никогда не превышал интенсивности флуоресценции циркулирующих липосом. Кроме того, мы наблюдали повторные волны экстравазации липосом из одного и того же локуса макроутечки. В отличие от микроутечки, этот тип экстравазации, по всей видимости, отражает диффузию НЧ в интерстициальном пространстве. Волны диффузии липосом всегда распространялись из центра опухоли на периферию, вероятно, из-за более высокого внутритканевого давления внутри опухоли.

Как и в случае с НЧМ, нейтрофилы также способствовали выходу липосом из сосудистого русла. При изучении динамики формирования микроутечек в режиме реального времени было отмечено, что в некоторых случаях они возникают в локусах экстравазации нейтрофилов. Аналогично, были зафиксированы макроутечки, образующиеся вслед за выходом нейтрофила из сосуда (рис. 1Б).

Следует отметить, что в отличие от НЧМ, липосомы не захватывались нейтрофилами, поэтому описанные примеры нейтрофил-опосредованных утечек представляют собой принципиально новый механизм доставки НЧ: липосомы выходят за пределы сосуда не на нейтрофиле, а через поры сосудистого барьера, временно открывающиеся в момент трансмиграции клеток. В результате, можно говорить о четырех механизмах доставки липосом в опухоль: спонтанно образующихся и нейтрофил-зависимых микро- и макроутечках (рис. 1Б). На фоне деплеции нейтрофилов эффективность накопления липосом в опухоли снижалась на 20–30%, что позволяет дать приблизительную оценку вклада нейтрофилов в доставку липосомных препаратов в опухолевый очаг.

Из-за ограничений разрешающей способности ИВМ не было возможности провести различие между межэндотелиальным и трансэндотелиальным путями экстравазации липосом в опухолевых сосудах [29]. Тем не менее, наблюдение за нейтрофилами и липосомами в опухоли *in vivo* может пролить свет на фундаментальные механизмы транспорта НЧ из просвета сосуда в ткани. Несмотря на очевидные различия, можно предположить, что существует некоторое сходство между экстравазационным

поведением нейтрофилов и липосом. Так, после пересечения слоя эндотелиальных клеток нейтрофилы проявляют стационарное или ползающее поведение в ограниченном субэндотелиальном пространстве [30], и скопление нейтрофилов в периваскулярном компартменте напоминает микроутечку липосом. Затем нейтрофилы проходят через неплотные участки в базальной мембране и высвобождаются из периваскулярного пространства, аналогично прорыву НЧ и диффузии в локусе макроутечки. Примечательно, что некоторые макроутечки развиваются из ранее существовавших микроутечек, и это дополнительно подтверждает идею о том, что два паттерна накопления липосом являются последовательными этапами экстравазации, соответствующими транспорту липосом через эндотелиальный и субэндотелиальный барьеры.

Можно предположить, что описанные паттерны экстравазации играют неравнозначную роль в доставке противоопухолевых препаратов. Во-первых, микроутечки обнаруживаются не только в опухолях, но и в здоровых тканях, что может объяснить кожную токсичность липосомного доксорубина. Во-вторых, хотя микроутечки способствуют накоплению липосом вокруг опухолевых сосудов, они не обеспечивают доступ нанолекарств к опухолевым клеткам. Напротив, макроутечки позволяют липосомам проникать глубоко в опухолевые ткани, способствуя доставке лекарственного средства к клеткам-мишеням. Этот тип экстравазации специфичен для опухолей и различается в зависимости от типа опухоли. Это позволяет предположить, что пассивная доставка липосом к опухолевым клеткам в первую очередь опосредована макроутечками. В-третьих, хорошо известно, что, хотя липосомный доксорубин накапливается в опухолях в большей степени, чем свободный доксорубин, противоопухолевый ответ улучшается лишь незначительно. Недостаточная терапевтическая эффективность может быть отчасти связана с преобладанием микроутечек над макроутечками, что приводит к повышенному накоплению липосом на макроскопическом уровне, но фактически не обеспечивает доступ лекарств к раковым клеткам.

Интравитальная микроскопия в исследовании выведения НЧ почками

Исследование биораспределения — неотъемлемый этап доклинического исследования лекарственных средств. Оно позволяет определить такие важные параметры, как скорость выведения, динамику накопления и преимущественные органы-мишени для препарата.

Согласно современным представлениям, способность НЧ выводиться из организма через почки определяется размером пор гломерулярного фильтра, который составляет примерно 6 нм. Частицы, диаметр которых больше указанного порогового значения, не могут попадать в мочу. Однако в последние годы в литературе накапливается все больше свидетельств парадоксальной почечной фильтрации крупных НЧ. Аналогичную картину мы наблюдали при исследовании биораспределения НЧМ, размер которых (140 нм) значительно превосходил порог почечной фильтрации [31]. Через 2 ч после внутривенного введения НЧМ отмечалось транзитное повышение уровня железа в почках, сопровождавшееся негативным контрастированием почечной паренхимы на МРТ. Эти неожиданные результаты были подтверждены методом конфокальной микроскопии при использовании флуоресцентно-меченных НЧМ. Кроме того, введение НЧМ сопровождалось повышением содержания железа в моче, а ультраструктурный анализ показал наличие в мочевом осадке интактных НЧ.

Для того чтобы понять причину почечной экскреции НЧ, более чем в 20 раз превышающих порог гломерулярного фильтра, мы проводили ИВМ поверхностного кортекса почки в момент введения НЧМ-Су5. Сразу после инъекции наблюдалось контрастирование частицами перитубулярных капилляров, а уже через 25 мин флуоресцентный сигнал локализовался преимущественно в почечных канальцах. Примечательно, что на ранних этапах после введения препарата накопление происходило не в просвете, а в базальном компартменте тубулярного эпителия, и это свидетельствует о том, что НЧМ не фильтруются через клубочки, а достигают эпителия со стороны тубулоинтерстиция. При дальнейшем наблюдении за судьбой НЧМ-Су5 в почках отмечали транзитное увеличение интенсивности флуоресцентного сигнала в просвете почечных канальцев.

Принимая во внимание полученные результаты, можно предположить, что транслокация из крови в мочу через перитубулярные эндотелиальные и почечные эпителиальные клетки является альтернативным путем выведения синтетических НЧ с размером, превышающим порог клубочковой фильтрации (рис. 2). Можно предположить, что это недооцененный механизм, который может объяснить некоторые описанные ранее примеры парадоксальной почечной экскреции крупных НЧ.

На самом деле описание почечного клиренса крупных НЧ в литературе не редкость, и обычно это объясняется деградацией НЧ [32–39]. Вместе с тем, накапливается все больше свидетельств в пользу экскреции с мочой крупных интактных НЧ, которая до сих пор оставалась необъясненной. Так, в недавнем исследовании почечный клиренс был показан для 20 нм пегилированных магнитных НЧ [40]. Данный феномен авторы объяснили потенциальной гибкостью НЧ, которая позволяет им проходить через мембрану гломерулярного фильтра. Другой случай неожиданной фильтрации в почках описан для углеродных нанотрубок [41]. Авторы предположили, что определенная ориентация в потоке наностержней с размерами 200–300 нм и соотношением сторон от 100 : 1 до 500 : 1 обеспечивает возможность их прохождения через поры. Так же как и в наших экспериментах, оба цитируемых исследования описывают пик экскреции через 30–60 мин после введения и накопление НЧ в проксимальных канальцах. Хотя авторы объясняют это реабсорбцией НЧ эпителиальными клетками из просвета канальцев, альтернативная гипотеза

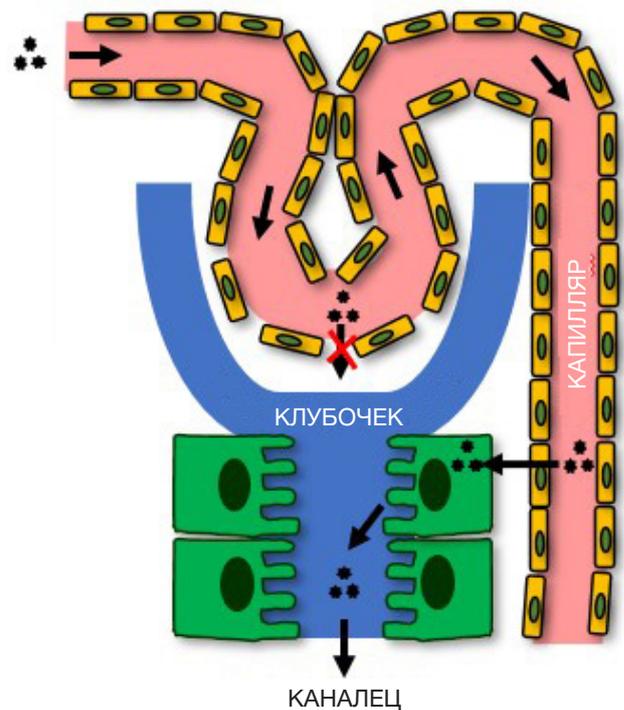


Рис. 2. Механизм почечной экскреции наночастиц с размером выше порога клубочковой фильтрации

заключается в том, что проникновение НЧ в почечный эпителий происходит через перитубулярные капилляры. В одних исследованиях почечную фильтрацию нанолитов из оксида графена (1 × 1000 нм, 5 × 200 нм) объясняли морфологической деформацией частиц (скольжением, сжатием или складыванием) [42, 43], в то время как в другой группе было сделано предположение, что причиной выделения с мочой интактных силикатных НЧ (размер 22 × 185 нм и 65 × 720 нм) является нарушение барьерной функции мембраны гломерулярного фильтра [44].

Для ферумокситола, одобренного FDA препарата НЧ оксида железа, покрытых декстраном (размер 17–30 нм), неожиданно было обнаружено значительное накопление в проксимальных канальцах, в то время как НЧ декстрана размером 13 нм в основном находили в клубочках [45]. Авторы предположили, что это было связано с широким разбросом ферумокситола по диаметру, так что определенная доля НЧ оказалась меньше порогового размера мембраны гломерулярного фильтра. В этом случае можно ожидать, что основная доля НЧ все равно накапливалась бы в клубочках, однако об этом не сообщалось. Хотя локализация ферумокситола в канальцах была аналогична распределению выводимых с мочой НЧ декстрана размером 5 нм, в отличие от последних, накопление ферумокситола не влияло на эндоцитоз альбумина, а также экспрессию мегалина и кластрина в проксимальных канальцах. Эти данные косвенно свидетельствуют о том, что ферумокситол попадает в эпителий с базолатеральной стороны без участия абсорбционных механизмов в канальцах. Хотя нельзя исключить морфологическую деформацию и дисфункцию мембраны гломерулярного фильтра для каждого отдельного типа НЧ, мы предполагаем, что транслокация через эндотелий и эпителий канальцев — более распространенное явление, которое может хотя бы частично объяснить ранее полученные данные о парадоксальной фильтрации.

Описание альтернативного механизма транслокации НЧ в перитубулярных капиллярах является собой смену

парадигмы в бионанотехнологии, поскольку позволяет подразумевать наличие новых критериев для почечного клиренса. Возможно, этот факт будет иметь важные клинические последствия в нефрологии и онкологии.

Перспективы использования интравитальной микроскопии в клинической практике

В клинической практике противоопухолевая терапия нанопрепаратами, как правило, представляет собой серию последовательных системных инъекций. В связи с этим возникает вопрос о том, будет ли поведение второй и последующих доз отличаться от поведения первой дозы. Потенциальное влияние первой дозы НЧ на последующие может быть связано как с системными факторами (изменение степени захвата НЧ клетками ретикулоэндотелиальной системы), так и с модуляцией опухолевого микроокружения.

Для ответа на эти вопросы были исследованы особенности биораспределения повторной дозы липосом методом ИВМ [46]. В качестве первой дозы вводили немеченные липосомы, а через 24 ч — флуоресцентно-меченные. Было показано, что время полувыведения и профили накопления первой и второй доз липосом в органах и в опухолях не отличаются. Количественный анализ не выявил различий между частотой захвата липосом лейкоцитами крови: как первая, так и вторая доза липосом в основном связывались с моноцитами, реже — с нейтрофилами и CD4-лимфоцитами и практически не взаимодействовали с CD8-лимфоцитами и В-клетками. Не отличалась также картина захвата двух доз клетками опухолевого микроокружения: в обоих случаях выявляли ассоциацию липосом с нейтрофилами и макрофагами, в меньшей степени — с другими лейкоцитами и опухолевыми клетками. Взаимодействие НЧ с иммунными клетками в некоторых случаях может изменять состав популяции лейкоцитов, приводя к тому, что последующая доза препарата встречается с потенциально другим микроокружением. Однако количественный состав лейкоцитов крови и опухоли на момент введения первой и второй дозы липосом оказался неизменным.

Как и в случае с однократным введением препарата, вторая доза липосом попадала в опухоль за счет микро- и макроутечек. Для того чтобы напрямую оценить пространственное накопление двух доз в опухоли, проводили эксперименты, в которых первая и вторая дозы липосом были связаны с разными красителями. Через 48 ч / 24 ч после введения первой / второй дозы липосом была показана высокая степень колокализации двух флуоресцентных сигналов.

Отсутствие различий между поведением в организме двух доз липосом открывает возможность использования первой дозы в качестве диагностической для целенаправленного

отбора опухолей с хорошим накоплением НЧ, которые должны также хорошо аккумулировать вторую (терапевтическую) дозу липосом. Для проверки этой гипотезы использовали липосомы, содержащие НЧ магнетита размером 5 нм, которые можно детектировать в опухоли методом МРТ; в качестве терапевтического препарата был использован липосомный доксорубин (Келикс). ИВМ показала, что ни загрузка в липосомы магнитно-контрастного диагностикума, ни наличие в них лекарственного препарата не нарушают высокую степень колокализации двух доз липосом в опухоли.

Валидацию алгоритма персонализированной диагностики и терапии опухолей проводили на доклинической модели. Животных, которым ввели внутривенную дозу диагностических липосом, с помощью МРТ распределяли на группы с сильным и слабым накоплением препарата. Далее каждую из групп разделяли на две подгруппы, в которых животные получали либо Келикс, либо свободный доксорубин. Оказалось, что в группе с высоким накоплением диагностических липосом наблюдается более выраженное снижение скорости роста опухолей и увеличение выживаемости по сравнению с животными с низким уровнем накопления диагностикума. Следует отметить, что при лечении свободным доксорубином не было выявлено различий в скорости опухолевой прогрессии между группами с высоким и низким уровнями накопления магнитных липосом.

Данные результаты свидетельствуют о том, что оценка накопления в опухоли магнитных липосом позволяет прогнозировать терапевтическую эффективность липосомных препаратов, но не их свободных аналогов.

Следует заметить, что метод ИВМ не только позволяет решать фундаментальные медико-биологические задачи, но и имеет потенциал практического применения. Так, в 2016 г. вышла первая работа, показывающая возможность ИВМ опухолей у пациентов [47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внедрение метода ИВМ позволяет на качественно новом уровне исследовать биораспределение и механизмы доставки нанопрепаратов к опухолевым клеткам на доклинических моделях на животных. На текущий момент использование ИВМ в клинической практике ограничено в том числе узким спектром флуоресцентных красителей, одобренных к применению на людях. Однако вектор развития современных методов микроскопии направлен на использование спектров аутофлуоресценции клеток для их визуализации в отсутствие каких-либо внешних красителей. Появление коммерчески доступных микроскопов, использующих данный принцип детекции, значительно расширит диагностические возможности ИВМ.

Литература

1. Ahlawat J, et al. Nanoparticles in Biomedical Applications. In: Green Nanoparticles. Springer, Cham, 2020; p. 227–250.
2. Nakamura Y, et al. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? *Bioconj Chem.* 2016; 27 (10): 2225–38.
3. Bertrand N, et al. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014; 66: 2–25.
4. Wilhelm S, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat Rev Mater.* 2016; 1 (5): 16014.
5. Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J Control Release.* 2016; 244 (Pt A): 108–21.
6. Mitchell MJ, King MR. Leukocytes as carriers for targeted cancer

- drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015; 12 (3): 375–92.
7. Tiet P, Berlin JM. Exploiting homing abilities of cell carriers: Targeted delivery of nanoparticles for cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 2017; 145: 18–26.
 8. Xue J, et al. Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence. *Nat Nanotechnol.* 2017; 12 (7): 692–700.
 9. Chu D, et al. Photosensitization Priming of Tumor Microenvironments Improves Delivery of Nanotherapeutics via Neutrophil Infiltration. *Adv Mater.* 2017; 29 (27): 1701021.
 10. Chu D, et al. Nanoparticle Targeting of Neutrophils for Improved Cancer Immunotherapy. *Adv Healthc Mater.* 2016; 5 (9): 1088–93.
 11. Luo X, et al. Neutrophil-mediated delivery of pixantrone-loaded liposomes decorated with poly(sialic acid)–octadecylamine conjugate for lung cancer treatment. *Drug Deliv.* 2018; 25 (1): 1200–12.
 12. Smith BR, et al. High-resolution, serial intravital microscopic imaging of nanoparticle delivery and targeting in a small animal tumor model. *Nano Today.* 2013; 8 (2): 126–37.
 13. Smith BR, et al. Selective uptake of single-walled carbon nanotubes by circulating monocytes for enhanced tumour delivery. *Nat Nanotechnol.* 2014; 9 (6): 481–7.
 14. Qiang L, et al. A novel macrophage-mediated biomimetic delivery system with NIR-triggered release for prostate cancer therapy. *J Nanobiotechnology.* BioMed Central. 2019; 17 (1): 83.
 15. Chen K, et al. A TRAIL-Delivered Lipoprotein-Bioinspired Nanovector Engineering Stem Cell-Based Platform for Inhibition of Lung Metastasis of Melanoma. *Theranostics.* 2019; 9 (10): 2984–98.
 16. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011; 144 (5): 646–74.
 17. Schießl IM, Castrop H. Deep insights: intravital imaging with two-photon microscopy // *Pflugers Archiv European Journal of Physiology.* Springer Verlag. 2016; 468 (9): 1505–16.
 18. Naumenko V, Jenne C, Mahoney DJ. Intravital microscopy for imaging the tumor microenvironment in live mice. *Methods Mol Biol.* 2016; 1458: 217–30.
 19. Li JL, et al. Intravital multiphoton imaging of immune responses in the mouse ear skin. *Nat Protoc.* 2012; 7 (2): 221–34.
 20. Ritsma L, et al. Surgical implantation of an abdominal imaging window for intravital microscopy. *Nat Protoc.* 2013; 8 (3): 583–94.
 21. Stolp B, Melican K. Microbial pathogenesis revealed by intravital microscopy: pros, cons and cautions. *FEBS Lett.* 2016; 590 (13): 2014–26.
 22. Miller MA, Weissleder R. Imaging the pharmacology of nanomaterials by intravital microscopy: Toward understanding their biological behavior. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017; 113: 61–86.
 23. Inturi S, et al. Modulatory Role of Surface Coating of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoworms in Complement Opsonization and Leukocyte Uptake. *ACS Nano.* 2015; 9 (11): 10758–68.
 24. Arami H, et al. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2015; 44 (23): 8576–607.
 25. Miller MA, et al. Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt(IV) pro-drug. *Nat Commun.* 2015; 6: 8692.
 26. Naumenko V, et al. Neutrophils in viral infection. *Cell Tissue Res.* 2018; 371 (3): 505–16.
 27. Naumenko V, et al. Neutrophil-mediated transport is crucial for delivery of short-circulating magnetic nanoparticles to tumors. *Acta Biomater.* 2020; 104: 176–87.
 28. Naumenko VA, et al. Extravasating Neutrophils Open Vascular Barrier and Improve Liposomes Delivery to Tumors. *ACS Nano.* 2019; 13 (11).
 29. Moghimi SM, Simberg D. Nanoparticle transport pathways into tumors. *J Nanoparticle Res.* 2018; 20 (6): 169.
 30. Park SA, Hyun Y-M. Neutrophil Extravasation Cascade: What Can We Learn from Two-photon Intravital Imaging? *Immune Netw.* 2016; 16 (6): 317–21.
 31. Naumenko V, et al. Intravital microscopy reveals a novel mechanism of nanoparticles excretion in kidney. *J Control Release.* 2019; 307: 368–78.
 32. Yang K, et al. Graphene in Mice: Ultrahigh In Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy. *Nano Lett.* 2010; 10 (9): 3318–23.
 33. Yang K, et al. In Vivo Pharmacokinetics, Long-Term Biodistribution, and Toxicology of PEGylated Graphene in Mice. *ACS Nano.* 2011; 5 (1): 516–22.
 34. Gary-Bobo M, et al. Mannose-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Efficient Two-Photon Photodynamic Therapy of Solid Tumors. *Angew Chemie Int Ed.* 2011; 50 (48): 11425–9.
 35. Lu J, et al. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. *Small.* NIH Public Access. 2010; 6 (16): 1794–805.
 36. Fischer NO, et al. Evaluation of nanolipoprotein particles (NLPs) as an in vivo delivery platform. *PLoS One.* 2014; 9 (3): e93342.
 37. He Q, et al. In vivo Biodistribution and Urinary Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles: Effects of Particle Size and PEGylation. *Small.* 2011; 7 (2): 271–80.
 38. He X, et al. In vivo study of biodistribution and urinary excretion of surface-modified silica nanoparticles. *Anal Chem.* 2008; 80 (24): 9597–603.
 39. Fu C, et al. The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes. *Biomaterials.* 2013; 34 (10): 2565–75.
 40. Gómez-Vallejo V, et al. PEG-copolymer-coated iron oxide nanoparticles that avoid the reticuloendothelial system and act as kidney MRI contrast agents. *Nanoscale.* 2018; 10 (29): 14153–64.
 41. Ruggiero A, et al. Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2010; 107 (27): 12369–74.
 42. Jasim DA, et al. Tissue distribution and urinary excretion of intravenously administered chemically functionalized graphene oxide sheets. *Chem Sci.* 2015; 6 (7): 3952–64.
 43. Jasim DA, et al. The Effects of Extensive Glomerular Filtration of Thin Graphene Oxide Sheets on Kidney Physiology. *ACS Nano.* 2016; 10 (12): 10753–67.
 44. Huang X, et al. The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo. *ACS Nano.* 2011; 5 (7): 5390–9.
 45. Nair AV, et al. Characterizing the interactions of organic nanoparticles with renal epithelial cells in vivo. *ACS Nano.* 2015; 9 (4): 3641–53.
 46. Naumenko VA, et al. Intravital imaging of liposome behavior upon repeated administration: A step towards the development of liposomal companion diagnostic for cancer nanotherapy. *J Control Release.* 2021; 330: 244–56.
 47. Fisher DT, et al. Intraoperative intravital microscopy permits the study of human tumour vessels. *Nat Commun Nature Publishing Group.* 2016; 7 (1): 1–9.

References

1. Ahlwat J, et al. Nanoparticles in Biomedical Applications. In: *Green Nanoparticles.* Springer, Cham, 2020; p. 227–250.
2. Nakamura Y, et al. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? *Bioconjug Chem.* 2016; 27 (10): 2225–38.
3. Bertrand N, et al. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014; 66: 2–25.
4. Wilhelm S, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat Rev Mater.* 2016; 1 (5): 16014.
5. Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J Control Release.* 2016; 244 (Pt A): 108–21.
6. Mitchell MJ, King MR. Leukocytes as carriers for targeted cancer drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015; 12 (3): 375–92.
7. Tiet P, Berlin JM. Exploiting homing abilities of cell carriers: Targeted delivery of nanoparticles for cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 2017; 145: 18–26.

8. Xue J, et al. Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence. *Nat Nanotechnol.* 2017; 12 (7): 692–700.
9. Chu D, et al. Photosensitization Priming of Tumor Microenvironments Improves Delivery of Nanotherapeutics via Neutrophil Infiltration. *Adv Mater.* 2017; 29 (27): 1701021.
10. Chu D, et al. Nanoparticle Targeting of Neutrophils for Improved Cancer Immunotherapy. *Adv Healthc Mater.* 2016; 5 (9): 1088–93.
11. Luo X, et al. Neutrophil-mediated delivery of pixantrone-loaded liposomes decorated with poly(sialic acid)–octadecylamine conjugate for lung cancer treatment. *Drug Deliv.* 2018; 25 (1): 1200–12.
12. Smith BR, et al. High-resolution, serial intravital microscopic imaging of nanoparticle delivery and targeting in a small animal tumor model. *Nano Today.* 2013; 8 (2): 126–37.
13. Smith BR, et al. Selective uptake of single-walled carbon nanotubes by circulating monocytes for enhanced tumour delivery. *Nat Nanotechnol.* 2014; 9 (6): 481–7.
14. Qiang L, et al. A novel macrophage-mediated biomimetic delivery system with NIR-triggered release for prostate cancer therapy. *J Nanobiotechnology.* BioMed Central. 2019; 17 (1): 83.
15. Chen K, et al. A TRAIL-Delivered Lipoprotein-Bioinspired Nanovector Engineering Stem Cell-Based Platform for Inhibition of Lung Metastasis of Melanoma. *Theranostics.* 2019; 9 (10): 2984–98.
16. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011; 144 (5): 646–74.
17. Schießl IM, Castrop H. Deep insights: intravital imaging with two-photon microscopy // *Pflugers Archiv European Journal of Physiology.* Springer Verlag. 2016; 468 (9): 1505–16.
18. Naumenko V, Jenne C, Mahoney DJ. Intravital microscopy for imaging the tumor microenvironment in live mice. *Methods Mol Biol.* 2016; 1458: 217–30.
19. Li JL, et al. Intravital multiphoton imaging of immune responses in the mouse ear skin. *Nat Protoc.* 2012; 7 (2): 221–34.
20. Ritsma L, et al. Surgical implantation of an abdominal imaging window for intravital microscopy. *Nat Protoc.* 2013; 8 (3): 583–94.
21. Stolp B, Melican K. Microbial pathogenesis revealed by intravital microscopy: pros, cons and cautions. *FEBS Lett.* 2016; 590 (13): 2014–26.
22. Miller MA, Weissleder R. Imaging the pharmacology of nanomaterials by intravital microscopy: Toward understanding their biological behavior. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017; 113: 61–86.
23. Inturi S, et al. Modulatory Role of Surface Coating of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoworms in Complement Opsonization and Leukocyte Uptake. *ACS Nano.* 2015; 9 (11): 10758–68.
24. Arami H, et al. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2015; 44 (23): 8576–607.
25. Miller MA, et al. Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt(IV) pro-drug. *Nat Commun.* 2015; 6: 8692.
26. Naumenko V, et al. Neutrophils in viral infection. *Cell Tissue Res.* 2018; 371 (3): 505–16.
27. Naumenko V, et al. Neutrophil-mediated transport is crucial for delivery of short-circulating magnetic nanoparticles to tumors. *Acta Biomater.* 2020; 104: 176–87.
28. Naumenko VA, et al. Extravasating Neutrophils Open Vascular Barrier and Improve Liposomes Delivery to Tumors. *ACS Nano.* 2019; 13 (11).
29. Moghimi SM, Simberg D. Nanoparticle transport pathways into tumors. *J Nanoparticle Res.* 2018; 20 (6): 169.
30. Park SA, Hyun Y-M. Neutrophil Extravasation Cascade: What Can We Learn from Two-photon Intravital Imaging? *Immune Netw.* 2016; 16 (6): 317–21.
31. Naumenko V, et al. Intravital microscopy reveals a novel mechanism of nanoparticles excretion in kidney. *J Control Release.* 2019; 307: 368–78.
32. Yang K, et al. Graphene in Mice: Ultrahigh In Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy. *Nano Lett.* 2010; 10 (9): 3318–23.
33. Yang K, et al. In Vivo Pharmacokinetics, Long-Term Biodistribution, and Toxicology of PEGylated Graphene in Mice. *ACS Nano.* 2011; 5 (1): 516–22.
34. Gary-Bobo M, et al. Mannose-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Efficient Two-Photon Photodynamic Therapy of Solid Tumors. *Angew Chemie Int Ed.* 2011; 50 (48): 11425–9.
35. Lu J, et al. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. *Small.* NIH Public Access. 2010; 6 (16): 1794–805.
36. Fischer NO, et al. Evaluation of nanolipoprotein particles (NLPs) as an in vivo delivery platform. *PLoS One.* 2014; 9 (3): e93342.
37. He Q, et al. In vivo Biodistribution and Urinary Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles: Effects of Particle Size and PEGylation. *Small.* 2011; 7 (2): 271–80.
38. He X, et al. In vivo study of biodistribution and urinary excretion of surface-modified silica nanoparticles. *Anal Chem.* 2008; 80 (24): 9597–603.
39. Fu C, et al. The absorption, distribution, excretion and toxicity of mesoporous silica nanoparticles in mice following different exposure routes. *Biomaterials.* 2013; 34 (10): 2565–75.
40. Gómez-Vallejo V, et al. PEG-copolymer-coated iron oxide nanoparticles that avoid the reticuloendothelial system and act as kidney MRI contrast agents. *Nanoscale.* 2018; 10 (29): 14153–64.
41. Ruggiero A, et al. Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2010; 107 (27): 12369–74.
42. Jasim DA, et al. Tissue distribution and urinary excretion of intravenously administered chemically functionalized graphene oxide sheets. *Chem Sci.* 2015; 6 (7): 3952–64.
43. Jasim DA, et al. The Effects of Extensive Glomerular Filtration of Thin Graphene Oxide Sheets on Kidney Physiology. *ACS Nano.* 2016; 10 (12): 10753–67.
44. Huang X, et al. The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance, and biocompatibility in vivo. *ACS Nano.* 2011; 5 (7): 5390–9.
45. Nair AV, et al. Characterizing the interactions of organic nanoparticles with renal epithelial cells in vivo. *ACS Nano.* 2015; 9 (4): 3641–53.
46. Naumenko VA, et al. Intravital imaging of liposome behavior upon repeated administration: A step towards the development of liposomal companion diagnostic for cancer nanotherapy. *J Control Release.* 2021; 330: 244–56.
47. Fisher DT, et al. Intraoperative intravital microscopy permits the study of human tumour vessels. *Nat Commun Nature Publishing Group.* 2016; 7 (1): 1–9.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОЙ СВЕТОИНДУЦИРОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ОПРЕДЕЛЕНИИ УРОВНЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ГИГИЕНЫ ПОЛОСТИ РТА

И. С. Копецкий, Л. В. Побожьева [✉], А. И. Копецкая

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Пироговский Университет), Москва, Россия

Для определения микробного налета на поверхности зубов широко применяют индексы, которые отражают уровень гигиены полости рта. При обучении пациентов уходу за ротовой полостью врачи-стоматологи используют визуальную демонстрацию локализации зубного налета. Метод количественной светоиндуцированной флуоресценции (QLF) является современным методом диагностики индивидуальной гигиены полости рта, при использовании которого даже минимальное скопление микробного налета проявляется в виде красной флуоресценции. Целью исследования было изучить гигиеническое состояние полости рта с применением метода количественной светоиндуцированной флуоресценции. Выявление зубных отложений проводили с использованием QLF, клинически определяли индексы Quigley и Hein, Green-Vermillion, КПУ. Результаты исследования показали, что при очень низком и низком уровнях интенсивности кариозного процесса показатели Simple Hygiene Score не превышают 2 балла ($p < 0,05$). В данных группах значения индексов Green-Vermillion и Quigley, Hein достигали значений $0,5 \pm 0,23$ и $0,2 \pm 0,14$ соответственно. При среднем уровне интенсивности кариозного процесса показатели Simple Hygiene Score варьируют от 1 до 5 баллов. Очень высокий уровень кариозного процесса характеризуется значениями Simple Hygiene Score от 3 до 5 баллов (максимальные показатели индексов Green-Vermillion и Quigley, Hein достигали $2,3 \pm 0,43$ и $2,1 \pm 0,35$) ($p < 0,05$). Таким образом, метод количественной светоиндуцированной флуоресценции может быть использован в клинических исследованиях для объективной оценки гигиены полости рта, наглядной демонстрации скопления зубного налета пациентам и изучения данных показателей в динамике.

Ключевые слова: зубной налет, гигиена полости рта, количественная светоиндуцированная флуоресценция

Вклад авторов: Л. В. Побожьева — проведение исследования, анализ данных, написание текста статьи; И. С. Копецкий — редактирование статьи; А. И. Копецкая — анализ данных, написание текста статьи.

Соблюдение этических стандартов: работа одобрена этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова (протокол № 238 от 19 марта 2024 г.). Все участники дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Людмила Владимировна Побожьева
ул. Островитянова, д. 1, стр. 7, г. Москва, 117997; ludmila-stomatolog@mail.ru

Статья получена: 23.04.2025 **Статья принята к печати:** 23.05.2025 **Опубликована онлайн:** 06.06.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.030

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

APPLICATION OF QUANTITATIVE LIGHT-INDUCED FLUORESCENCE TECHNIQUE TO DETERMINE INDIVIDUAL ORAL HYGIENE LEVELS

Kopetskiy IS, Pobozhieva LV [✉], Kopetskaya AI

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Indices that reflect individual oral hygiene levels are widely used to determine microbial plaque of the tooth surface. When teaching patients how to take care about the oral cavity, dentists use visual demonstration of the dental plaque localization. The quantitative light-induced fluorescence (QLF) technique represents a modern method to diagnose individual oral hygiene, in which even minimal microbial plaque buildup shows up as red fluorescence. The study aimed to assess the oral hygiene status using the quantitative light-induced fluorescence technique. Dental deposits were detected using QLF; the Quigley Hein, Green-Vermillion, DMF indices were detected clinically. The findings show that Simple Hygiene Scores do not exceed 2, when the caries intensity is very low or low ($p < 0.05$). In these groups, the Green-Vermillion and Quigley Hein index values reach 0.5 ± 0.23 and 0.2 ± 0.14 , respectively. When the caries intensity is medium, Simple Hygiene Scores vary between 1–5 points. Very high caries intensity is characterized by the Simple Hygiene Score between 3 and 5 points (maximum Green-Vermillion and Quigley Hein index values reach 2.3 ± 0.43 and 2.1 ± 0.35) ($p < 0.05$). Thus, the quantitative light-induced fluorescence technique can be used in clinical trials for objective oral hygiene assessment, visual demonstration of dental plaque buildup to patients, and assessment of the dynamic changes in these indicators.

Keywords: dental plaque, oral hygiene, quantitative light-induced fluorescence

Author contribution: Pobozhieva LV — research procedure, data analysis, manuscript writing; Kopetskiy IS — manuscript editing; Kopetskaya AI — data analysis, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol No. 238 dated 19 March 2024). All the subjects submitted the informed consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ludmila V. Pobozhieva
Ostrovityanov, 1, str. 7, Moscow, 117997; ludmila-stomatolog@mail.ru

Received: 23.04.2025 **Accepted:** 23.05.2025 **Published online:** 06.06.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.030

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Микробный налет формирует биопленки, расположенные на поверхности зубов, что является главным этиологическим фактором в развитии кариеса зубов и воспалительных заболеваний пародонта [1–3].

Ряд исследований доказали возможность применения метода количественной светоиндуцированной флуоресценции (QLF) в качестве нового метода выявления биопленок в полости рта [4, 5].

Удаление биопленок с поверхности зубов — эффективный метод профилактики основных стоматологических заболеваний. Крайне важными представляются обучение пациентов методам индивидуальной гигиены полости рта и мотивация к ее ежедневному регулярному проведению. В клинической практике для обучения пациентов уходу за полостью рта врачи-стоматологи применяют визуальную демонстрацию локализации зубного налета [6, 7].

Для количественного определения микробного налета на поверхности зубов широко применяют гигиенические индексы. Для выявления скопления микробного налета проводят окрашивание зубных отложений при помощи красителей и оценивают путем визуального контроля, что не исключает ошибок в интерпретации и требует времени для точных расчетов и измерений [8, 9].

Современный неинвазивный метод количественной светоиндуцированной флуоресценции (QLF) с помощью оральной камеры, оснащенной программным обеспечением, позволяет не только количественно определить зубной налет, но и измерить площадь скопления микробных отложений с расчетом простого гигиенического индекса (Simple Hygiene Score, SHS). Следует также отметить возможность программного обеспечения в анализе таких параметров, как площадь поражения/площадь меловидного пятна (area % rx 2), потеря флуоресценции/средняя потеря минеральных компонентов эмали (ΔF , %), глубина поражения (ΔF_{max} , %), объем поражения/максимальная потеря минеральных компонентов (ΔQ , % rx), область с бактериальной активностью/степень бактериальной активности в очагах поражения (ΔR , %), максимальная бактериальная активность (ΔR_{max} , %), площадь бактериальной активности (ΔR Area, %) [10, 11].

Даже минимальное скопление микробного налета проявляется в виде красной флуоресценции [11]. Микробная биопленка вырабатывает порфирин, что проявляется изменением цвета *in vivo* [12]. Метод QLF-D может быть использован в качестве альтернативы существующим клиническим индексным методам, независимо от изучаемых областей зубов [13, 14]. Индикацию микробного налета проводят без применения красителей [15]. Метод QLF-D может быть использован для обучения индивидуальной гигиене полости рта пациентов [16].

Таким образом, применение QLF представляет значительный клинический интерес в оценке гигиенического состояния полости рта.

Цель исследования — изучить гигиеническое состояние полости рта с применением метода количественной светоиндуцированной флуоресценции.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 204 человека (132 женщины и 72 мужчины). Критерии включения в исследование: лица обоих полов, обратившиеся за лечением или с целью профилактического осмотра; возраст 18–44 лет; отсутствие дефектов зубных рядов во фронтальном отделе (при

Таблица 1. Распределение участников по полу и возрасту

Общее количество обследованных, человек	$n = 204$	
Средний возраст обследованных, лет	29,3 ($\pm 2,4$) (min 18 ÷ max 44)	
Распределение обследованных по полу, человек	Мужчины $n = 72$	Женщины $n = 132$
Средний возраст обследованных в зависимости от пола, лет	31,54 ($\pm 2,3$) (min 18 ÷ max 44)	27,73 ($\pm 1,9$) (min 18 ÷ max 42)

физиологическом или патологическом прикусе). Критерии исключения: пациенты, проходящие ортодонтическое лечение; зубопротезные конструкции во фронтальном отделе; возраст младше 18 и старше 44 лет; наличие острых воспалительных заболеваний в полости рта; соматические заболевания в стадии декомпенсации; отказ от участия в исследовании.

Клиническая часть состояла из сбора жалоб, анамнеза и осмотра полости рта. Диагностику заболеваний твердых тканей зубов и тканей пародонта проводили по МКБ-10.

Всем участникам исследования для изучения интенсивности поражения зубов кариесом определяли значение индекса КПУ (количество кариозных, пломбированных и удаленных зубов). По оценочным критериям ВОЗ, для возрастной группы 33–44 года выделяют пять уровней интенсивности кариозного процесса: очень низкий (0,2–1,5), низкий (1,6–6,2), средний (6,3–12,7), высокий (12,8–16,2), очень высокий (16,3 и выше).

Оценку гигиенического состояния полости рта проводили методом количественной светоиндуцированной флуоресценции. Для QLF использовали стоматологическую программу Q-ray и камеру для панорамной съемки Qraycam pro (AIOBIO, Ю. Корея) и Inspektor Research Systems (Нидерланды). Для выявления скопления микробного налета и оценки уровня гигиены полости рта определяли следующие показатели: Simple Hygiene Score с диапазоном значений от 0 до 5; площадь бактериальной активности (ΔR Area, %).

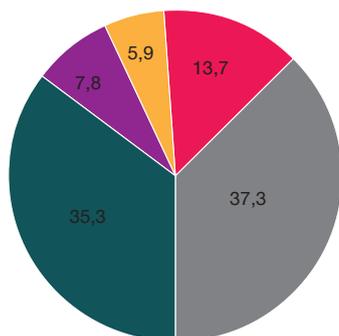
Клинически гигиеническое состояние полости рта определяли по индексу Green-Vermillion (OHI-S). Гигиену полости рта оценивали как «хорошая» (при значениях 0–0,6), «удовлетворительная» (0,7–1,6), «неудовлетворительная» (1,7–2,5) и «плохая» (более 2,6). Для определения OHI-S исследовали щечную поверхность 16 и 26 зубов, губную поверхность 11 и 31 зубов, язычную поверхность 36 и 46 зубов.

Так же определяли индекс зубного налета по Quigley и Hein с вестибулярной поверхности 12 фронтальных зубов верхней и нижней челюстей при помощи индикатора зубного налета (Plaque Test, PRESIDENT). В индексе различают шесть значений (отсутствие налета, единичные участки налета, наличие налета в пришеечном участке зуба, наличие налета до пределов средней трети зуба, от 1/3 до 2/3 и более 2/3).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы Microsoft Office Excel 2017 (Microsoft Corporation) и пакета программ Statistica 12.0 (StatSoft). Вычисляли относительные величины, применяли методы описательной статистики с определением средней арифметической величины, средней ошибки и среднеквадратичного отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Распределение обследованных по возрасту и полу представлено в табл. 1. Средний возраст обследованных



■ Очень низкий ■ Низкий ■ Средний ■ Высокий ■ Очень высокий

Рис. 1. Распределение обследованных по интенсивности кариозного процесса, %

среди женщин составил $27,73 (\pm 1,9)$ лет, среди мужчин — $31,54 (\pm 2,3)$ лет.

По результатам исследования, очень низкий уровень интенсивности кариозного процесса выявлен у 5,9% обследованных при показателе индекса КПУ $1,5 \pm 0,34$. У 13,7% обследованных лиц определен низкий уровень интенсивности кариеса при значении КПУ $5,6 \pm 0,43$. Средний уровень интенсивности кариеса выявлен в 35,3% случаев при среднем значении КПУ $11,3 \pm 1,2$, высокий — в 37,3% при значении КПУ $14,6 \pm 1,3$, очень высокий — в 7,8% при значении КПУ $17,2 \pm 0,8$ (рис. 1).

Анализ значений индекса Green-Vermillion показал, что при очень низком и низком уровнях интенсивности кариеса гигиена полости рта пациентов соответствует хорошей, при среднем и высоком уровнях — удовлетворительной, при очень высоком — неудовлетворительной (рис. 2).

Значения индексной оценки гигиены полости рта по Green-Vermillion и Quigley и Hein представлены в табл. 2.

Анализ значений индекса Quigley и Hein показал, что пациентам со средним, высоким и очень высоким уровнями интенсивности кариеса требуется улучшить индивидуальную гигиену полости рта (значения индекса превышали 1) (рис. 3).

Таким образом, результаты интерпретации данных по Green-Vermillion и Quigley и Hein у обследованных лиц были схожими, несмотря на различия в определении индексных показателей.

Оценка обоих индексов позволила выявить, что гигиена полости рта у пациентов с очень низким и низким уровнями интенсивности кариозного процесса соответствует хорошей и не требует коррекции, в отличие от преобладающего большинства лиц со средними, высокими и очень высокими значениями КПУ.

В нашем исследовании скопление микробного налета и оценку уровня гигиены полости рта по показателю Simple Hygiene Score определяли в области резцов и клыков верхней и нижней челюстей. Диагностика QLF-D позволяет обнаруживать даже незначительное скопление



Рис. 2. Пациент А., 22 года. Фотопротокол оценки гигиенического состояния полости рта. КПУ — 3, индекс Green-Vermillion — 0,5, Quigley и Hein — 0,92

зубного налета в красной флуоресценции, что отображено псевдоокрашенным синим цветом (рис. 4).

Метод количественной светоиндуцированной флуоресценции (QLF) позволил неинвазивно, быстро и объективно оценить гигиеническое состояние полости рта у пациентов (рис. 5).

Количественная и качественная оценка зубного налета у обследованных лиц представлена в баллах с диапазоном от 0 до 5 баллов (табл. 3).

На основании простого гигиенического индекса установлено, что при очень низком и низком уровнях интенсивности кариозного процесса значения составляли 0–2 баллов. При среднем уровне кариозного процесса показатели Simple Hygiene Score варьируют от 1 до 5 баллов, при высоком — от 2–5, при очень высоком уровне — от 3 до 5 баллов (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследовании были определены гигиенические индексы у пациентов с различным уровнем интенсивности кариозного процесса с применением клинических методов и метода количественной светоиндуцированной флуоресценции. По полученным нами данным, при очень низком уровне интенсивности кариозного процесса, показатели Simple Hygiene Score соответствовали 0 и 1 (Green-Vermillion — $0,4 \pm 0,12$, Quigley, Hein — $0,2 \pm 0,07$) ($p < 0,05$). Низкому уровню интенсивности кариеса соответствовали значения SHS, равные 1 и 2 баллам (Green-Vermillion — $0,5 \pm 0,23$ Quigley, Hein — $0,2 \pm 0,14$) ($p < 0,05$). В данных группах показатели клинических индексов говорят о хорошей индивидуальной гигиене полости рта. При среднем уровне интенсивности кариозного процесса показатели Simple Hygiene Score варьируют от 1 до 5 баллов (Green-Vermillion — $1,2 \pm 0,27$, Quigley, Hein — $1,4 \pm 0,32$). Высокий уровень интенсивности кариеса характеризуется значениями SHS от 2 до 5 баллов (Green-Vermillion — $1,5 \pm 0,31$, Quigley,

Таблица 2. Индексные показатели гигиенического состояния полости рта, $M \pm sd$

Уровень интенсивности кариозного процесса	Индекс Green-Vermillion	Индекс Quigley и Hein
Очень низкий	$0,4 \pm 0,12$	$0,2 \pm 0,07$
Низкий	$0,5 \pm 0,23$	$0,2 \pm 0,14$
Средний	$1,2 \pm 0,27$	$1,4 \pm 0,31$
Высокий	$1,5 \pm 0,31$	$1,5 \pm 0,28$
Очень высокий	$2,3 \pm 0,43$	$2,1 \pm 0,35$



Рис. 3. Пациент К., 27 лет. Клиническая оценка гигиенических индексов. КПУ — 8, индекса Green-Vermillion — 1,7, Quigley и Hein — 3,3.

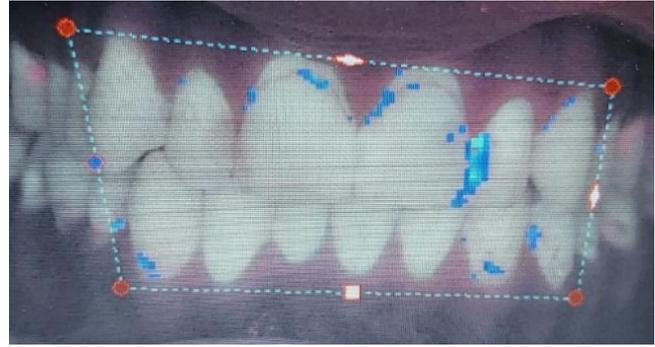


Рис. 5. Пациент М., 25 лет. Области зубного налета проанализированы с помощью программного обеспечения. КПУ — 13. Значение SHS — 2, площадь бактериальной активности Area ΔR — 30% — 4[%]



Рис. 4. Пациент Н., 32 года. Результаты QLF-диагностики гигиенического состояния полости рта. КПУ — 10. Значение SHS — 1, площадь бактериальной активности Area ΔR — 30% — 1[%]



Рис. 6. Пациент А., 21 год. Анализ зубного налета с применением QLF-диагностики. КПУ — 7. Значение SHS — 5, площадь бактериальной активности Area ΔR — 30% — 34[%].

Hein — $1,5 \pm 0,28$). Очень высокий уровень кариозного процесса характеризуется значениями Simple Hygiene Score от 3 до 5 баллов (Green-Vermillion — $2,3 \pm 0,43$, Quigley, Hein — $2,1 \pm 0,35$) ($p < 0,05$).

По данным ряда авторов, значение SHS, равное 0, говорит о хорошем гигиеническом состоянии полости рта, а значение, равное 5, — о плохом [17]. В нашем исследовании выявлено, что хорошему гигиеническому состоянию полости рта соответствовали значения SHS, равные 0, 1 и 2.

При этом распределение и образование зубного налета в пределах зубного ряда может значительно различаться, что и будет отражено значением простого гигиенического индекса.

Есть сообщение об ограничении в применении QLF-D для оценки общего состояния полости рта ввиду того, что QLF хорошо отражает диагностику в области фронтальной группы зубов верхней и нижней челюстей. Так, измерения в области моляров верхней челюсти, а

Таблица 3. Показатели простого гигиенического индекса (SHS) у обследованных

Уровень интенсивности кариозного процесса	Количество обследованных	Простой гигиенический индекс (SHS)
Очень низкий	3	0
	9	1
Низкий	13	1
	15	2
Средний	2	1
	13	2
	23	3
	22	4
	12	5
Высокий	1	2
	23	3
	25	4
Очень высокий	27	5
	2	3
	5	4
	9	5
	Итого	204

также небных и язычных поверхностей зубов ограничены из-за сложности фотографирования данных участков [18]. Полученные нами результаты показали, что определение SHS в области фронтальной группы зубов позволяет быстро и достоверно выявить скопление микробного налета. Следует отметить, что для ряда индексов необходимо определение зубного налета с язычной/небной поверхности зубов, что удобнее проводить зондом.

К преимуществам метода следует отнести отсутствие необходимости окрашивания зубных отложений [19].

Выводы

Метод QLF целесообразно использовать в качестве скринингового обследования для оценки уровня индивидуальной гигиены полости рта пациентов. Количественная светоиндуцированная флуоресценция объективно и наглядно отражает скопление зубного налета и позволяет изучить показатель SHS в динамике. При этом остается не изученным вопрос клинической значимости определения площади бактериальной активности на реставрациях зубов.

Литература

1. Valm A.M. The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. *J Mol Biol.* 2019; 431 (16): 2957–69. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.05.016.
2. Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdani A, Rezvani MB, Seifalian A, Yazdani M, et al. Eur. Oral microbial biofilms: an update. *J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019; 38 (11): 2005–19. DOI: 10.1007/s10096-019-03641-9. PMID: 31372904.
3. Velsko IM, Fellows Yates JA, Aron F, Hagan RW, Frantz LAF, Loe L, et al. Microbial differences between dental plaque and historic dental calculus are related to oral biofilm maturation stage. *Microbiome.* 2019; 7 (1): 102. DOI: 10.1186/s40168-019-0717-3.
4. Hwang H-R, Cho Y-S, Kim B-I. Assessment of clinical applicability of a new plaque scoring system using quantitative light-induced fluorescence-digital. *J Dental Hygiene Sci.* 2014; 14 (2): 150–7.
5. Klaus K, Glanz T, Glanz AG, Ganss C, Ruf S. Comparison of Quantitative light-induced fluorescence-digital (QLF-D) images and images of disclosed plaque for planimetric quantification of dental plaque in multibracket appliance patients. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 4478. DOI: 10.1038/s41598-020-61454-9. PMID: 32161288.
6. D'Elia G, Floris W, Marini L, Corridore D, Rojas MA, Ottolenghi L, et al. Methods for evaluating the effectiveness of home oral hygiene measures—a narrative review of dental biofilm indices. *Dent J (Basel).* 2023; 11 (7): 172. DOI: 10.3390/dj11070172.
7. Soldo M, Matijević J, Malčić Ivanišević A, Čuković-Bagić I, Marks L, Nikolov Borić D, et al. Impact of oral hygiene instructions on plaque index in adolescents. *Cent Eur J Public Health.* 2020; 28 (2): 103–7. DOI: 10.21101/cejph.a5066. PMID: 32592553.
8. Carvalho AP, Moura MF, Costa FO, Cota LO. Correlations between different plaque indexes and bleeding on probing: A concurrent validity study. *J Clin Exp Dent.* 2023; 15 (1): e9–e16. DOI: 10.4317/jced.60039.
9. Yoo JMSS, Cho JW, Eom KH, Kim HS, Lee MG, Lee MY. Clinical study on the comparison of various types of the dental plaque indices. *Int J Clin Prev Dent.* 2007; 3: 111–21.
10. Kim H-E. Quantitative light-induced fluorescence: a potential tool for dental hygiene process. *J Dental Hygiene Sci.* 2013; 13 (2): 115–24. DOI: 10.1016/j.jds.2012.12.011.
11. Meharry MR, Dawson D, Wefel IS, Harless JD, Kummert CM, Xiao X. The effect of surface defects in early caries assessment using quantitative light-induced fluorescence (QLF) and micro-digital-photography (MDP) *J Dent.* 2012; 40 (11): 955–61. DOI: 10.1016/j.jdent.2012.08.001. Epub 2012 Aug 11.
12. Oh SH, Choi JY, Lee SR, Kim SH. Evaluation of Periodontal Risk Factors with Quantitative Light-Induced Fluorescence Based Fluorescent Plaque Index, in Comparison to Radiographic and Oral Health Habit Scoring: A Retrospective Case Study. *Sensors (Basel).* 2021; 21 (17): 5774. DOI: 10.3390/s21175774.
13. Lee J, Lee T, Jung HI, Park W, Song JS. Effectiveness of an Oral Health Education Program Using a Smart Toothbrush with Quantitative Light-Induced Fluorescence Technology in Children. *Children (Basel).* 2023; 10 (3): 429. DOI: 10.3390/children10030429.
14. H SY. Development of novel dental plaque scoring system using quantitative light induced fluorescence-digital. Dissertation: Yonsei university; 2014.
15. Kim M, Lee S-Y, Cho Y-S. Validity and reliability of the plaque score using Qraycam. *J Dental Hygiene Sci.* 2015; 15 (3): 377–82. DOI: 10.17135/jdhs.2015.15.3.377.
16. Khudanov B, Jung HI, Kahharova D, Lee J-W, Hamidov I, Lee ES, Kim B-I. Effect of an oral health education program based on the use of quantitative light-induced fluorescence technology in Uzbekistan adolescents. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2018.
17. Акулович А. В., Никифорова Г. Г., Коростелев А. А., Матело С. К. Использование метода количественной светоиндуцированной флуоресценции (QLF) для диагностики состояния эмали при различных стоматологических вмешательствах. *Пародонтология.* 2023; 28 (1): 55–65. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.33925/1683-3759-2023-28-1-55-65>.
18. Hwang H-R, Cho Y-S, Kim B-I. Assessment of clinical applicability of a new plaque scoring system using quantitative light-induced fluorescence-digital. *J Dental Hygiene Sci.* 2014; 14 (2): 150–7.
19. Jong-Bin Lee, Da-Hye Choi, Yon-Joo Mah, Eun-Kyoung Pang. Validity assessment of quantitative light-induced fluorescence-digital (QLF-D) for the dental plaque scoring system: a cross-sectional study. *BMC Oral Health.* 2018 20; 18: 187. DOI: 10.1186/s12903-018-0654-8.

References

1. Valm A.M. The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. *J Mol Biol.* 2019; 431 (16): 2957–69. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.05.016.
2. Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdani A, Rezvani MB, Seifalian A, Yazdani M, et al. Eur. Oral microbial biofilms: an update. *J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019; 38 (11): 2005–19. DOI: 10.1007/s10096-019-03641-9. PMID: 31372904.
3. Velsko IM, Fellows Yates JA, Aron F, Hagan RW, Frantz LAF, Loe L, et al. Microbial differences between dental plaque and historic dental calculus are related to oral biofilm maturation stage. *Microbiome.* 2019; 7 (1): 102. DOI: 10.1186/s40168-019-0717-3.
4. Hwang H-R, Cho Y-S, Kim B-I. Assessment of clinical applicability of a new plaque scoring system using quantitative light-induced fluorescence-digital. *J Dental Hygiene Sci.* 2014; 14 (2): 150–7.
5. Klaus K, Glanz T, Glanz AG, Ganss C, Ruf S. Comparison of Quantitative light-induced fluorescence-digital (QLF-D) images and images of disclosed plaque for planimetric quantification of dental plaque in multibracket appliance patients. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 4478. DOI: 10.1038/s41598-020-61454-9. PMID: 32161288.
6. D'Elia G, Floris W, Marini L, Corridore D, Rojas MA, Ottolenghi L, et al. Methods for evaluating the effectiveness of home oral hygiene measures—a narrative review of dental biofilm indices. *Dent J (Basel).* 2023; 11 (7): 172. DOI: 10.3390/dj11070172.
7. Soldo M, Matijević J, Malčić Ivanišević A, Čuković-Bagić I, Marks L, Nikolov Borić D, et al. Impact of oral hygiene instructions on plaque index in adolescents. *Cent Eur J Public Health.* 2020; 28 (2): 103–7. DOI: 10.21101/cejph.a5066. PMID: 32592553.

- (2): 103–7. DOI: 10.21101/cejph.a5066.PMID: 32592553.
8. Carvalho AP, Moura MF, Costa FO, Cota LO. Correlations between different plaque indexes and bleeding on probing: A concurrent validity study. *J Clin Exp Dent*. 2023; 15 (1): e9–e16. DOI: 10.4317/jced.60039.
 9. Yoo JMSS, Cho JW, Eom KH, Kim HS, Lee MG, Lee MY. Clinical study on the comparison of various types of the dental plaque indices. *Int J Clin Prev Dent*. 2007; 3: 111–21.
 10. Kim H-E. Quantitative light-induced fluorescence: a potential tool for dental hygiene process. *J Dental Hygiene Sci*. 2013; 13 (2): 115–24. DOI: 10.1016/j.jds.2012.12.011.
 11. Meharry MR, Dawson D, Wefel IS, Harless JD, Kummet CM, Xiao X. The effect of surface defects in early caries assessment using quantitative light-induced fluorescence (QLF) and micro-digital-photography (MDP) *J Dent*. 2012; 40 (11): 955–61. DOI: 10.1016/j.jdent.2012.08.001. Epub 2012 Aug 11.
 12. Oh SH, Choi JY, Lee SR, Kim SH. Evaluation of Periodontal Risk Factors with Quantitative Light-Induced Fluorescence Based Fluorescent Plaque Index, in Comparison to Radiographic and Oral Health Habit Scoring: A Retrospective Case Study. *Sensors (Basel)*. 2021; 21 (17): 5774. DOI: 10.3390/s21175774.
 13. Lee J, Lee T, Jung HI, Park W, Song JS. Effectiveness of an Oral Health Education Program Using a Smart Toothbrush with Quantitative Light-Induced Fluorescence Technology in Children. *Children (Basel)*. 2023; 10 (3): 429. DOI: 10.3390/children10030429.
 14. H SY. Development of novel dental plaque scoring system using quantitative light induced fluorescence-digital. Dissertation: Yonsei university; 2014.
 15. Kim M, Lee S-Y, Cho Y-S. Validity and reliability of the plaque score using Qraycam. *J Dental Hygiene Sci*. 2015; 15 (3): 377–82. DOI: 10.17135/jdhs.2015.15.3.377.
 16. Khudanov B, Jung HI, Kahharova D, Lee J-W, Hamidov I, Lee ES, Kim B-I. Effect of an oral health education program based on the use of quantitative light-induced fluorescence technology in Uzbekistan adolescents. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2018.
 17. Akulovich AV, Nikiforova GG, Korostelev AA, Matelo SK. Ispol'zovanie metoda kolichestvennoj svetoinducirovannoj fluorescencii (QLF) dlja diagnostiki sostojanija jemali pri razlichnyh stomatologicheskikh vmeshatel'stvah. *Parodontologija*. 2023; 28 (1): 55–65. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.33925/1683-3759-2023-28-1-55-65>. Russian.
 18. Hwang H-R, Cho Y-S, Kim B-I. Assessment of clinical applicability of a new plaque scoring system using quantitative light-induced fluorescence-digital. *J Dental Hygiene Sci*. 2014; 14 (2): 150–7.
 19. Jong-Bin Lee, Da-Hye Choi, Yon-Joo Mah, Eun-Kyoung Pang. Validity assessment of quantitative light-induced fluorescence-digital (QLF-D) for the dental plaque scoring system: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2018 20; 18: 187. DOI: 10.1186/s12903-018-0654-8.

АНАЛИЗ ОСВЕДОМЛЕННОСТИ РОССИЯН О ДОНОРСТВЕ КОСТНОГО МОЗГА И ИНФРАСТРУКТУРЫ ФЕДЕРАЛЬНОГО РЕГИСТРА ДОНОРОВ КОСТНОГО МОЗГА

М. А. Бутунц, К. А. Дюжина, Е. С. Нифатова, Т. Г. Мурадян ✉

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Трансплантация костного мозга — ведущий метод лечения злокачественных новообразований крови, иммунодефицитных состояний и наследственных метаболических нарушений. Эффективность Федерального регистра доноров костного мозга напрямую зависит от уровня информированности населения о донорстве костного мозга и развития инфраструктуры. Для повышения эффективности системы необходим комплексный подход к информированию населения. Целью исследования было изучить факторы, влияющие на вступление в Федеральный регистр доноров костного мозга, с акцентом на мотивацию, источники информации, влияние инфраструктуры, окружения и распространенных мифов. Респонденты (потенциальные доноры, состоящие в Федеральном регистре; $n = 3100$) заполняли онлайн-анкету из 24 вопросов, направленных на изучение и оценку социально-демографических характеристик, мотивации, источников информации, влияния окружения, осведомленности о донорстве костного мозга и готовности к донации. Установлено, что молодые люди 18–36 лет ($n = 1860$) чаще вступают в Федеральный регистр через неформальные каналы, такие как акции на работе/учебе ($n = 843$; 27,2%), респонденты старше 37 лет ($n = 1240$) предпочитают медицинские организации ($n = 1590$; 51,3%). Женщины составляют большинство потенциальных доноров ($n = 2304$; 74,3%), особенно в Москве ($n = 1650$; 74,5%), в регионах отмечается более высокая распространенность мифов ($n = 1646$; 53,1%). Полученные результаты подчеркивают необходимость дифференцированного подхода в информационной политике, что позволит повысить эффективность донорского движения в масштабах страны. Ключевой фактор масштабирования этой работы — партнерство с коммерческими лабораториями, которое значительно расширяет рекрутинговую сеть Федерального регистра и обеспечивает удобные условия для вступления доноров.

Ключевые слова: донорство, костный мозг, гемопоэтические стволовые клетки, трансплантация, ТКМ, ТГСК, Федеральный регистр доноров костного мозга

Вклад авторов: М. А. Бутунц — планирование исследования, анализ литературы, рекрутинг потенциальных доноров костного мозга, взаимодействие с медицинскими организациями, статистический анализ, подготовка рукописи; К. А. Дюжина — анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных, рекрутинг потенциальных доноров костного мозга, взаимодействие с медицинскими организациями; Е. С. Нифатова — планирование исследования, анализ литературы, рекрутинг потенциальных доноров костного мозга, Т. Г. Мурадян — планирование исследования, анализ литературы, анализ и интерпретация данных, взаимодействие с медицинскими организациями, статистический анализ, подготовка рукописи.

Соблюдение этических стандартов: все участники социологического опроса дали добровольное информированное согласие на проведение исследования; опрос анонимный, данные обрабатываются конфиденциально.

✉ **Для корреспонденции:** Тигран Гагикович Мурадян
ул. Островитянова, д. 1/6, к. 2021, г. Москва, 117513, Россия; muradyan@rsmu.ru

Статья получена: 26.05.2025 **Статья принята к печати:** 17.06.2025 **Опубликована онлайн:** 26.06.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.032

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANALYSIS OF THE RUSSIANS' AWARENESS OF BONE MARROW DONATION AND THE FEDERAL BONE MARROW DONOR REGISTRY INFRASTRUCTURE

Butunts MA, Dyuzhina KA, Nifatova ES, Muradyan TG ✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Bone marrow transplant is the leading method to treat hematologic malignancies, immunodeficiency, and hereditary metabolic disorders. The Federal Bone Marrow Donor Registry effectiveness depends directly on public awareness of bone marrow donation and infrastructure development. A comprehensive approach to public awareness is necessary to increase the system effectiveness. The study aimed to investigate factors that influence joining the Federal Bone Marrow Donor Registry, with a focus on motivation, sources of information, impact of infrastructure, environment, and common myths. The respondents (potential donors registered in the Federal Registry; $n = 3100$) filled an online questionnaire of 24 questions aimed at studying and assessing the socio-demographic characteristics, motivation, sources of information, influence of the environment, awareness of bone marrow donation, and readiness to donate. It was found that young adults aged 18–36 ($n = 1860$) more often join the Federal Registry through informal channels, such as work/school events ($n = 843$; 27.2%), while respondents over the age of 37 ($n = 1240$) prefer healthcare institutions ($n = 1590$; 51.3%). Women make up the majority of potential donors ($n = 2304$; 74.3%), especially in Moscow ($n = 1650$; 74.5%), while higher prevalence of myths is reported for the regions ($n = 1646$; 53.1%). The findings emphasize the need for the differentiated approach to information policy, which will make it possible to increase the donor movement effectiveness nationwide. A key factor in scaling this work is partnership with commercial laboratories, which significantly expands the Federal Registry recruitment network and provides convenient conditions for donors to join.

Keywords: donation, bone marrow, hematopoietic stem cell, transplantation, BMT, HSCT, Federal Bone Marrow Donor Registry

Author contribution: Butunts MA — study planning, literature review, recruiting potential bone marrow donors, cooperation with medical institutions, statistical analysis, manuscript writing; Dyuzhina KA — literature review, data acquisition, analysis, and interpretation, recruiting potential bone marrow donors, cooperation with medical institutions; Nifatova ES — study planning, literature review, recruiting potential bone marrow donors; Muradyan TG — study planning, literature review, data analysis and interpretation, cooperation with medical institutions, statistical analysis, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: all the sociological survey participants submitted the informed consent to the study; the survey was anonymous, the data were treated confidentially.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tigran G. Muradyan
Ostrovityanova, 1/6, ap. 2021, Moscow, 117513, Russia; muradyan@rsmu.ru

Received: 26.05.2025 **Accepted:** 17.06.2025 **Published online:** 26.06.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.032

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Трансплантация костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток периферической крови (ТКМ/ТГСК) представляет собой высокотехнологичный метод лечения. Его применяют при широком спектре заболеваний, включая злокачественные новообразования крови, иммунодефицитные состояния и наследственные метаболические нарушения [1]. В основе метода лежит замещение патологического кроветворения реципиента за счет введения гемопоэтических стволовых клеток, полученных либо от самого пациента (аутологичная ТГСК), либо от донора (аллогенная ТГСК) [2]. Аллогенную ТГСК, в свою очередь, подразделяют на процедуры с использованием клеток от HLA-идентичных родственных доноров, гаплоидентичных родственных доноров и неродственных доноров костного мозга с допустимой степенью совместимости. Исторически первую успешную аллогенную ТГСК от HLA-совместимого родственного донора (от сестры) выполнил R. A. Good в 1968 г. в США пятимесячному мальчику с первичным иммунодефицитом, а первую успешную аллогенную ТГСК от HLA-совместимого неродственного донора — E. D. Thomas пятилетнему ребенку с тяжелым комбинированным иммунодефицитом в 1973 г. также в США. В России подобное вмешательство впервые проведено в 1985 г., а первая успешная детская родственная ТГСК осуществлена в 1991 г. Б. В. Афанасьевым: реципиентом стал пятилетний мальчик с острым лимфобластным лейкозом, а донором — его брат. В последние годы в стране ежегодно выполняют более 2000 ТГСК, причем доля аллогенных процедур неуклонно растет (в 2023 г. она составила более 1000 случаев) [3].

Стоит отметить, что ключевым элементом системы аллогенных ТГСК является регистр доноров костного мозга. В России в 2014 г. была создана единая база данных «Bone marrow donor search» — BMDS на базе ПСПбГМУ имени И. П. Павлова. В 2022 г. сформирован Федеральный регистр доноров костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, донорского костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, реципиентов костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток (Федеральный регистр), оператором которого назначено Федеральное медико-биологическое агентство [4]. На сегодняшний день в нем содержится около 470 тыс. записей о потенциальных донорах костного мозга (потенциальные доноры), из которых 312 тыс. доступны для поиска. Однако для обеспечения эффективного подбора потенциальных доноров для 80% пациентов требуется расширение Федерального регистра до 1 млн человек [5].

Важно отметить, что финансирование процессов, обеспечивающих донорство костного мозга, осуществляется из государственного бюджета (HLA-типирование, медицинское обследование донора костного мозга, донорство костного мозга, проезд доноров костного мозга).

Несмотря на развитие инфраструктуры, включая организацию рекрутинговых центров (РЦ) на базе учреждений службы крови и иных медицинских организаций, сохраняется ряд системных проблем. Только 35% населения готовы стать донорами костного мозга, что связано с низкой информированностью и распространенностью мифов о процедуре [6]. Так, 47% россиян считают донорство костного мозга опасным для здоровья, а 60% ожидают болезненных ощущений. Дополнительным барьером остается ограниченная доступность рекрутинговых центров: в девяти субъектах они отсутствуют полностью, а в крупных субъектах их явно недостаточно [7]. Это создает существенные сложности

для потенциальных доноров, ограничивая им доступность РЦ, а также вынуждая их преодолевать значительные расстояния для сдачи образца биологического материала (венозную кровь или буккальный эпителий), что может стать препятствием к вступлению в Федеральный регистр. Таким образом, для дальнейшего развития Федерального регистра требуется как активная информационная политика, так и расширение инфраструктуры.

Целью исследования было выявить ключевые факторы, влияющие на готовность человека к донорству костного мозга, и различия мотивационных факторов, влияющих на вступление в Федеральный регистр доноров костного мозга в зависимости от пола, возраста, личного опыта респондента, в том числе влияния распространенности мифов, уровня доверия к специалистам, а также инфраструктуры Федерального регистра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данное исследование проведено в октябре–ноябре 2024 г. с использованием онлайн-анкетирования. В исследование было приглашено 6900 потенциальных доноров костного мозга, состоящих в Федеральном регистре доноров костного мозга на момент проведения анкетирования, рекрутированных Пироговским университетом. Онлайн-анкету направляли потенциальным донорам посредством электронной почты и мессенджеров по контактному данным, указанным при вступлении в Федеральный регистр. Среди приглашенных в исследование потенциальных доноров было 4664 (67,6%) женщин и 2236 (32,4%) мужчин; медиана возраста составила 29,0 лет (23–36). В опросе приняли участие 3100 респондентов, состоящих в Федеральном регистре доноров костного мозга, рекрутированных Пироговским университетом, заполнивших анкету, размещенную на платформе «Google Forms» (Google LLC, США). Анкета включала 24 обязательных вопроса, направленных на изучение социально-демографических характеристик, мотивации, источников информации, влияния окружения, осведомленности о донорстве костного мозга и готовности к донорству (приложение).

Обработку полученных результатов опроса респондентов проводили с помощью статистического анализа данных в программе StatTech 4.8.3 (ООО «Статтех», Россия).

Количественные показатели проверяли на нормальность с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Данные с ненормальным распределением представлены в виде медианы и квартилей ($Me [Q_1-Q_3]$ — interquartile range (IQR)), категориальные переменные — в виде абсолютных и относительных частот ($n, \%$) с 95%-м доверительным интервалом (95%-й ДИ), метод Клоппера–Пирсона. Сравнение двух независимых групп по количественному признаку (без нормального распределения) проводили с помощью U -критерия Манна–Уитни. Сравнение процентных долей в четырехпольных таблицах выполняли с использованием критерия хи-квадрат Пирсона (при ожидаемых частотах $\geq 10,0$), а для оценки эффекта рассчитывали отношение шансов с 95%-м ДИ. Анализ многопольных таблиц проводили с применением критерия хи-квадрат Пирсона. Статистическую значимость устанавливали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате проведенного анкетирования удалось установить, что среди 3100 (100%) респондентов,

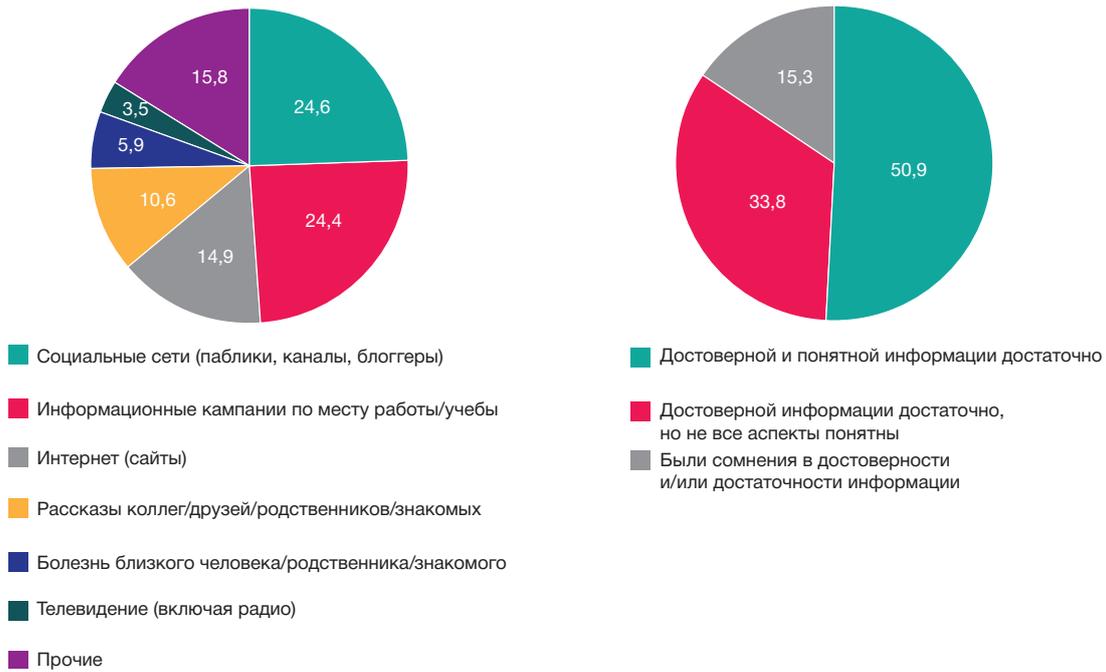


Рис. 1. Каналы информирования о Федеральном регистре: 1 — основной источник информации, 2 — полнота и достоверность информации, доступность ее изложения

полностью прошедших опрос, было 2304 (74,3%) женщин и 796 (25,7%) мужчин. Медиана возраста респондентов составила 31,0 лет (24–37). Медиана возраста вступления респондентов в Федеральный регистр доноров костного мозга составила 30,0 лет (23–36). Наибольшее количество респондентов вступили в Федеральный регистр на территории г. Москвы — 2215 (71,5%), Московской области — 284 (9,2%), Омской области — 113 (3,6%) и города Санкт-Петербург — 83 (2,7%) респондентов соответственно. В случаях с прочими (61 субъект) субъектами Российской Федерации количество вступивших респондентов в Федеральный регистр составило 0,1–0,8%.

Среди опрошенных 2558 (82,5%) человек слышали о донорстве костного мозга до вступления в Федеральный

регистр, тогда как 542 (17,5%) человека не были осведомлены об этом ранее.

Основными источниками информации о донорстве костного мозга для респондентов стали социальные сети (информационные «паблики» и «каналы», блоггеры), информационные кампании по месту работы/учебы, рассказы коллег/друзей/родственников. По оценкам достоверности информации, представленной в открытых источниках, 1523 (49,1%) человека считают полученные сведения достаточными и достоверными, тогда как 434 (14,0%) выразили сомнения в достоверности предоставленной информации (рис. 1).

О мифах, связанных с донорством костного мозга, слышали менее половины опрошенных — 1258 (40,6%)



Рис. 2. Мифы о донорстве костного мозга: 1 — наиболее часто встречающиеся мифы о донорстве костного мозга, 2 — опыт столкновения с мифами о донорстве костного мозга и стратегии преодоления



Рис. 3. Консультация специалиста Федерального регистра: 1 — удовлетворенность потенциальных доноров консультацией, 2 — влияние на принятие решения о вступлении в Федеральный регистр

респондентов, при этом 1122 (36,2 %) сталкивались с мифами лично. Наиболее распространенными мифами оказались: «Процедура опасна для здоровья», «Костный мозг сдают из позвоночника или спинного мозга» и «Процедура очень болезненная» (рис. 2).

Подавляющее большинство респондентов 2551 (82,3%) получило ответы на все вопросы о донорстве костного мозга во время консультации со специалистом Федерального регистра. В случае с 740 (23,9%) респондентами именно консультация со специалистами способствовала принятию решения о вступлении в Федеральный регистр (рис. 3).

Основными мотивами к вступлению в Федеральный регистр стали следующие: желание помочь пациентам, нуждающимся в ТГСК (2332 человека; 75,2%); стремление быть причастным к социально значимому делу (666 человек; 21,5%). Готовность к донации костного мозга без промедления выразили 2273 респондента (73,3%). Еще 623 (20,1%) хотели бы обсудить этот вопрос с близкими, однако решение принимать будут самостоятельно (рис. 4).

По результатам опроса, лишь 1175 человек (37,9%) получили поддержку от семьи. У большинства

респондентов родственники не состоят в Федеральном регистре (рис. 5).

Уровень осведомленности о заболеваниях, при которых применяют трансплантацию костного мозга, следующий: 2420 человек (78,1%) знают об этих заболеваниях; знаниями о самой процедуре ТГСК обладает 2701 респондент (87,1%).

Что касается мест вступления в Федеральный регистр, то 2638 человек (85,1%) сделали это в своем населенном пункте. У 1445 (46,6%) человек наиболее популярными местами стали партнерские коммерческие лаборатории Пироговского университета («Ситилаб», Россия; «КДЛ Домодедово-Тест», Россия). При оценивании удобства пунктов, в которых респонденты успешно вступили в Федеральный регистр, 2515 человек (81,1%) были удовлетворены их расположением и графиком работы (рис. 6).

Обратная связь о поступлении образца биологического материала в лабораторию и о внесении результатов HLA-типирования в Федеральный регистр важна для 3025 (97,6%) респондентов.



Рис. 4. Мотивация к донорству костного мозга: 1 — основная мотивация ко вступлению в Федеральный регистр, 2 — готовность к донации костного мозга без промедления

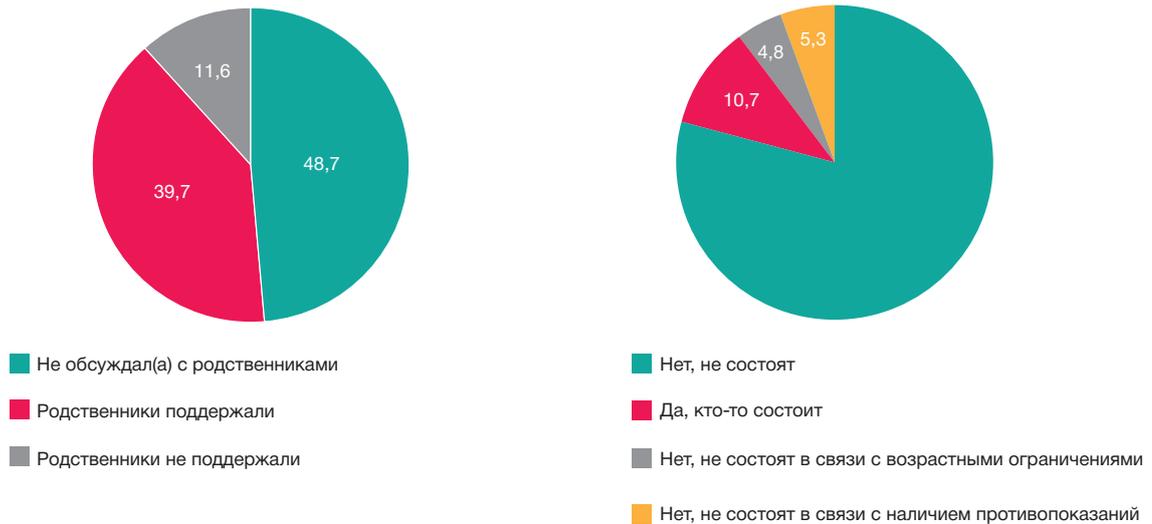


Рис. 5. Поддержка родственников и их вовлеченность в донорство костного мозга: 1 — обсуждение планов о вступлении в Федеральный регистр, 2 — статус родственников в Федеральном регистре

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенного анализа были выявлены некоторые закономерности и тенденции. Так, удалось установить, что респонденты моложе 37 лет на 27,2% чаще вступали в Федеральный регистр доноров костного мозга на донорских акциях на работе или в образовательном учреждении. Участники исследования в возрасте 37–50 лет предпочитали (в 51,3% случаев) вступать в Федеральный регистр в медицинских лабораториях и учреждениях службы крови ($p < 0,001$).

Анализ источников информации показал ярко выраженную возрастную специфику ($p = 0,048$): молодежь в основном получает сведения из социальных сетей (974 человека; 31,4%), рассказов друзей (428 человек; 13,8%) и интернет-сайтов (564 человека; 18,2%), тогда как люди старше 37 лет больше доверяют телевидению (257 человек; 8,3%), официальным информационным кампаниям (887 человек; 28,6%) и медицинским источникам (282 человека; 9,1%). Выявлена невысокая поддержка в принятии решения о вступлении в Федеральный регистр со стороны близких и родственников (1230 человек; 39,7%), а также их низкая вовлеченность в донорство костного мозга —

у 2769 (89,3%) близкие и родственники не состоят в Федеральном регистре.

Мотивационная структура также имеет возрастные особенности ($p = 0,013$): для молодежи характерно желание помочь (2117 человек; 68,3%) и социальная активность (787 человек; 25,4%), в то время как старшее поколение руководствуется личным опытом (270 человек; 8,7%) и осознанным выбором (1897 человек; 61,2%). Гендерный анализ выявил большую готовность мужчин к донации (607 человек из 796; 76,3%) по сравнению с женщинами (1588 человек из 2304; 68,9%), причем молодежь чаще соглашается сразу (1365 человек из 1860; 73,1%), а людям старше 37 лет обычно требуется дополнительное обсуждение (786 человек из 1240; 63,4%).

Исследование подтвердило значительное влияние мифов на принятие решения ($p = 0,047$): среди 1205 столкнувшихся с ними респондентов зафиксировано 172 возможных отказа от донации в будущем (14,3%), тогда как среди 1895 не сталкивавшихся с мифами — лишь 59 возможных отказов (3,1%). Молодежь сталкивается с мифами чаще (792 человека из 1860; 42,6%), чем старшее поколение (369 человек из 1240; 29,8%), а наибольшая распространенность мифов зафиксирована в регионах (1646 случаев из 3100; 53,1%) против 1004 случаев (32,4%) в крупных городах.



Рис. 6. Наиболее удобные места для вступления в Федеральный регистр

Регионально-гендерный анализ показал преобладание женщин среди потенциальных доноров во всех регионах (от 2201 до 2449 человек; 71,0–79,0%), с максимальным показателем в Москве (1650 женщин из 2215 доноров; 74,5%) и минимальным в регионах (от 158 до 180 женщин на регион, 51,0–58,0%). Эти данные подчеркивают необходимость разработки дифференцированных подходов к информационной работе и организации донорского движения с учетом выявленных возрастных, гендерных и региональных особенностей.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты исследования убедительно демонстрируют необходимость комплексного дифференцированного подхода к развитию Федерального регистра доноров костного мозга. Анализ данных показал существенную вариативность в мотивации, каналах получения информации и факторах, влияющих на принятие решения о вступлении в Федеральный регистр среди различных социально-демографических групп. Согласно данным, 46,6% потенциальных доноров вступили в Федеральный регистр через партнерские коммерческие лаборатории Пироговского университета, лишь 11,1% — в учреждениях службы крови, что подтверждает важную роль участия партнерских коммерческих лабораторий в развитии Федерального регистра. Такая ситуация обусловлена широкой представленностью сетей медицинских офисов коммерческих лабораторий как в центральных и крупных городах, где есть учреждения службы крови, так и в городах с отсутствием донорской инфраструктуры, а также удобным графиком работы (чаще всего с 8:00 до 20:00, включая выходные). Это особенно важно для основной аудитории — молодых людей (обучающиеся, работники), учебный или рабочий график которых совпадает с графиком работы учреждений службы крови. Таким образом, партнерские

коммерческие лаборатории значительно расширяют доступность вступления в Федеральный регистр благодаря предложению удобных условий — графика работы и территориальной близости. Исследование подтверждает критическую важность персонализации информационных кампаний с учетом возрастных особенностей, гендерных различий и региональной специфики. Учитывая влияние родственников на принятие решения о вступлении в Федеральный регистр, особое внимание следует уделить информационной работе с более старшей аудиторией — родителями молодых людей, на которых проецируются имеющиеся мифы и заблуждения о донорстве костного мозга, приводящие к отказу от вступления в Федеральный регистр или отказу от донации костного мозга для реципиента при поступлении запроса из центра трансплантации. Оптимизация системы информирования и организации популяризации донорства костного мозга требует развития многоуровневой системы коммуникации, сочетающей цифровые технологии с традиционными форматами, а также усиления роли профессионального медицинского сообщества в просветительской работе. Обратная связь от Федерального регистра является важным аспектом информационной политики. Реализация такого подхода позволит повысить эффективность привлечения в Федеральный регистр доноров костного мозга осознанных потенциальных доноров и качество их сопровождения на всех этапах взаимодействия, а также достичь основной цели — согласия доноров к осуществлению донаций костного мозга при поступлении соответствующих запросов центров трансплантации. Кроме того, уменьшение доли отказов от донации костного мозга приведет к более эффективному расходованию бюджетных средств путем исключения затрат на дорогостоящие лабораторные исследования — первичное и/или контрольное HLA-типирование образцов крови доноров и медицинское обследование доноров костного мозга, вступающих в Федеральный регистр неосознанно.

Литература

1. Афанасьев Б. В., Зубаровская Л. С., Моисеев И. С. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей: настоящее, проблемы, перспективы. *Российский журнал детской гематологии и онкологии (РЖДГО)*. 2015; 2 (2): 28–42. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.17650/2311-1267-2015-2-2-28-42>.
2. Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf M, Atsuta Y, et al. Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT). One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *Lancet Haematol*. 2015; 2 (3): e91–100. Available from: [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(15\)00028-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(15)00028-9).
3. Мелкова К. Н. Аллогенная трансплантация костного мозга. *Клиническая онкогематология*. 2012; 5 (1): 1–12.
4. Alyanskiy AL, Makarenko OA, Ivanova NE, Golovacheva AA, Kuzmich EV, Kucher MA, et al. Development of donor bone marrow registry in Russian Federation: experience of Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 2016; 3 (2): 68–74. Available from: <https://doi.org/10.17650/2311-1267-2016-3-2-68-74>. Russian.
5. Гапонова Т. В. Стратегия формирования регистра доноров костного мозга с использованием инфраструктуры службы крови (диссертация). 2022.
6. Акционерное общество «Всероссийский центр изучения общественного мнения» (ВЦИОМ). Доступно по ссылке: <https://wciom.ru/analytical-reviews/analiticheskii-obzor/donorstvo-kostnogo-mozga-neznanie-rozhdaet-stereotipy>.
7. Федеральная государственная информационная система «Единый портал государственных и муниципальных услуг (функций)». Доступно по ссылке: https://www.gosuslugi.ru/help/faq/bone_marrow_registry/102326.

References

1. Afanasiev BV, Zubarovskaya LS, Moiseev IS. Allogennaya transplantatsiya gemopoieticheskikh stvolovykh kletok u detey: nastoyashchee, problemy, perspektivy. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii (RZhDGO)*. 2015; 2 (2): 28–42. Available from: <https://doi.org/10.17650/2311-1267-2015-2-2-28-42>. Russian.
2. Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf M, Atsuta Y, et al. Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT). One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *Lancet Haematol*. 2015; 2 (3): e91–100. Available from: [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(15\)00028-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(15)00028-9).
3. Melkova KN. Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Klinicheskaya*

- onkogematologiya. 2012; 5 (1): 1–12. Russian.
4. Alyanskiy AL, Makarenko OA, Ivanova NE, Golovacheva AA, Kuzmich EV, Kucher MA, et al. Development of donor bone marrow registry in Russian Federation: experience of Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 2016; 3 (2): 68–74. Available from: <https://doi.org/10.17650/2311-1267-2016-3-2-68-74>. Russian.
 5. Gaponova TV. Strategiya formirovaniya registra donorov kostnogo mozga s ispol'zovaniem infrastruktury sluzhby krovi (dissertaciya). 2022. Russian.
 6. Akcionernoe obshchestvo "Vserossijskij centr izutchenia obshhestvennogo mneniya" (VCIOM). Available from: <https://wciom.ru/analytical-reviews/analiticheskii-obzor/donorstvo-kostnogo-mozga-neznanie-rozhdaet-stereotipy>. Russian.
 7. Federalnaja gosudarstvennaja informacionnaja sistema "Ediniy portal gosudarstvennih i municipalnih uslug (funkcij)". Available from: https://www.gosuslugi.ru/help/faq/bone_marrow_registry/102326. Russian.

ИНТРАНАЗАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА КРЫСАМ SPRAGUE-DAWLEY КАК БИОМОДЕЛЬ ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА

В. В. Киселева¹✉, П. А. Вишнякова², А. М. Косырева³, Е. Ю. Кананыхина³, И. И. Емельянов¹, А. В. Ельчанинов³, Т. Х. Фатхудинов³

¹ Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

³ Российский научный центр хирургии имени Б. В. Петровского, Москва, Россия

Для острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) характерны высокая частота летальных исходов и отсутствие патофизиологической терапии. Для воспроизведения у животных ОРДС используют интратрахеальное введение липополисахарида (ЛПС). Ограничением метода является необходимость использования оборудования для выполнения интубации и контроля за состоянием животного. Целью исследования было оценить возможность использования интраназального введения ЛПС вместо интратрахеального и определить его оптимальную дозу. ЛПС *E. coli* O111:B4 7,5 мг/кг или 15 мг/кг или NaCl 0,9% в объеме 150 мкл вводили 21 крысе Sprague-Dawley. Через 48 ч кровь из хвостовой вены отбирали для определения лейкоцитарной формулы и концентрации TNFα. Легкие извлекали для оценки сухого остатка (Wet/dry ratio), определения уровней экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов методом ПЦР-РВ, определения относительного количества CD68, CD86 и MHC II положительных клеток в ткани легкого методом проточной цитометрии. W/d ratio было выше при дозе 15 мг/кг массы тела ($p = 0,0228$, Ordinary one-way Anova). В крови содержание лимфоцитов было снижено ($p = 0,0019$, Ordinary one-way Anova), а нейтрофилов повышено ($p = 0,0021$, Ordinary one-way Anova) при обеих дозах введения. Количество CD86 ($p = 0,0014$, Ordinary one-way Anova) и MHC II положительных клеток ($p = 0,0050$, Ordinary one-way Anova) повышалось после введения ЛПС. Уровень экспрессии гена IL10 был значимо повышен при дозе 15 мг/кг ($p = 0,0024$, Ordinary one-way Anova), а IL4 ($p = 0,0194$, Ordinary one-way Anova) снижен при дозе 7,5 мг/кг. Таким образом, интраназальное введение ЛПС может быть использовано для воспроизведения ОРДС у крыс Sprague-Dawley. Высокая доза введения приводит к быстрому развитию воспалительных процессов в легких.

Ключевые слова: липополисахарид, ЛПС, крысы Sprague-Dawley, цитокин, модель на животных, ОРДС, уровень экспрессии

Финансирование: работа поддержана Российским научным фондом (номер гранта 24-25-00203).

Благодарности: авторы благодарят руководителя лаборатории патологии клетки НИИ морфологии человека имени А. П. Авцына к. б. н. Д. А. Арешидзе за измерение показателей общей формулы крови животных.

Вклад авторов: В. В. Киселева — дизайн и проведение эксперимента, анализ полученных результатов, написание статьи; П. А. Вишнякова — консультирование по вопросам проведения эксперимента, материальная база, редактирование; А. М. Косырева — консультирование по вопросам проведения эксперимента, редактирование; Е. Ю. Кананыхина, И. И. Емельянов — работа с животными; А. В. Ельчанинов — консультирование по вопросам проведения эксперимента, материальная база, редактирование; Т. Х. Фатхудинов — материальная база исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НИИ морфологии человека имени А. П. Авцына (протокол № 21 от 29 марта 2019 г.). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями ARRIVE и Директивой ЕС 2010/63/EU о защите животных, используемых в научных целях.

✉ **Для корреспонденции:** Виктория Викторовна Киселева
ул. Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; victoria.kurnosova.1991@gmail.com

Статья получена: 21.04.2025 **Статья принята к печати:** 06.05.2025 **Опубликована онлайн:** 20.05.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.027

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

INTRANASAL LIPOPOLYSACCHARIDE ADMINISTRATION TO SPRAGUE-DAWLEY RATS AS A BIOMODEL OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME

Kiseleva VV¹✉, Vishnyakova PA², Kosyreva AM³, Kananykhina EYu³, Emelianov II¹, Elchaninov AV³, Fatkhudinov TH³

¹ Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

² Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

³ Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

High fatality rate and the lack of pathophysiological therapy are typical for acute respiratory distress syndrome (ARDS). Intratracheal lipopolysaccharide (LPS) administration is used to model ARDS in animals. The method has the limitation of requiring the use of equipment to perform intubation and control the animal's state. The study aimed to assess the possibility of using intranasal LPS administration instead of intratracheal and determine the LPS optimal dose. A total of 150 mL of the *E. coli* O111:B4 LPS (7.5 mg/kg or 15 mg/kg) or 0.9% NaCl was administered to 21 Sprague-Dawley rats. After 48 h blood was collected from the tail vein to determine the white blood cell count and TNFα concentration. The lungs were retrieved to assess dry weight (wet/dry ratio) and to determine the expression of the genes encoding pro- and anti-inflammatory cytokines using real-time PCR. The relative counts of CD68-, CD86-, and MHC II-positive cells in the lung tissue were also evaluated using flow cytometry. The w/d ratio was higher when the dose of 15 mg/kg of body weight was used ($p = 0,0228$, ordinary one-way Anova). Blood lymphocyte counts were decreased ($p = 0,0019$, ordinary one-way Anova), and neutrophil counts were increased ($p = 0,0021$, ordinary one-way Anova) upon administration of both doses. The counts of CD86- ($p = 0,0014$, ordinary one-way Anova) and MHC II-positive cells ($p = 0,0050$, ordinary one-way Anova) increased after LPS administration. The *IL10* gene expression was significantly increased upon administration of the dose of 15 mg/kg ($p = 0,0024$, ordinary one-way Anova), while the *IL4* expression ($p = 0,0194$, ordinary one-way Anova) was decreased upon administration of the dose of 7.5 mg/kg. Thus, intranasal LPS administration can be used to model ARDS in the Sprague-Dawley rats. Administration of the high dose leads to the rapid development of inflammation in the lung.

Keywords: lipopolysaccharide, LPS, Sprague-Dawley rats, cytokine, animal model, ARDS, expression level

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 24-25-00203).

Acknowledgements: the authors would like to thank D.A. Arshidze, C. Sci. Biol., Head of the Cellular Pathology Laboratory of the Avtsyn Institute of Human Morphology for performing the complete blood count test in animals.

Author contribution: Kiseleva VV — experimental design and procedure, analysis of the results, manuscript writing; Vishnyakova PA — advice on the experimental procedure, material resources, editing; Kosyreva AM — advice on the experimental procedure, editing; Kananykhina EYu, Emelianov II — animal handling; Elchaninov AV — advice on the experimental procedure, material resources, editing; Fatkhudinov TH — material resources for the study.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Avtsyn Institute of Human Morphology (protocol No. 21 dated 29 March 2019). Animals were handled in accordance to the ARRIVE guidelines and the Directive EC 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Victoria V. Kiseleva
Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; victoria.kurnosova.1991@gmail.com

Received: 21.04.2025 **Accepted:** 06.05.2025 **Published online:** 20.05.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.027

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Острое повреждение легких и его наиболее тяжелая форма — острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) — комплексное многофакторное заболевание. На сегодняшний день не существует патофизиологической терапии ОРДС, а лечение остается исключительно симптоматическим, что обуславливает актуальность изучения данной патологии [1]. Использование моделей на животных («животных моделей») — неотъемлемая часть как изучения патофизиологических процессов при развитии заболевания, так и оценки эффективности потенциальных лекарственных препаратов.

Эффективность воспроизведения ОРДС человека на «животной модели» оценивают по наличию основных морфологических изменений, характерных для патологии: наличию интра-альвеолярного отека; увеличению количества нейтрофилов в межальвеолярных перегородках; формированию гиалиновых мембран, приводящему к утолщению межальвеолярных перегородок; образованию микротромбов [2]. Степень выраженности этих изменений обычно оценивают через 24 ч, более длительные интервалы времени после введения ЛПС остаются малоизученными.

Для моделирования ОРДС используют разные виды животных от грызунов до человекообразных обезьян [3]. Чаще всего ОРДС моделируют на мышах и крысах ввиду их максимальной доступности и относительной простоты работы с ними. Выделяют несколько подходов к моделированию ОРДС: прямое и не прямое повреждение легких (интраназальное/интратрахеальное или внутривенное введение липополисахарида (ЛПС) стенки грамотрицательных бактерий), а также комбинированные модели.

ЛПС состоит из трех частей, определяющих его иммуногенность. Липид А «заякоривает» молекулу ЛПС в клеточной стенке грамотрицательных бактерий и через Core-полисахарид связывается с O-цепью на поверхности бактерий. Последние уникальны для каждой бактерии и лежат в основе серотипирования, исторически используемого для идентификации грамотрицательных бактерий. Считается, что бактерии, формирующие гладкие колонии, имеют менее пирогенную O-цепь, состоящую из повторяющихся дисахаридов, при этом ЛПС из бактерии без O-цепи наиболее иммуногенен.

Преимущество использования ЛПС для моделирования ОРДС состоит в относительной доступности и возможности стандартизации экспериментов. Однако стоит помнить, что препараты ЛПС часто содержат загрязняющие вещества, такие как бактериальные липопротеины, которые могут влиять на биологические эффекты ЛПС.

При попадании в организм ЛПС их распознают толл-подобные рецепторы 4-го типа (Toll-like receptor 4, TLR4) на поверхности моноцитов, макрофагов и дендритных клеток. ЛПС-связывающий белок (lipopolysaccharide-binding protein, LBP) и CD14, являющиеся корецепторами при этом взаимодействии, способствуют активации MyD88 и TRIF-зависимых сигнальных путей [4]. Эти каскады реакций приводят к активации транскрипционных факторов NF- κ B / MAPK (mitogen-activated protein kinases) и IRF3 соответственно. В итоге стимулируется продукция провоспалительных цитокинов TNF α , IL6, IL1 β и интерферонов I типа, что опосредует развитие воспаления [4].

Моделирование ОРДС с использованием интратрахеального введения ЛПС на сегодняшний день применяют чаще, чем интраназальное введение, что обусловлено более целенаправленным воздействием на нижние дыхательные пути. Однако такой подход требует использования специального оборудования для

доставки ЛПС в нижние дыхательные пути через нос либо введения препарата через интратрахеальный разрез, что увеличивает время восстановления животного, а также несет риски заражения постоперационной раны. Это может увеличивать как сроки исследований, так и финансовые ресурсы, необходимые для их реализации. При этом есть данные о сравнимых эффектах обоих способов введения. Сравнение интраназального и интратрахеального способов введения ЛПС *Escherichia coli* O55:B5 было проведено на 12 самках мышей C57Bl/6 J исследователями из Канады под руководством Fatemeh Khadangi. Использовали одну дозу ЛПС с выведением животных из эксперимента через 24 ч. Авторы показали, что способ введения не повлиял на выраженность воспалительного процесса, однако при интраназальном введении наблюдалась меньшая вариабельность исследуемых показателей (количество клеток и общего белка в бронхоальвеолярном лаваже, сухой остаток легкого, уровень воспаления по гистологическим препаратам легкого и механические показатели вентиляции) внутри группы [5].

Другими авторами показано, что интратрахеальное введение ЛПС *E. coli* O111:B4 приводит к бронхопневмонии, увеличению количества макрофагов костномозгового происхождения и макрофагов с провоспалительным фенотипом в бронхоальвеолярном лаваже. Развитие локального воспалительного процесса в легких отражалось в высоких уровнях экспрессии провоспалительных цитокинов и низких уровнях экспрессии противовоспалительных цитокинов. На системном уровне отмечали высокий уровень C-реактивного белка в сыворотке крови [6].

Целью данной работы было оценить возможность использования интраназального введения ЛПС крысам Sprague-Dawley (SD) для воспроизведения ОРДС и сравнить изменения в легких крыс после однократного введения ЛПС в дозе 7,5 мг/кг или 15 мг/кг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Интраназальное введение ЛПС

Самцы крыс породы Sprague-Dawley массой 250–280 г были получены из питомника «Столбовая» (Московская область, Россия). Животных содержали при естественном освещении, при температуре 20–22 °C и относительной влажности воздуха 60–70%. Животные имели свободный доступ к питьевой воде и брикетированным кормам (ООО «Лабораторснаб», Россия).

Исследование проводили на 21 животном. ЛПС *E. coli* O111:B4 (Sigma, США) 7,5 мг/кг или 15 мг/кг в объеме 150 мкл вводили интраназально под глубоким инъекционным наркозом (Золетил, Virbac, Франция) опытному животному. Контрольным крысам вводили 150 мкл физиологического раствора (NaCl 0,9%).

Легкие 10 крыс были извлечены через 48 ч после введения NaCl 0,9% (три особи), ЛПС в дозе 7,5 мг/кг массы тела (четыре особи) и ЛПС в дозе 15 мг/кг массы тела (три особи) для определения сухого остатка.

У девяти крыс (те же группы, по три особи в каждой) через 48 ч после введения ЛПС или NaCl 0,9% извлекали правое легкое. Небольшую его часть помещали в Фиксатор РНК («Евроген», Россия) с целью дальнейшего выделения РНК, постановки ОТ и ПЦР для оценки степени локального воспаления. Оставшееся легкое гомогенизировали, фиксировали и окрашивали для определения маркеров макрофагов CD68, CD86 и MHC II

Таблица 1. Ключевые реагенты и материалы, использованные в исследовании

Реагенты, приборы и ресурсы	Производитель	Номер в каталоге
Химические вещества, пептиды и рекомбинантные белки		
ЛПС <i>E.coli</i> O111:B4	Sigma-Aldrich, США	#LPS25
Ключевые коммерческие наборы		
Фиксатор IntactRNA	«Евроген», Россия	#BC031
ELISA Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha (TNFa)	Cloude-Clone, Китай	#SEA133Ra
MMLV RT kit	«Евроген», Россия	# SK021
Magzol	Magen, Китай	#R480101
5x qPCRmixHS SYBR	«Евроген», Россия	#PK147L
Приборы		
DTprime DT96	ДНК-Технология, Россия	NA
ИФА-анализатор Multiskan FC	Thermo Scientific	NA
Проточный цитофлуориметр BD FASC Calibur	Becton, Dickinson and Company, США	
Животные		
Самцы крыс линии Sprague-Dawley	Питомник «Столбовая», Россия	NA
Праймеры 3'-5'		
IL4 For - ATGTAACGACAGCCCTCTGA Rev - AGCACGGAGGTACATCACG	«Евроген», Россия	NA
TNF α For - CCACCACGCTCTTCTGTCTA Rev - GCTACGGGCTTGTCACTCG	«Евроген», Россия	NA
IL1 β For - CTGTCTGACCCATGTGAGCT Rev - ACTCCACTTTGGTCTTGA	«Евроген», Россия	NA
IL10 For - GCCCAGAAATCAAGGAGCAT Rev - TGAGTGCACGTAGGCTTCTA	«Евроген», Россия	NA
Arg-1 For - GGATGAGCATGAGCTCCAAG Rev - GCCAGCTGTTCATTGGCTT	«Евроген», Россия	NA
IL18 For - GACAAAAGAAACCCGCCTG Rev - ACATCCTCCATCCTCACAG	«Евроген», Россия	NA
IL13 For - CCAGAAGACTTCCCTGTGCA Rev - CCCTCAGTGGCCATAGCG	«Евроген», Россия	NA
NOS2 For - CGCTGGTTTGAAACTTCTCAG Rev - GGCAAGCCATGTCTGTGAC	«Евроген», Россия	NA
NF-kb For - AGAGCAACCGAAACAGAGAGG Rev - TTTGCAGGCCCCACATAGTT	«Евроген», Россия	NA
b2m For - CTCGCTCGGTGACCGTGAT Rev - GGACAGATCTGACATCTCGA	«Евроген», Россия	NA
Другое		
Золетил	VIRBAC, Франция	NA
Брикетируемый корм	ООО «Лабораторснаб», сертификат соответствия № РОССТУ. п081.B00113, ГОСТ Р50258-92, Россия	#ПК-120-1
Floriadae [https://floreada.io/]	Онлайн-программа для обчета цитометрических данных [7]	NA

методом проточной цитофлуориметрии. Из хвостовой вены этих же животных отбирали 2–3 мл крови для выделения сыворотки и проведения иммуноферментного анализа с целью исследования концентрации TNFa (Cloude-Clone, #SEA133Ra), а также для оценки общей формулы крови.

Наконец, для определения маркеров макрофагов методом проточной цитофлуориметрии были использованы легкие еще трех интактных животных.

Оценка сухого остатка легкого (Wet/dry ratio)

Для оценки выраженности отека легкие 10 животных извлекали и взвешивали через 48 ч после введения ЛПС или физиологического раствора. Повторное взвешивание проводили через 7 дней высушивания легких при температуре 60 °С. Рассчитывали отношение массы в день забора легкого к массе после высушивания [8].

Выделение РНК, реакция обратной транскрипции и ПЦР

Для определения уровней экспрессии генов про- (TNF α , IL18, IL13, IL1 β) и противовоспалительных (IL10, IL4) цитокинов, генов ферментов, вовлеченных в метаболизм аргинина (NOS2 и Arg1), и гена транскрипционного фактора NF-kb тотальную РНК выделяли из образцов правых легких, помещенных в Фиксатор РНК («Евроген», Россия) с помощью реагента Magzol (Magen, Китай) в соответствии с рекомендациями производителя. Первую цепь кДНК для определения уровня экспрессии генов получали из 1 мкг тотальной РНК с помощью набора MMLV RT kit («Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

ПЦР в реальном времени проводили в объеме 25 мкл, содержащем 400 нг первой цепи кДНК, по 400 нМ прямым и обратным праймерам (последовательности указаны в табл. 1) и 5x qPCRmixHS SYBR («Евроген», Россия). Все реакции проводили в трех повторах в детектирующем амплификаторе DTprime DT96 («ДНК-Технология», Россия) при следующих условиях: предварительная денатурация — 95 °C 5 мин; 40 циклов амплификации, включающих денатурацию — 95 °C 15 с, отжиг — 60 °C 12 с и элонгацию — 72 °C 15 с. Специфичность полученного продукта проверяли с помощью анализа кривой плавления ПЦР-продукта в программе Real Time PCR («ДНК-Технология», Россия). По кривой накопления флуоресцентного сигнала определяли пороговые циклы (Ct) для всех исследуемых генов. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Для нормализации экспрессии каждого гена использовали ген «домашнего хозяйства» бета-2-микроглобулин.

Проточная цитометрия

Оценку содержания панмакрофагального маркера CD68, CD86, характерного для провоспалительных макрофагов, и MHC II, характерного для противовоспалительных макрофагов, проводили методом проточной цитометрии. Для этого легкие 12 животных (интактные животные, животные после введения NaCl 0,9%, и ЛПС в дозе 7,5 мг/кг или 15 мг/кг; по три особи в каждой группе) гомогенизировали механически, затем пропускали через сито с диаметром пор 100 мкм для избавления от оставшихся крупных фрагментов и фиксировали 2%-м параформальдегидом. 106 клеток отбирали для пермеабиллизации реагентом Inside Perm (#130-090-477, Miltenyi, Германия). Окрашивали CD68 FITC (#130-133-301, Miltenyi, Германия) или CD68 PE-Vio 770 (#130-134-152 Miltenyi, Германия), CD86 Vio Bright FITC (#130-109-180 Miltenyi, Германия) и MHC II PE (#205308, Biolegend). Собирали как минимум 50 000 событий на проточном цитометре BD FACS Calibur (CUSA). Оценку относительного количества CD68, CD86 и MHC II положительных клеток проводили в онлайн-программе FlowJo (https://floreada.io/) [7].

Иммуноферментный анализ

Для определения концентрации TNF α в сыворотке крови из хвостовой вены крысы SD под глубоким наркозом отбирали 2 мл крови в пробирки с активатором свертывания. Центрифугирование проводили при 3200 об./мин в течение 20 мин. Далее сыворотку отбирали в новые пробирки и хранили при -20 °C. Исследование проводили с использованием набора ELISA Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) (Cloude-Clone,

Китай, #SEA133Ra) в соответствии с рекомендациями производителя. Оптическую плотность определяли при длине волны 450 нм на ИФА-анализаторе Multiskan FC (Thermo Scientific, CUSA).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили в программе Prism 8.0. При сравнении двух групп использовали критерий Манна-Уитни, при сравнении большего количества групп использовали Ordinary one-way ANOVA. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для графического представления данных использовали боксплоты, включающие медиану и верхние/нижние экстремальные значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценку развития острого повреждения легких в первую очередь проводили по отношению массы интактного легкого к сухому остатку (Wet/dry ratio или W/D), которое является объективным показателем содержания воды в тканях легких и отражает развитие экссудативной фазы ОРДС. Для определения отношения W/D использовали целое легкое. Значимо высокий показатель W/D относительно контрольной группы был определен при введении дозы 15 мг/кг массы тела ($p = 0,0228$, Ordinary one-way Anova) (рис. 1).

На системном уровне интраназальное введение ЛПС в обеих дозировках привело к значимо низкому относительному содержанию лимфоцитов ($p = 0,0019$, Ordinary one-way Anova) и значимо высокому содержанию нейтрофилов ($p = 0,0021$, Ordinary one-way Anova).

После введения ЛПС у опытных крыс в сыворотке крови наблюдали увеличение концентрации провоспалительного цитокина TNF α более чем в 4 раза по сравнению с контрольной группой, однако различия не достигли статистической значимости (рис. 2).

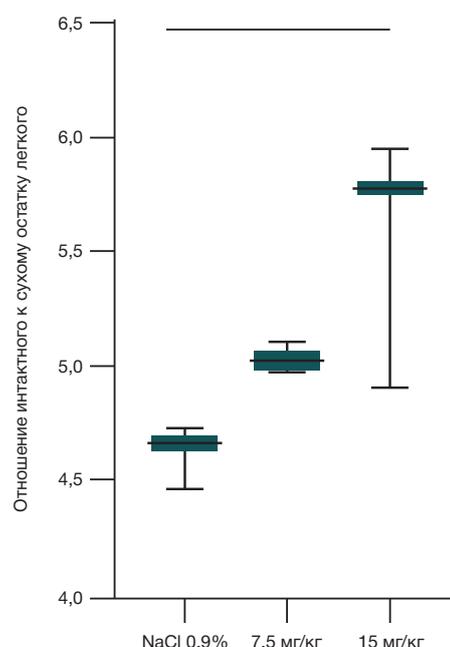


Рис. 1. Результат определения сухого остатка легкого через 48 ч после интраназального введения ЛПС *E. coli* O111:B4. Значимо высокий показатель W/D относительно контрольной группы был определен при введении дозы 15 мг/кг массы тела ($p = 0,0228$, Ordinary one-way Anova)

Известно, что макрофаги определяют исход ОРДС, поэтому на следующем этапе в гомогенатах легких крыс оценивали относительное количество клеток, несущих панмакрофагальный маркер CD68, а также маркеры, описанные для провоспалительных и противовоспалительных макрофагов (CD86 и MHC II соответственно) [9–11]. В легких опытных животных по сравнению с интактными при введении обеих дозировок ЛПС был выявлен значимо высокий уровень CD86-положительных клеток ($p = 0,0014$, Ordinary one-way Anova), а при использовании дозы ЛПС 7,5 мг/кг массы тела — еще и значимо высокий уровень MHC II положительных клеток ($p = 0,0050$, Ordinary one-way Anova) (рис. 3).

Развитие локального воспаления оценивали путем определения уровней экспрессии генов провоспалительных цитокинов TNF α , IL1 β , IL13 и IL18, гена транскрипционного фактора NF-kb, противовоспалительных цитокинов IL10 и IL4, а также генов ферментов, вовлеченных в метаболизм аргинина, NOS2 и Arg1 (рис. 3).

Уровень экспрессии гена *IL10* был значимо повышен у опытных крыс при введении ЛПС в дозе 15 мг/кг массы тела (Ordinary one-way Anova, $p = 0,0024$), а уровень *IL4* — снижен при введении дозы 7,5 мг/кг массы тела (Ordinary one-way Anova, $p = 0,0194$) по сравнению с животными, которым вводили физиологический раствор. Для генов *IL18* и *IL10* значимые различия были выявлены между животными после введения ЛПС в разных дозировках (Ordinary one-way Anova, $p = 0,009$ и $0,0024$ соответственно).

Сравнение степеней изменения уровней экспрессии ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$) при введении двух дозировок ЛПС относительно группы введения физиологического раствора с использованием критерия Манна–Уитни показало значимое повышение уровня экспрессии генов провоспалительного цитокина *IL18* и противовоспалительного цитокина *IL10* при введении дозы 15 мг/кг массы тела (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Моделирование ОРДС для изучения его патогенеза и поиска потенциальной терапии является нетривиальной задачей, что обусловлено в большей степени комплексностью патогенетической картины.

Вне зависимости от причин принято выделять три стадии заболевания: экссудативную, пролиферативную и фибротическую. Экссудативная стадия ОРДС длится 1–7 дней. В это время повреждающие факторы приводят к нарушению аэро-гематического барьера и развитию интра-альвеолярного отека [1]. В большинстве работ оценивают инфильтрацию нейтрофилами межальвеолярных перегородок и развитие интра-альвеолярного отека в легких через 24 ч. Особенностью данной работы является валидирование модели ОРДС через 48 ч. Значимо высокое отношение массы легкого после извлечения из тела животного к его сухому остатку при введении дозы ЛПС *E. coli* O111:B4 15 мкг/кг массы тела говорит о высоком содержании жидкости в ткани легкого, что свидетельствует об экссудативной стадии заболевания.

На системном уровне были отмечены признаки развития воспалительной реакции, о чем говорит значимо низкое относительное содержание лимфоцитов и значимо высокое содержание нейтрофилов. Лимфоциты — клетки адаптивной иммунной системы, помогающие организму противостоять вторжениям патогенных микроорганизмов в том числе через привлечение нейтрофилов в очаги инфекции во время острого воспаления. Под воздействием ЛПС запускается каскад реакций, приводящий к стимулированию костного мозга и высвобождению большого количества нейтрофилов в кровеносную систему [12]. Низкий уровень лимфоцитов может быть следствием перераспределения клеток в очаг воспаления [13]. Похожие изменения были выявлены при секвенировании мононуклеарных клеток крови у людей, больных ОРДС, по сравнению со здоровыми донорами. Были отмечены низкие уровни основных представителей лимфоцитов: В-клеток и CD4-Т-клеток [14].

Характерной особенностью ОРДС является феномен, получивший название «цитокиновый шторм», который характеризуется высокой концентрацией провоспалительных цитокинов (TNF α , IFN γ , IL6 IL1 β) в крови. Показано участие TNF α в развитии лихорадки, усилении системного воспаления, активации антимикробных реакций и повышении секреции других провоспалительных цитокинов (например, IL6).

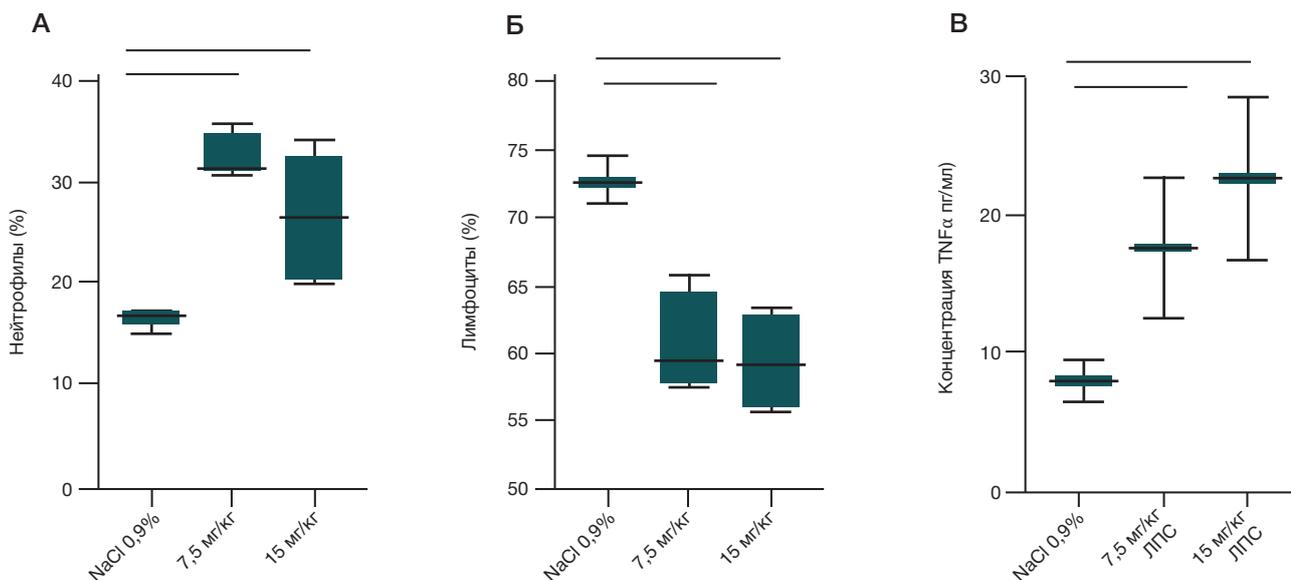


Рис. 2. Изменения общей формулы крови через 48 ч после интраназального введения ЛПС (А) и концентрации TNF α в сыворотке крови (Б). **А.** Относительное содержание лимфоцитов снижено по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0019$, Ordinary one-way Anova), а нейтрофилов повышено при обеих дозах введения ($p = 0,0021$, Ordinary one-way Anova). **Б.** По сравнению с контрольной группой после введения ЛПС в сыворотке крови наблюдалось увеличение концентрации провоспалительного цитокина TNF α более чем в 4 раза, однако различия не достигли статистической значимости

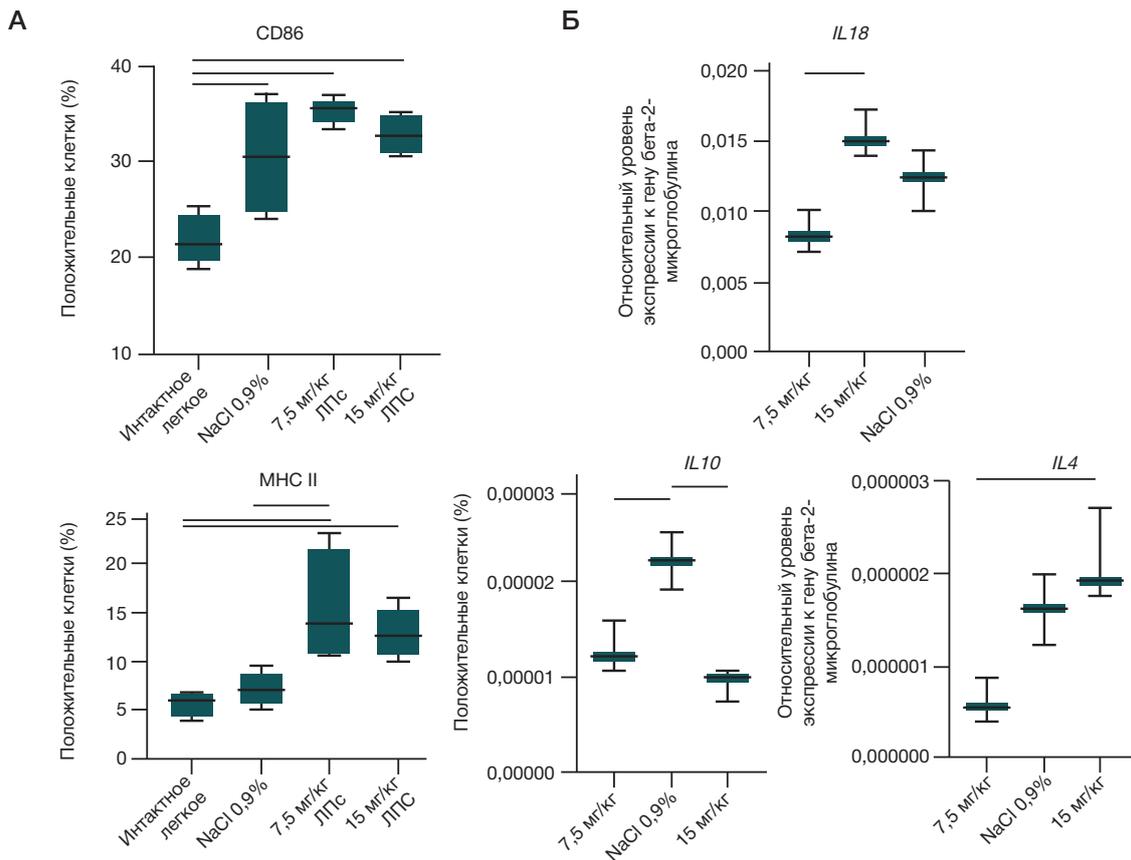


Рис. 3. Изменения в ткани легких через 48 ч после интраназального введения ЛПС. **А.** Содержание клеток, несущих маркер провоспалительных макрофагов CD86 увеличено во всех группах относительно интактного легкого ($p = 0,0014$, Ordinary one-way Anova). Количество клеток, несущих маркер противовоспалительных макрофагов MHC II ($p = 0,0050$, Ordinary one-way Anova), значительно повышено относительно интактного легкого после интраназального введения ЛПС в двух дозах. Относительно группы введения физиологического раствора повышено содержание MHC II положительных клеток после введения ЛПС в дозе 7,5 мг/кг массы тела. **Б.** При введении дозы ЛПС 15 мг/кг массы тела значительно повышался уровень экспрессии гена *IL10* (Ordinary one-way Anova, $p = 0,0024$) относительно введения физиологического раствора (группа NaCl 0,9%). Уровень экспрессии гена *IL4* (Ordinary one-way Anova, $p = 0,0194$) при введении дозы 7,5 мг/кг массы тела снижался. Для генов *IL18* и *IL10* значимо высокие уровни экспрессии были выявлены при введении дозы ЛПС 15 мг/кг массы тела (Ordinary one-way Anova, p (*IL18*) = 0,009, p (*IL10*) = 0,0024)

TNF α активирует транскрипционный фактор NF-kB, который стимулирует множество генов, участвующих в воспалительной реакции [15].

Легкие — барьерный орган с мощно развитой системой защиты от микроорганизмов. Первыми клетками, отвечающими на вторжение из вне, являются макрофаги. В легких выделяют два типа макрофагов: населяющие альвеолы альвеолярные макрофаги и располагающиеся в интерстициальном пространстве интерстициальные макрофаги [16]. Фенотип первых описывают как противовоспалительный с высокой экспрессией IL10 и TGF β [17]. Интерстициальные макрофаги на сегодняшний день активно изучаемая популяция клеток [16]. Макрофаги, рекрутируемые из моноцитов крови, имеют фенотип, близкий к провоспалительному, и экспрессируют в значительных количествах костимулирующие молекулы CD86, необходимые для адекватной антигенной передачи сигнала, в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости первого типа (MHC I) [9]. Исход заболевания зависит от баланса двух состояний альвеолярных макрофагов. При этом показано, что в случае вирусного заболевания из них формируется популяция клеток памяти MHC IIhi [18, 19]. В экссудативной фазе провоспалительные макрофаги преобладают над противовоспалительными клетками. Активация распознающих паттерн рецепторов макрофагов приводит к формированию инфламмосомы, в которой каспаза-1 способствует созреванию IL1 и IL18. Прогрессирование заболевания может быть тяжелым,

если процесс созревания инфламмосомы нарушается. В пролиферативной фазе ОРДС провоспалительные макрофаги сменяются противовоспалительными макрофагами, которые удаляют клеточные остатки и выделяют противовоспалительные цитокины. Было показано, что дефектный эффероцитоз может приводить к затяжному воспалению, наблюдаемому при ОРДС; кроме того, избыточное участие противовоспалительных макрофагов в процессах реорганизации матрикса на этой стадии может привести к хроническому фиброзу и окклюзии кровеносных сосудов [20]. Таким образом, выявленное нами повышение количества CD86 и MHC II положительных клеток позволяет предположить, что через 48 ч после интраназального введения ЛПС макрофаги легкого находятся в переходном состоянии от провоспалительного к противовоспалительному [18].

На геномном уровне было отмечено, что интраназальное введение ЛПС в дозе 15 мг/кг массы тела приводит к изменению уровней экспрессии генов как про- так и противовоспалительных цитокинов (IL18 и IL10 соответственно). При этом использование более высокой дозы значительно активировало противовоспалительный иммунный ответ, о чем свидетельствует высокий уровень экспрессии гена IL10 [21]. В патогенезе ОРДС IL10 играет неоднозначную роль: он может как способствовать разрешению заболевания путем ингибирования секреции провоспалительных цитокинов, таких как TNF α , IL1 β , IL6 и IFN γ , так и осложнять его путем снижения

Таблица 2. Изменение уровня экспрессии изучаемых генов в легких крыс после введения ЛПС в двух дозировках относительно контрольной группы

$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ относительно группы NaCl 0,9% при введении дозы 7,5 мг/кг	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ относительно группы NaCl 0,9% при введении дозы 15 мг/кг	P value, тест Манна-Уитни (сравнение двух доз)
Гены провоспалительных цитокинов и транскрипционного фактора		
<i>TNFα</i>		
0,58 (\pm 0,66)	0,77 (\pm 0,14)	0,7
<i>IL18</i>		
0,69 (\pm 0,12)	1,25 (\pm 0,13)	0,05
<i>IL13</i>		
1,11 (\pm 0,1)	1,09 (\pm 0,62)	0,35
<i>IL1β</i>		
0,34 (\pm 0,32)	0,79 (\pm 0,21)	0,1
<i>NF-kb</i>		
0,73 (\pm 0,14)	1,11 (\pm 0,26)	0,1
Гены противовоспалительных цитокинов		
<i>IL10</i>		
1,41 (\pm 0,31)	2,44 (\pm 0,34)	0,05
<i>IL4</i>		
0,9 (\pm 0,11)	0,51 (\pm 0,47)	0,35
Гены ферментов, вовлеченных в метаболизм аргинина		
<i>NOS2</i>		
2,19 (\pm 1,00)	1,19 (\pm 0,26)	0,1
<i>Arg1</i>		
0,64 (\pm 0,44)	1,05 (\pm 0,3)	0,2

дифференцировки стволовых клеток в альвеолоциты II типа, таким образом препятствуя восстановлению легких [22]. Высокий уровень экспрессии IL10 потенциально может указывать на поляризацию макрофагов в противовоспалительный фенотип, что согласуется с высоким уровнем МНС II положительных клеток по результатам проточной цитометрии [17].

Провоспалительный цитокин IL18, который был впервые описан как фактор, индуцирующий интерферон IFN γ через воздействие на клетки как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа, участвует в защите от инфекционных агентов и в противоопухолевом иммунитете. Активация паттерн-распознающих рецепторов врожденного иммунитета (PRR) в легких приводит к активации транскрипционного фактора NF-kb в эпителиальных и эндотелиальных клетках, а также в резидентных иммунных клетках. NF-kb в свою очередь способствует увеличению про-IL1 β , про-IL18 и прокаспазы-1, зрелые формы которых формируются в инфламмосомах и запускают порочный круг развития воспаления. IL18 является мощным хемоаттрактантом для нейтрофилов, увеличенное количество которых в легких является важнейшим признаком острой фазы ОРДС; это согласуется с полученными нами данными о

высоком уровне экспрессии гена IL18 после введения дозы ЛПС 15 мг/кг массы тела, а также о высоком содержании нейтрофилов в крови.

Выводы

Интраназальное введение крысам ЛПС внешней стенки грамотрицательных бактерий через 48 ч приводит к развитию процессов, характерных для экссудативной и пролиферативной фаз ОРДС: отек легких, снижение количества лимфоцитов и повышение количества нейтрофилов в крови, а также повышение концентрации TNF α в сыворотке крови. Введение ЛПС в дозе 15 мг/кг приводит к быстрому развитию воспалительных процессов в легких, и уже через 48 ч в значительной мере прослеживается активация противовоспалительных реакций. Таким образом, использование интраназального введения ЛПС O111:B4 в дозе 15 мг/кг массы тела крысам породы Sprague-Dawley может быть использовано с целью моделирования ОРДС для оценки эффективности лекарственной терапии, в том числе клеточной, по таким показателям как сухой остаток легкого, содержание CD86 и МНС II положительных клеток в гомогенатах легких и уровни экспрессии генов IL10 и IL18.

Литература

- Bos LDJ, Ware LB. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. *The Lancet*. 2022; 400: 1145–56.
- Aeffner F, Bolon B, Davis IC. Mouse Models of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Toxicol Pathol*. 2015; 43: 1074–92.
- Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008; 295: L379–99.
- Soloveva T, Davydova V, Krasikova I, Yermak I. *Marine Compounds*

- with Therapeutic Potential in Gram-Negative Sepsis. *Mar Drugs*. 2013; 11: 2216–29.
5. Khadangi F, Forgues A-S, Tremblay-Pitre S, Dufour-Mailhot A, Henry C, Boucher M, et al. Intranasal versus intratracheal exposure to lipopolysaccharides in a murine model of acute respiratory distress syndrome. *Sci Rep*. 2021; 11: 7777.
 6. Kosyreva AM, Miroshnichenko EA, Tsvetkov IS, Lokhonina AV, Sentyabreva AV, Dzhaililova DSh, et al. Morphofunctional Characteristics of Lung Macrophages in Rats with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Bull Exp Biol Med*. 2023; 175: 822–7.
 7. Онлайн-программа для обсчета цитометрических данных. Доступно по ссылке: <https://floreada.io/>.
 8. Parker JC, Townsley MI. Evaluation of lung injury in rats and mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004; 286: L231–46.
 9. Vishnyakova P, Poltavets A, Karpulevich E, Maznina A, Vtorushina V, Mikhaleva L, et al. The response of two polar monocyte subsets to inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021; 139: 111614.
 10. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*. 2017; 97: 4–13.
 11. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014;41:14–20.
 12. Qazi MR, Bogdanska J, Butenhoff JL, Nelson BD, DePierre JW, Abedi-Valugerdi M. High-dose, short-term exposure of mice to perfluorooctanesulfonate (PFOS) or perfluorooctanoate (PFOA) affects the number of circulating neutrophils differently, but enhances the inflammatory responses of macrophages to lipopolysaccharide (LPS) in a similar fashion. *Toxicology*. 2009; 262: 207–14.
 13. Chakraborty S, Zawieja SD, Wang W, Lee Y, Wang YJ, von der Weid P-Y, et al. Lipopolysaccharide modulates neutrophil recruitment and macrophage polarization on lymphatic vessels and impairs lymphatic function in rat mesentery. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2015; 309: H2042–57.
 14. Torres M, Casado G, Vigón L, Rodríguez-Mora S, Mateos E, Ramos-Martín F, et al. Changes in the immune response against SARS-CoV-2 in individuals with severe COVID-19 treated with high dose of vitamin D. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022; 150: 112965.
 15. Riyaz Tramboos S, Elkhalfi AME, Quibtiya S, Ali SI, Nazir Shah N, Taifa S, et al. The critical impacts of cytokine storms in respiratory disorders. *Heliyon*. 2024; 10: e29769.
 16. Hou F, Xiao K, Tang L, Xie L. Diversity of Macrophages in Lung Homeostasis and Diseases. *Front Immunol*. 2021; 12.
 17. Fakoya AO, Naeem A, Louisdon P, Histology. *Alveolar Macrophages*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513313/#:~:text=Alveolar%20macrophages%20produce%20anti%2Dinflammatory,processes%20and%20promote%20tissue%20repair>.
 18. Morrell ED, Bhatraju PK, Mikacenic CR, Radella F, Manicone AM, Stapleton RD, et al. Alveolar Macrophage Transcriptional Programs Are Associated with Outcomes in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200: 732–41.
 19. Yao Y, Jeyanathan M, Haddadi S, Barra NG, Vaseghi-Shanjani M, Damjanovic D, et al. Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell*. 2018; 175: 1634–50.e17.
 20. Mahida RY, Scott A, Parekh D, Lugg ST, Hardy RS, Lavery GG, et al. Acute respiratory distress syndrome is associated with impaired alveolar macrophage efferocytosis. *European Respiratory Journal*. 2021; 58: 2100829.
 21. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*. 2008; 180: 5771–7.
 22. Sun Z, Chen A, Fang H, Sun D, Huang M, Cheng E, et al. B cell-derived IL-10 promotes the resolution of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Cell Death Dis*. 2023; 14: 418.

References

1. Bos LDJ, Ware LB. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes. *The Lancet*. 2022; 400: 1145–56.
2. Aeffner F, Bolon B, Davis IC. Mouse Models of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Toxicol Pathol*. 2015; 43: 1074–92.
3. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008; 295: L379–99.
4. Soloveva T, Davydova V, Krasikova I, Yermak I. Marine Compounds with Therapeutic Potential in Gram-Negative Sepsis. *Mar Drugs*. 2013; 11: 2216–29.
5. Khadangi F, Forgues A-S, Tremblay-Pitre S, Dufour-Mailhot A, Henry C, Boucher M, et al. Intranasal versus intratracheal exposure to lipopolysaccharides in a murine model of acute respiratory distress syndrome. *Sci Rep*. 2021; 11: 7777.
6. Kosyreva AM, Miroshnichenko EA, Tsvetkov IS, Lokhonina AV, Sentyabreva AV, Dzhaililova DSh, et al. Morphofunctional Characteristics of Lung Macrophages in Rats with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Bull Exp Biol Med*. 2023; 175: 822–7.
7. Available from: <https://floreada.io/>.
8. Parker JC, Townsley MI. Evaluation of lung injury in rats and mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004; 286: L231–46.
9. Vishnyakova P, Poltavets A, Karpulevich E, Maznina A, Vtorushina V, Mikhaleva L, et al. The response of two polar monocyte subsets to inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021; 139: 111614.
10. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*. 2017; 97: 4–13.
11. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014;41:14–20.
12. Qazi MR, Bogdanska J, Butenhoff JL, Nelson BD, DePierre JW, Abedi-Valugerdi M. High-dose, short-term exposure of mice to perfluorooctanesulfonate (PFOS) or perfluorooctanoate (PFOA) affects the number of circulating neutrophils differently, but enhances the inflammatory responses of macrophages to lipopolysaccharide (LPS) in a similar fashion. *Toxicology*. 2009; 262: 207–14.
13. Chakraborty S, Zawieja SD, Wang W, Lee Y, Wang YJ, von der Weid P-Y, et al. Lipopolysaccharide modulates neutrophil recruitment and macrophage polarization on lymphatic vessels and impairs lymphatic function in rat mesentery. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2015; 309: H2042–57.
14. Torres M, Casado G, Vigón L, Rodríguez-Mora S, Mateos E, Ramos-Martín F, et al. Changes in the immune response against SARS-CoV-2 in individuals with severe COVID-19 treated with high dose of vitamin D. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022; 150: 112965.
15. Riyaz Tramboos S, Elkhalfi AME, Quibtiya S, Ali SI, Nazir Shah N, Taifa S, et al. The critical impacts of cytokine storms in respiratory disorders. *Heliyon*. 2024; 10: e29769.
16. Hou F, Xiao K, Tang L, Xie L. Diversity of Macrophages in Lung Homeostasis and Diseases. *Front Immunol*. 2021; 12.
17. Fakoya AO, Naeem A, Louisdon P, Histology. *Alveolar Macrophages*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513313/#:~:text=Alveolar%20macrophages%20produce%20anti%2Dinflammatory,processes%20and%20promote%20tissue%20repair>.
18. Morrell ED, Bhatraju PK, Mikacenic CR, Radella F, Manicone AM, Stapleton RD, et al. Alveolar Macrophage Transcriptional Programs Are Associated with Outcomes in Acute Respiratory

- Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019; 200: 732–41.
19. Yao Y, Jeyanathan M, Haddadi S, Barra NG, Vaseghi-Shanjani M, Damjanovic D, et al. Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell.* 2018; 175: 1634–50.e17.
20. Mahida RY, Scott A, Parekh D, Lugg ST, Hardy RS, Lavery GG, et al. Acute respiratory distress syndrome is associated with impaired alveolar macrophage efferocytosis. *European Respiratory Journal.* 2021; 58: 2100829.
21. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology.* 2008; 180: 5771–7.
22. Sun Z, Chen A, Fang H, Sun D, Huang M, Cheng E, et al. B cell-derived IL-10 promotes the resolution of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Cell Death Dis.* 2023; 14: 418.

НЕОНАТАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ В СЕВЕРНОЙ ОСЕТИИ ЗА 2023–2024 ГГ.

Р. А. Зинченко¹✉, И. С. Тебиева^{2,3}, Е. Ю. Захарова¹, О. А. Щагина¹, Е. Е. Лотник¹, Ю. В. Габисова³, А. В. Хохова^{2,3}, Н. В. Бакин¹, А. В. Марахонов¹

¹ Медико-генетический научный центр имени Н. П. Бочкова, Москва, Россия

² Северо-Осетинская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения России, Владикавказ, Россия

³ Республиканская детская клиническая больница, Владикавказ, Россия

Массовое обследование новорожденных в Российской Федерации на 36 наследственных заболеваний позволит снизить детскую инвалидность и смертность от наследственной патологии и выявить общероссийские и региональные популяционно-генетические особенности скринируемой патологии. Целью исследования было оценить результаты неонатального скрининга (НС), включая расширенный неонатальный скрининг (РНС) в Республике Северная Осетия-Алания (РСО-Алания) в период с 01.01.2023 по 31.12.2024, и изучить клинические и популяционно-генетические особенности скринируемых заболеваний в регионе. На I этапе обследования у 14 994 новорожденных проведены биохимические исследования, тандемная масс-спектрометрия, ДНК-диагностика и определение уровня TREC/KREC. В 355 случаях (2,36%) выявлены позитивные значения. На II этапе в 324 (91,2%) случаях проведена необходимая лабораторная и последующая подтверждающая ДНК-диагностика: повторный анализ в МС/МС и ДНК-диагностика (для наследственных болезней обмена веществ), иммунофенотипирование (для первичных иммунодефицитных состояний). В ходе двухлетнего исследования поставлено 37 диагнозов, что составляет 0,25% от всех детей, охваченных скринингом на I этапе, и однозначно свидетельствует об успешности и результативности данной программы. Удалось верифицировать специфический спектр мутаций, характерных для фенилкетонурии (ФКУ) и недостаточности ацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот со средней длиной углеродной цепи (MCADD). Определена частота встречаемости патологии, исследуемой в рамках неонатального скрининга. Частота всех форм ФКУ составила 1 : 1153 новорожденных, а частота MCADD — 1 : 789 обследованных новорожденных. Все дети состоят на диспансерном учете в медико-генетической консультации РСО-Алания, получают лечение в соответствии с клиническими рекомендациями.

Ключевые слова: неонатальный скрининг, расширенный неонатальный скрининг, наследственная патология, фенилкетонурия, недостаточность ацил-КоА-дегидрогеназы, жирные кислоты со средней длиной углеродной цепи

Финансирование: исследование выполнено из средств федерального и регионального бюджетов в части реализации расширенного неонатального скрининга, а также при финансовой поддержке Государственного задания ФГБНУ «МГНЦ» Минобрнауки России и Минздрава РСО-Алания.

Вклад авторов: И. С. Тебиева, Ю. В. Габисова, А. В. Хохова — сбор данных, постановка диагноза; Р. А. Зинченко, И. С. Тебиева — планирование исследования, написание текста; Е. Ю. Захарова, О. А. Щагина, Е. Е. Лотник, Н. В. Бакин, А. В. Марахонов — проведение молекулярно-генетических исследований; Р. А. Зинченко, И. С. Тебиева, Е. Ю. Захарова — редактирование текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ Медико-генетический научный центр имени Н. П. Бочкова (протокол № 7 от 20 декабря 2017 г.), соответствует стандартам добросовестной клинической практики и доказательной медицины. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в его проведении.

✉ **Для корреспонденции:** Рена Абульфазовна Зинченко
ул. Москворечье, д. 1, 115522, г. Москва, Россия; renazinchenko@mail.ru

Статья получена: 22.04.2025 **Статья принята к печати:** 19.05.2025 **Опубликована онлайн:** 30.05.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.029

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

NEWBORN SCREENING IN NORTH OSSETIA IN 2023–2024

Zinchenko RA¹✉, Tebieva IS^{2,3}, Zakharova EYu¹, Shchagina OA¹, Lotnik EE¹, Gabisova YuV³, Khokhova AV^{2,3}, Bakin NV¹, Marakhonov AV¹

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

² North-Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Russia

³ Republican Children's Clinical Hospital, Vladikavkaz, Russia

Mass screening of newborns for 36 hereditary diseases in the Russian Federation will enable the reduction of childhood disability and mortality from hereditary disorders, as well as the identification of all-Russian and regional population-genetic features of the screened disorders. The study aimed to assess the results of newborn screening (NBS), including expanded newborn screening (ENBS), in the Republic of North Ossetia-Alania obtained between January 1, 2023, and December 31, 2024, as well as to study clinical and population-genetic characteristics of the diseases screened in the region. In phase I of assessment, biochemical testing, tandem mass spectrometry, and DNA diagnostics were performed, and the TREC/KREC levels were determined in 14,994 newborns. In 355 cases (2.36%), positive values were revealed. In phase II, the necessary laboratory and subsequent confirmatory DNA diagnostics were carried out in 324 cases (91.2%): repeated analysis by MS/MS and DNA diagnostics (for hereditary metabolic diseases), immunophenotyping (for primary immunodeficiency states). During the 2-year study, a total of 37 diagnoses were established, which accounted for 0.25% of all children screened in phase I and clearly indicated the program's success and effectiveness. We managed to verify the specific spectrum of mutations characteristic of phenylketonuria (PKU) and medium-chain fatty acid acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD). The frequency of the disorder assessed within the framework of newborn screening was determined. The frequency of all PKU forms was 1 : 1153 newborns, and the frequency of MCADD was 1 : 789 newborns surveyed. All children are listed in the medical genetic consultation of the Republic of North Ossetia-Alania; they receive treatment in accordance with the clinical guidelines.

Keywords: newborn screening, expanded newborn screening, hereditary pathology, phenylketonuria, medium-chain fatty acid acyl-CoA dehydrogenase deficiency

Funding: the study was funded by the federal and regional budgets in terms of implementing expanded newborn screening and supported as part of the State Assignment of the Research Centre for Medical Genetics and the Ministry of Health of the Republic of North Ossetia-Alania.

Author contribution: Tebieva IS, Gabisova YuV, Khokhova AV — data acquisition, establishing the diagnosis; Zinchenko RA, Tebieva IS — study planning, manuscript writing; Zakharova EYu, Shchagina OA, Lotnik EE, Bakin NV, Marakhonov AV — molecular genetic testing; Zinchenko RA, Tebieva IS, Zakharova EYu — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Centre for Medical Genetics (protocol No. 7 dated 20 December 2017), it was compliant with the standards of Good Clinical Practice and evidence-based medicine. All patients submitted informed consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Rena A. Zinchenko
Moskvorchie, 1, 115522, Moscow, Russia; renazinchenko@mail.ru

Received: 22.04.2025 **Accepted:** 19.05.2025 **Published online:** 30.05.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.029

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Неонатальный скрининг на протяжении десятилетий доказывает свою эффективность в выявлении врожденных и наследственных заболеваний (ВНЗ) на раннем доклиническом этапе. 1 января 2023 г. в Российской Федерации (РФ) было положено начало массового обследования новорожденных. В настоящее время оно разделено на неонатальный скрининг (НС) и расширенный неонатальный скрининг (РНС). В регионах НС проводят для выявления пяти ВНЗ: фенилкетонурии, врожденного гипотиреоза, муковисцидоза, галактоземии, врожденной дисфункции коры надпочечников (ФКУ, ВГ, МВ, ГАЛ, ВДКН соответственно). РНС осуществляется на базе 10 межрегиональных центров РНС ЗА уровня для диагностики 29 наследственных болезней обмена (НБО), спинальной мышечной атрофии (СМА) и тяжелых Т- и В-клеточных первичных иммунодефицитов (ПИД) [1].

Постановлением Правительства Республики Северная Осетия — Алания (РСО-Алания) утверждена региональная программа реализации НС и РНС, разработаны нормативные документы, регламентирующие данное исследование, определены лица, ответственные за проведение всех этапов скрининга, и организована маршрутизация пациентов в рамках существующей инфраструктуры.

Цель данной работы — оценить результаты НС и РНС в РСО-Алания в период с 01.01.2023 по 31.12.2024, выявить клинические и популяционно-генетические особенности скринируемых заболеваний.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

На I этапе скрининга забор капиллярной крови из пятки новорожденного осуществляют на вторые сутки жизни у доношенных и на седьмые сутки для недоношенных детей на два тест-бланка: один — с пятью пятнами крови для НС, второй — с тремя пятнами крови для РНС. Направление с сопроводительной информацией формируют с использованием модуля — Вертикально-интегрированная медицинская информационная система «Акушерство и Неонатология» (ВИМИС АКИНЕО). Данные о детях из группы риска в течение суток передают ответственным за организацию РНС в субъекте. В последующие 48 ч у детей из группы риска организуют повторный забор биоматериала и его направление для подтверждающей диагностики в референсный центр ЗБ уровня — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени Н. П. Бочкова» (МГНЦ), где устанавливают точный диагноз ВНЗ или его исключают [2].

Первичное обследование детей, родившихся на территории РСО-Алания, в рамках НС проводят на базе Медико-генетической консультации (МГК) РДКБ МЗ РСО-Алания. Определение уровней биохимических маркеров в образцах цельной крови осуществляется методом иммунофлюоресценции с разрешением по времени с использованием реактивов «DELFLIA Neonatal» (Финляндия) и «FABP» (Россия) на оборудовании «Wallak» (Финляндия). Уровень флюоресценции измеряют на приборе «Виктор-2» (Wallak, Финляндия). Результаты измерений поступают в компьютерную программу для обработки и получения данных. Для установления диагноза значения биохимических маркеров должны быть следующими: фенилаланин (ФА) > 2 мг% — для диагностики ФКУ; тиреотропный гормон (ТТГ) > 20 мкМЕ/л — для ВГ, иммунореактивный трипсин (ИРТ) > 70 нг/мл — для МВ, 17-оксипрогестерон (17-ОПГ) > 30 нмоль/л — для доношенных и > 60 нмоль/л — для недоношенных

для ВГКН, галактоза > 400 нмоль/л (7 мкмоль/л) — для ГАЛ.

Первичное обследование в рамках РНС осуществляют на базе МГК ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С. В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края (МГК ГБУЗ «НИИ — ККБ № 1»): на НБО (в том числе и ФКУ) — методом tandemной масс-спектрометрии (МС/МС); на СМА и ПИД — путем проведения исследования на качественное выявление гомозиготной делеции экзона 7 гена SMN1 и количественное определение ДНК TREK, KREK — тест-системой Неоскрин SMA/TREK/KREK («ДНК-Технология ТС», Россия).

На II этапе обследования в МГНЦ должны быть предоставлены необходимые образцы биоматериала:

- для НБО — сухие пятна крови на тест-бланке, жидкая кровь в пробирке с ЭДТА (незамороженная, не менее 2,5 мл) и моча (не менее 5 мл);
- для СМА — сухие пятна крови на тест-бланке, жидкая кровь в пробирке с ЭДТА (незамороженная, не менее 2,5 мл);
- для ПИД на I этапе — сухие пятна крови на тест-бланке, на II этапе — жидкая кровь в пробирке с ЭДТА (незамороженная, две пробирки) для иммунофенотипирования и ДНК-диагностики.

Подтверждающую диагностику осуществляют с помощью повторного анализа аминокислот и ацилкарнитинов методом МС/МС, определения уровня органических кислот мочи — методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) и проведением ДНК-диагностики. На втором этапе обследования на ПИД проводят иммунофенотипирование (ИФТ) на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева Министерства здравоохранения Российской Федерации (НМИЦ ДГОИ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В течение исследуемого периода в республике родилось 15 153 ребенка. Подлежало обследованию с учетом умерших до сроков забора 15 059. Родители 65 новорожденных подписали информированный отказ от скрининга, и забор крови осуществлен у 14 994 детей. Обследованием было охвачено 99,56% новорожденных.

Во всех 14 994 случаях на I этапе проведена tandemная масс-спектрометрия, из них в 355 случаях (2,36%) результаты скрининга оказались положительными.

Как в регионе с высоким этнокультурным разнообразием и тесными связями с кавказскими и закавказскими территориями в республике традиционно рождается большое количество детей, переезжающих затем в другие регионы РФ (Чеченская Республика, Республика Ингушетия, Ставропольский край и др.) и за ее пределы (Южная Осетия, Грузия, Армения и т. д.). В связи с этим в 31 (8,8%) случае информация о результатах обследования в рамках РНС была передана ответственным лицам по реализации скрининга в соседние субъекты РФ. С учетом этого на II этапе обследовано 324 из 355 новорожденных, что составило 91,2%.

Исследование на аминокислотопатии

В связи с тем что обследование на ФКУ проводили в рамках НС биохимическим методом и в рамках РНС методом МС/МС, у нас появилась возможность сравнить

Таблица 1. Биохимические и молекулярно-генетические характеристики пациентов с ФКУ

№	Уровень ФА на I этапе мг%/мкМ/л*	Phe/Tyr**	СПЛП	Национальность	Аллель 1 (RefSeq NM_000277.3)	Аллель 2 (RefSeq NM_000277.3)
1	1,77/142	2,35	–	осетины	c.529G>A (p.Val177Met)	c.119C>T (p.Ser40Leu)
2	0,28/131	2,1	–	осетины	c.842C>T (p.Pro281Leu)	c.529G>A (p.Val177Met)
3	3,74/273	2,48	–	осетины	c.631C>A (p.Pro211Thr)	c.631C>A (p.Pro211Thr)
4	1,98/149	1,78	–	осетины	c.529G>A (p.Val177Met)	c.842C>T (p.Pro281Leu)
5	6,77/405	9,05	+	осетины	c.1222C>T (p.Arg408Trp)	c.1222C>T (p.Arg408Trp)
6	2,3/145	2,31	–	осетины	c.529G>A (p.Val177Met)	c.1222C>T (p.Arg408Trp)
7	4,79/321	3,66	–	осетины	c.842C>T (p.Pro281Leu)	c.722G>A (p.Arg241His)
8	2,4/140	2,2	–	армяне	c.1208C>T (p.Ala403Val)	c.506G>A (p.Arg169His)
9	38/550	8,8	+	осетины	c.842C>T (p.Pro281Leu)	c.1222C>T (p.Arg408Trp)
10	1,9/143	1,98	–	осетины	c.533A>T (p.Glu178Gly)	c.490A>G (p.Ile164Val)
11	2,73/286	4,46	–	грузинка/осетин	c.842C>T (p.Pro281Leu)	c.631C>A (p.Pro211Thr)
12	***/240	2,9	–	осетины	c.898G>T (p.Ala300Ser)	c.631C>A (p.Pro211Thr)
13	***/141	2,15	–	осетины	c.842C>T (p.Pro281Leu)	c.529G>A (p.Val177Met)

Примечания: * — нормы ФА в рамках НС — 0–2 мг%, в рамках РНС — 0–120 мкМ/л; ** — нормы соотношения Phe/Tyr 0,25–6,5; *** — не обследован на ФКУ в МГК РДКБ РСО-Алания в связи с отсутствием реактивов.

данные проводимых исследований и сделать вывод о большей информативности МС/МС для выявления ФКУ.

По данным ДНК-диагностики выявлены изменения в нуклеотидной последовательности гена *PAH*, характерные для ФКУ, в гомо- или компаунд-гетерозиготном состоянии у 13 пациентов. Частота встречаемости ФКУ по результатам тандемной масс-спектрометрии составила 1 : 1165 родившихся и 1 : 1153 обследованных новорожденных (95%-й ДИ: 1 : 675 – 1 : 2166). Все дети состоят на «Д»-учете у врача-диетолога МГК. Определение уровня ФА в динамике и определение тактики лечения осуществляют в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями. Только двое из них нуждаются в специализированных продуктах лечебного питания (СПЛП), у остальных пациентов показатели ФА не превышают 6 мг% (360 мкМ/л) [3].

Биохимические и молекулярно-генетические характеристики выявленных пациентов представлены в табл. 1.

Наиболее распространенной оказалась «тяжелая» мутация c.842C>T (p.Pro281Leu), при которой остаточная активность фермента *PAH* составляет 2%, количество гетерозиготных аллелей — 6, гомозиготных — 0. Среди общей выборки частота встречаемости — 23%, среди представителей осетинской национальности — 27%.

Вторым по частоте генетическим вариантом был c.529G>A (p.Val177Met), данных по активности *PAH* в литературе не представлено, частота гетерозиготного носительства — 5, что составило 19% в общей выборке и 22% среди титульной нации.

На третьем месте оказались два варианта: «тяжелая» мутация c.1222C>T (p.Arg408Trp) (остаточная активность *PAH* — 2%) и «мягкая» c.631C>A (p.Pro211Thr) (остаточная активность *PAH* — 72%): по одному гомозиготному случаю и по два гетерозиготных носительства. На их долю пришлось по 15% от общей выборки и по 18% среди осетин.

Остальные варианты встречаются в единичных гетерозиготных вариантах и демонстрируют высокую остаточную активность белка *PAH*. Пациенты не нуждаются в диетотерапии, в связи с чем мутации могут быть классифицированы как «мягкие» [4,5]. Так из 13 пациентов только двое (15,3%), имеющие генотипы с двумя тяжелыми мутациями (R408W/R408W и P281L/R408W), нуждаются в диетотерапии.

Нарушения митохондриального β-окисления жирных кислот

По результатам данных МС/МС и ДНК-диагностики 19 пациентам установлен диагноз из группы наследственных нарушений митохондриального β-окисления жирных кислот (НОЖК): недостаточность ацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот со средней длиной углеродной цепи (MCADD).

Частота встречаемости данной патологии в РСО-Алания составила 1:789 (95%-й ДИ: 1 : 506 – 1 : 1310). Данные МС/МС и молекулярно-генетические характеристики пациентов с MCADD представлены в табл. 2.

У 20 новорожденных на II этапе диагностики выявлены значения ацилкарнитинов, превышающие референсные, однако в случае 18 выявлена одна гетерозиготная мутация c.985A>G (p.Lys329Glu), в отношении данной семьи запланировано проведение полного секвенирования генома в формате «трио», и в дальнейшем обсуждении этот случай не учитывается.

Из 19 пациентов с двумя верифицированными мутациями 16 являются осетинами и родились не в близкородственных браках. Пациенты 15 и 16 — монозиготные близнецы, родители по национальности — русские. Пациент 12 рожден в межэтническом браке между осетином и табасаранкой.

Вариант c.388-19T>A представлен в пяти случаях в гомозиготном состоянии. Также было выявлено 11 компаунд-гетерозиготных носителей, что составило 55,26% в общей выборке и около 65,62% среди представителей титульной нации.

Второй по частоте вариант c.985A>G (p.Lys329Glu) представлен у одного пациента в гомозиготном состоянии и в четырех случаях выявлен в виде гетерозиготного носительства, что составило 15,78% в общей выборке и 18,75% среди осетин.

Третий по частоте вариант c.134A>C (p.Gln45Arg) зарегистрирован в четырех случаях в компаунд-гетерозиготном состоянии и составил 10,52 и 12,5% в общей и титульной группе соответственно.

Остальные варианты встречаются единично и составляют 18,44% в общей группе и 3,13% среди осетин.

Следует отметить, что наиболее выраженные изменения уровней С6, С8 и С10 (от 9 до 22 мкмоль/л) наблюдались при

Таблица 2. Данные МС/МС и молекулярно-генетические характеристики пациентов с MCADD

№	Биохимические показатели по данным МС/МС*	Национальность	Генотип (RefSeq NM_000016.6)
1	C6 — 1,04; C6DC — 0,34; C8 — 3,80; C10 — 0,52; C10:1 — 0,21	осетины	c.388-19T>A /c.388-19T>A
2	C6 — 1,74; C6DC — 0,52; C8 — 9,78; C8:1 — 0,17; C10 — 0,95; C10:1 — 0,49; C10:2 — 0,03	осетины	c.134A>C (p.Gln45Arg)/c.388-19T>A
3	C6 — 1,11; C8 — 4,98; C10 — 0,65; C10:1 — 0,30 + (Phe — 172)**	осетины	c.388-19T>A/ c.388-19T>A
4	C6 — 1,50; C6DC — 0,51; C8 — 6,46; C10 — 0,93; C10:1 — 0,45	осетины	c.388-19T>A/c.999_1011dup(p.Gln338Ter)
5	C6 — 3,53; C6DC — 1,02; C8 — 17,10; C8:1 — 0,23; C10 — 1,50; C10:1 — 0,58	осетины	c.985A>G (p.Lys329Glu)/c.985A>G(p.Lys329Glu)
6	C6 — 0,56; C8 — 1,57; C10:1 — 0,25	осетины	c.388-19T>A/c.999_1011dup(p.Gln338Ter)
7	C6 — 0,92; C6DC — 0,47; C8 — 5,25; C10 — 0,83; C10:1 — 0,26	осетины	c.388-19T>A/c.388-19T>A
8	C6 — 2,38; C6DC — 0,88; C8 — 12,95; C10 — 1,2; C10:1 — 0,36	осетины	c.985A>G (p.Lys329Glu)/c.388-19T>A
9	C6 — 1,22; C6DC — 0,41; C8 — 6,70; C10 — 0,82; C10:1 — 0,57	осетины	c.388-19T>A/c.985A>G (p.Lys329Glu)
10	C6 — 1,52; C6DC — 0,50; C8 — 6,10; C10 — 0,77; C10:1 — 0,38	осетины	c.388-19T>A/c.388-19T>A
11	C6 — 2,13; C6DC — 0,53; C8 — 9,11; C10 — 1,20; C10:1 — 0,57	осетины	c.388-19T>A/c.388-19T>A
12	C6 — 1,50; C6DC — 0,60; C8 — 9,79; C10 — 1,19; C10:1 — 0,44	осетин/табасаранка	c.388-19T>A/c.985A>G (p.Lys329Glu)
13	C8 — 0,45; C10 — 0,48	осетины	c.1091T>C, p.(Ile364Thr)/ c.388-19T>A
14	C6 — 1,31; C8 — 3,76; C10 — 0,44; C10:1 — 0,31	осетины	c.388-19T>A/c.461T>G, p.Leu154Trp
15	C6 — 1,24; C8 — 3,59; C10 — 0,41; C10:1 — 0,39	русские (монозиготные близнецы)	c.388-19T>A/c.400_401delATinsCA, p.(Ile134His)
16	C6 — 1,38; C8 — 4,13; C10 — 0,49; C10:1 — 0,45		c.388-19T>A/c.400_401delATinsCA, p.(Ile134His)
17	C6 — 2,15; C8 — 10,5; C10 — 1,18; C10:1 — 0,45	осетины	c.134A>C (p.Gln45Arg)/c.388-19T>A
18	C6 — 0,38; C8 — 0,59; C10 — 0,73; C10:1 — 0,25	осетины	c.985A>G (p.Lys329Glu)/***
19	C6 — 3,57; C8 — 22,4; C10 — 1,97; C10:1 — 0,72	осетины	c.134A>C (p.Gln45Arg)/c.985A>G (p.Lys329Glu)
20	C6 — 1,28; C8 — 5,13; C10 — 0,61; C10:1 — 0,316	осетины	c.388-19T>A/c.134A>C (p.Gln45Arg)

Примечания: * — референсные значения для исследуемых показателей (мкМ/л): C8 — 0–0,26; C10 — 0–0,32; C6DC — 0–0,45; C10:1 — 0–0,14; ** — случай выявления MCADD и ФКУ; *** — мутация не обнаружена при полном секвенировании гена ACADM, рекомендовано полное секвенирование генома.

генотипах, содержащих варианты c.985A>G (p.Lys329Glu) и c.388-19T>A — как в гомозиготном состоянии, так и в компаунд-гетерозиготном состоянии.

Все дети состоят на «Д» учете в МГК у врача-диетолога и генетика. Определение уровня ацилкарнитинов методом МС/МС в динамике проводят в соответствии с общепринятыми рекомендациями, состояние детей стабильно, метаболических кризов, гипогликемических состояний не наблюдалось. В рамках дополнительного соглашения между РДКБ РСО-Алания и МГНЦ имени Н. П. Бочкова родителям выявленных пациентов, проведено секвенирование по Сэнгеру в формате «трио», родители являются здоровыми носителями выявленных вариантов. В ходе медико-генетического консультирования семей проведены беседы о профилактике длительных голодных пауз, особенно на фоне интеркуррентных инфекционных заболеваний, с целью недопущения развития метаболических кризов, а в случаях их возникновения — о необходимости срочной госпитализации в стационар РДКБ и в/в капельного введения растворов глюкозы [4, 6].

Еще один случай выявления заболевания из группы органических ацидурий — диагностика недостаточности 3-метилкротонил-КоА-карбоксилазы у ребенка кумыкской национальности с мутацией в гене MCCC2 c.1082G>A (p.Arg361Gln) в гомозиготном состоянии. Состояние

ребенка стабильное, развитие соответствует возрасту. Состоит на «Д» учете у диетолога МГК РДКБ.

Исследования на спинальную мышечную атрофию

За исследуемый период на I этапе РНС в группу риска вошли пять новорожденных, из них диагноз СМА установлен в трех случаях. Частота СМА составила 1 : 4998 новорожденных (95%-й ДИ: 1 : 1711 – 1 : 24235), что в целом сопоставимо с данными мировой и отечественной литературы. Распространенность СМА в мире в среднем составляет 1 : 6000 – 1 : 10000 новорожденных, в Саудовской Аравии — 1 : 7000, в Египте и Ливии — 1 : 12 500, в РФ — 1 : 5184 [7]. Диагностику СМА осуществляем в соответствии с имеющимися диагностическими алгоритмами в рамках клинических рекомендаций [8].

В табл. 3 представлены результаты обследования пациентов со СМА и назначенная терапия.

По результатам обследования и в соответствии с рекомендациями федерального консилиума ФГАУ «НМИЦ Здоровья детей» МЗ РФ двум пациентам введен препарат онасемноген абепарвовек в возрасте 1,5 месяцев и 1 месяц, а в одном случае рекомендован риздиплам.

Пациенты состоят на диспансерном учете у невролога и генетика.

Таблица 3. Результаты обследования пациентов со СМА, сроки начала терапии и препараты, применяемые для лечения

Год	Кол-во копий гена SMN1	Кол-во копий гена SMN2	Носительство AAV9	Терапия	Начало лечения (месяцы)
2023	0	3	отр*	онасемноген абепарвовек	1,5
2023	0	4	отр	рисдиплам	1,5
2024	0	2	отр	онасемноген абепарвовек	1

Примечания: отр* — отрицательно.

Таблица 4. Результаты НС за 2023–2024 гг.

Год	ФКУ		ВГ		МВ		ГАЛ		ВГКН	
	<i>n</i>	ЧВ (95%-й ДИ)	<i>n</i>	ЧВ (95%-й ДИ)	<i>n</i>	ЧВ (95%-й ДИ)	<i>n</i>	ЧВ (95%-й ДИ)	<i>n</i>	ЧВ (95%-й ДИ)
2023	3	1 : 2999 (1 : 1285 – 1 : 9235)	2	1 : 2999 (1 : 1285 – 1 : 9235)	0	0 (0 – 1 : 4065)	0	0 (0 – 1 : 4065)	1*	1 : 7500 (1 : 2076 – 1 : 61 904)

Примечания: *n* — количество пациентов, ЧВ — частота встречаемости, 95%-й ДИ — 95%-й доверительный интервал; * — выявлена редкая для других популяций мира и РФ, но характерная для осетин ВГКН, обусловленная дефицитом 3β-гидроксистероиддегидрогеназы.

Исследования на первичные иммунодефицитные состояния (ПИД)

За исследуемый период в регионе диагноз ПИД не диагностирован ни у одного ребенка, при этом на I этапе РНС выявлено 30 случаев низкого уровня TREK/КРЕК, из них семь детей умерли до момента повторного забора крови или, в случае недоношенности, в последующем, до достижения постконцептуального возраста 37 недель. В 23 случаях в рамках дальнейшего планового обследования все показатели были в пределах референсных значений. Частота встречаемости ПИД в регионе предположительно реже, чем 1 : 14 994 новорожденных (95%-й ДИ: 0 – 1 : 4065).

Исследование в рамках неонатального скрининга на пять ВНЗ

Исследование проведено в 14 994 случаях. Мы освещали и ранее эпидемиологические и молекулярно-генетические характеристики скринируемой патологии РСО-Алания [9]. Представленные значения, полученные в ходе традиционного биохимического скрининга, подтверждают ранее полученные результаты по ВГ, МВ, ГАЛ и ВГКН. В табл. 4 представлены результаты двухлетнего исследования в рамках НС на базе МГК РДКБ РСО-Алания, которые демонстрируют низкую выявляемость ФКУ по НС по сравнению с данными РНС.

Сравнение НС и РНС в диагностике ФКУ демонстрирует более высокую чувствительность МС/МС, способствующую выявлению больных с мягкими формами ФКУ, с подтвержденными генетическими вариантами в гене *PAH*, которые нуждаются в мониторинге и диспансерном наблюдении.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аминоацидопатии

В рамках РНС представилась возможность исследовать в формате МС/МС, в числе прочих 28 показателей, и уровень ФА. Полученные данные кардинально изменили имеющиеся представления о популяционно-генетических особенностях ФКУ в регионе. Так, в 2012 г. частоту встречаемости ФКУ в республике интерпретировали как 1 на 23 000 новорожденных. Это свидетельствовало о

редкой распространенности данной патологии в регионе, так как диагноз ФКУ рассматривали как вариант тяжелой гиперфенилаланиемии (ГФА) при уровне ФА более 10 мг%, при котором обязательно назначают диетотерапию [10]. В последующем, в процессе сотрудничества с МГНЦ у нас появилась возможность проведения ДНК-диагностики всем детям, выявленным по скринингу (уровень ФА выше 2 мг%) и состоящим на учете с диагнозом ГФА. По результатам исследования частота встречаемости всех форм ФКУ оказалась в соотношении 1 : 4864 (95%-й ДИ), при этом частота случаев с тяжелыми вариантами, требующими диетотерапии, составила 1 : 22374 (95%-й ДИ), легкими формами — 1 : 6216 (95%-й ДИ). Специфическим оказался и спектр выявленных молекулярно-генетических особенностей данной патологии в связи с распространенностью двух мутаций *c.842C>T* (*p.Pro281Leu*) (остаточная активность ФАГ — 0–2%) и *c.631C>A* (*p.Pro211Thr*) (остаточная активность ФАГ 72%), которые нигде в мире не встречаются с такой частотой. Также ранее нами было зафиксировано носительство мутаций *p.Pro281Leu* и *p.Pro211Thr* в популяции с частотой 1 : 26 (95%-й ДИ), что позволяло предположить гораздо более высокую распространенность данной аминокислотопатии в РСО-Алания [5, 10], что и было подтверждено результатами РНС.

По итогам двухлетнего исследования в рамках НС выявлено пять случаев ФКУ, а в рамках РНС доказан факт высокой распространенности мягких форм ФКУ в регионе — 1 на 1363 (95% ДИ) новорожденных, высокой частоты всех форм ФКУ — 1 : 1153 (95%-й ДИ) и 1 : 7497 (95%-й ДИ) для тяжелых форм, при которых были зарегистрированы варианты двух тяжелых мутаций.

Органические ацидурии

Распространенность МСAD-дефицита в странах Европы и США, по разным сведениям, составляет 1 : 8300 – 1 : 15000 новорожденных. Распространенность данной патологии по результатам нашего исследования составила 1 : 789 обследованных новорожденных. Согласно литературным данным, частота этого НБО в мире составляет: 1 : 22 000 в Чехии, 1 : 27 139 в Норвегии, более высокая частота представлена в Германии от 1 : 4900 до 1 : 8500, в Италии — 1 : 23 000, в США от 1 : 10 000 до 1 : 30 000, а наибольшая частота представлена в Катаре — 1 : 4000

[11–12]. Точные эпидемиологические данные по России не опубликованы, но предварительные расчеты не выявили значимых особенностей [4].

В 90–95% случаев встречается точечная мутация в 11-м экзоне, при которой аденин заменяется на гуанин в 985 положении данного гена (с.985A>G). Описаны также другие генетические варианты, встречающиеся гораздо реже [13–16]. Показана высокая распространенность носительства варианта с.985A>G в странах Европы (1 : 52 в Швейцарии, 1 : 58 в Великобритании) и снижение ее с севера на юг, что, возможно, обусловлено «эффектом основателя» в древней германской популяции [17].

Клиническая картина заболевания весьма вариабельна — от бессимптомной до быстро развивающейся тяжелой [6, 18].

По данным, полученным в ходе реализации РНС, в регионе был выявлен уникальный спектр вариантов в гене *ACADM*. Так, самый распространенный по данным мировой и отечественной литературы [4, 15, 19, 20] вариант с.985A>G (р.Lys329Glu), в нашем исследовании был зарегистрирован лишь в одном случае в гомозиготном состоянии и в четырех случаях — в виде компаунд-гетерозиготного состояния, т. е. составил всего лишь 15,78% в общей выборке и 18,75% среди осетин. Тогда как вариант с.388-19T>A оказался наиболее распространенным в исследуемой популяции: 55,26% в общей выборке и около 65,62% — среди представителей титульной нации. Этот вариант отсутствует в популяционных базах данных (gnomAD без частоты). В ClinVar присутствует описание этой мутации и ссылка на два исследования из большого количества публикаций в мировой литературе, где упоминалась данная патология [16, 21].

Впервые вариант с.388-19T>A описан в 2012 г. по результатам крупного Датского исследования, посвященного *MCADD*, как ранее не зарегистрированный и выявленный по результатам скринингового обследования у двух новорожденных с генотипом с.388-19T>A/с.244_245dup (не являющихся родственниками) [21]. Доказано, что мутационные изменения последовательности происходят в интроне 5 гена *ACADM*. Они резко снижают силу акцепторных сайтов сплайсинга дикого типа, одновременно создавая новые конкурирующие, более сильные акцепторные сайты сплайсинга, которые вызывают серьезные нарушения расщепления, вплоть до деградации мРНК в результате нонсенс-опосредованного распада и напрямую изменяют кодируемую аминокислотную структуру белка *ACADM*.

В настоящее время все выявленные пациенты не достигли трехлетнего возраста, но метаболические кризы ни у одного из них не зафиксированы. Возможно, это связано с мягким вариантом выявленных мутаций и профилактическими действиями родителей в отношении недопущения длительных голодных пауз.

Следует отметить тот факт, что в доскрининговый период ни одного случая *MCADD* в республике не выявлено,

но пациенты с гипогликемическими состояниями, неясными метаболическими кризами, особенно на фоне респираторных или острых кишечных инфекционных заболеваний, конечно же, встречались в практике детских эндокринологов, педиатров, инфекционистов и реаниматологов, но причины данных состояний не верифицировались в связи с отсутствием возможности проведения МС/МС в регионе и недостаточной настороженностью врачей в отношении данной патологии.

Весьма интересным, на наш взгляд, является случай редкого сочетания ФКУ и *MCADD* у одного пациента (№ 6 в табл. 1 и № 3 в табл. 2), который в силу наличия «мягких» мутаций по обеим нозологиям не нуждается в диетотерапии с ограничением поступления ФА и у которого не наблюдается метаболических кризов.

Выводы

В целом реализацию НС и РНС в РСО-Алания можно признать эффективным методом ранней доклинической диагностики ВНЗ, который считают результативным при выявлении 0,1% патологии из всей когорты обследованных детей. В нашем исследовании 37 установленных диагнозов составляют 0,25% от всех детей, охваченных скринингом на I этапе, что однозначно свидетельствует об успешности и результативности данной программы. Продемонстрирована более высокая чувствительность МС/МС в выявлении мягких форм ФКУ по сравнению со стандартным биохимическим методом, используемым в НС. С одной стороны, при проведении диагностики в формате тандемной масс-спектрометрии значительно снизился процент ложноположительных результатов, с другой стороны — повысилась выявляемость данной патологии даже на фоне показателей ФА, незначительно превышающих нормативные значения. В ходе исследования удалось также верифицировать спектр мутаций, характерных для ФКУ и *MCADD*, и определить их распространенность в регионе. Частота всех форм ФКУ составила 1 : 1153 новорожденных, а частота *MCADD* — 1 : 789 новорожденных. Возможности, которые предоставляются научному сообществу и практикующим специалистам по мере развития научно-технического прогресса, в частности внедрение РНС, напрямую влияют на эволюцию наших взглядов в отношении спектра мутаций ВНЗ и их популяционно-генетических особенностей в разных этнических группах. Комплексное обследование пациентов и их родителей в рамках РНС не только способствует доклинической диагностике и своевременному началу лечения редких заболеваний, которые до сих пор оставались не диагностированными, но и позволяет в рамках медико-генетического консультирования информировать родителей больного ребенка в отношении дальнейшего планирования семьи и профилактики распространения ВНЗ в популяции.

Литература

1. Воронин С. В., Куцев С. И. Неонатальный скрининг на наследственные заболевания в России: вчера, сегодня, завтра. Неонатология: новости, мнения, обучение. 2022; 10 (4): 34–39. DOI: <https://doi.org/10.33029/2308-2402-2022-10-4-34-39>.
2. Воронин С. В., Захарова Е. Ю., Байдакова Г. В., Марахонов А. В., Щагина О. П., Рыжкова Н. В. и др. Расширенный неонатальный скрининг на наследственные заболевания в России: первые итоги и перспективы. Педиатрия им. Г. Н. Сперанского. 2024; 103 (1): 16–29. DOI: 10.24110/0031-403X-2024-103-1-16-29.
3. Ассоциация медицинских генетиков. Союз педиатров России. Ассоциация здоровья детей. Клинические рекомендации. Классическая фенилкетонурия и другие виды гиперфенилаланиемии. 2025, 112 с.
4. Куцев С. И., редактор. Национальное руководство. М.: ГОЭТАР-

- Медицина, 2023; 360 с. DOI:10.33029/9704-7737-3-NEO-2023-1-360.
5. Tebieva IS, Mishakova PV, Gabisova YV, Khokhova AV, Kaloeva TG, Marakhonov AV, et al. Genetic Landscape and Clinical Features of Hyperphenylalaninemia in North Ossetia-Alania: high frequency of P281L and P211T genetic variants in the PAH gene. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25 (4): 4598. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms25094598>.
 6. Михайлова С. В., Захарова Е. Ю., Петрухин А. С. Нейрометаболические заболевания у детей и подростков: диагностика и подходы к лечению. М.: Литтерра, 2024; 400 с. ISBN 978-5-4235-0417-5, DOI: 10.33029/4235-0417-5-NEI-2024-1-400.
 7. Megarbane A, Bizzari S, Deepthi A, Sabbagh S, Mansour H, Chouery E, et al. A 20-year Clinical and Genetic Neuromuscular Cohort Analysis in Lebanon: An International Effort. *J Neuromuscul Dis*. 2022; 9 (1): 193–210. DOI: 10.3233/JND-210652.
 8. Ассоциация медицинских генетиков. Российская ассоциация педиатрических центров. Всероссийское общество неврологов. Ассоциация профессиональных участников хосписной помощи. Федеральные клинические рекомендации. Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q. 2023.
 9. Тебиева И. С. Эффективность неонатального скрининга в выявлении клинико-генеалогических особенностей наследственных болезней и оптимизация системы их диагностики и лечения (диссертация). Москва, 2012.
 10. Тебиева И. С., Габисова Ю. В., Зинченко Р. А. Результаты 15-летнего неонатального скрининга в Республике Северная Осетия-Алания. *Медицинская генетика*. 2023; 22 (2): 40–47.
 11. Yuan Tian, Xinyun Zhu, Shubo Lv, Chenlu Jia, Linlin Zhang, Min Ni, et al. Analysis of gene mutations of medium-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency (MCADD) by next-generation sequencing in Henan, China. *Clinica Chimica Acta*. 2022; 536: 155–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.09.008>.
 12. Pourfarzam M, Zadhoush F. Newborn Screening for inherited metabolic disorders; news and views. *J Res Med Sci*. 2013; 18 (9): 801–8;
 13. Николаева Е. А., Мамедов И. С. Диагностика и лечение наследственных дефектов обмена жирных кислот у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2009; 2: 51–65.
 14. Сурков А. Н., Гундобина О. С., Полякова С. И., Журкова Н. В., Захарова Е. Ю. и др. Случай недостаточности ацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот со средней длиной цепи у ребенка двух лет. *Педиатрия*. 2011; 5 (64): 14–18.
 15. Wilcken B, Haas M, Joy P, Wiley V, Chaplin M, Black C, et al. Outcome of neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Australia: a cohort study. *Lancet*. 2007; 369 (9555): 37–42. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60029-4. PMID: 17208640.
 16. Li YY, Xu J, Sun XC, Li HY, Mu K. Newborn screening and genetic variation of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the Chinese population. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2022; 35 (10): 1264–71. DOI: 10.1515/jpem-2022-0394. PMID: 36068006.
 17. Smith EH, Thomas C, McHugh D, Gavrilo D, Raymond K, Rinaldo P, et al. Allelic diversity in MCAD deficiency: the biochemical classification of 54 variants identified during 5 years of ACM/MS sequencing. *Mol Genet Metab*. 2010; 100 (3): 241–50. DOI: 10.1016/j.ymgme.2010.04.001. Epub 2010 Apr 8. PMID: 20434380.
 18. Waisbren SE. Newborn screening for metabolic disorders. *JAMA*. 2006; 296 (8): 993–5. DOI: 10.1001/jama.296.8.993. PMID: 16926360.
 19. Николаева Е. А., Семьякина А. Н. Современные возможности лечения наследственных заболеваний у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 2018; 63 (4): 6–14. DOI: 10.21508/1027-4065-2018-63-4-6-14.
 20. Andresen BS, Dobrowolski SF, O'Reilly L, Muenzer J, McCandless SE, Frazier DM, et al. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) mutations identified by MS/MS-based prospective screening of newborns differ from those observed in patients with clinical symptoms: identification and characterization of a new, prevalent mutation that results in mild MCAD deficiency. *Am J Hum Genet*. 2001; 68 (6): 1408–18. DOI: 10.1086/320602. Epub 2001 May 8. PMID: 11349232; PMCID: PMC1226127.
 21. Andresen BS, Lund AM, Hougaard DM, Christensen E, Gahrn B, et al. MCAD deficiency in Denmark. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012; 106 (2): 175–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.03.018>.

References

1. Voronin SV, Kucev SI. Neonatal'nyj skринing na nasledstvennyye zabolevaniya v Rossii: vchera, segodnja, zavtra. *Neonatologija: novosti, mnenija, obuchenie*. 2022; 10 (4): 34–39. DOI: <https://doi.org/10.33029/2308-2402-2022-10-4-34-39>. Russian.
2. Voronin SV, Zaharova EYu, Bajdakova GV, Marahonov AV, Shhagina OP, Ryzhkova NV, i dr. Rasshirennyj neonatal'nyj skринing na nasledstvennyye zabolevaniya v Rossii: pervye itogi i perspektivy. *Pediatrija im. G. N. Speranskogo*. 2024; 103 (1): 16–29. DOI: 10.24110/0031-403X-2024-103-1-16-29. Russian.
3. Associacija medicinskih genetikov. Sojuz pediatrov Rossii. Associacija zdorov'ja detej. Klinicheskie rekomendacii. Klassicheskaja fenilketonurija i drugie vidy giperfenilalaninemii. 2025, 112 c. Russian.
4. Kucev SI, redaktor. Nacional'noe rukovodstvo. M.: GOJeTAR-Medicina, 2023; 360 s. DOI:10.33029/9704-7737-3-NEO-2023-1-360. Russian.
5. Tebieva IS, Mishakova PV, Gabisova YV, Khokhova AV, Kaloeva TG, Marakhonov AV, et al. Genetic Landscape and Clinical Features of Hyperphenylalaninemia in North Ossetia-Alania: high frequency of P281L and P211T genetic variants in the PAH gene. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25 (4): 4598. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms25094598>.
6. Mihajlova SV, Zaharova EJu, Petruhin AS. Nejrometabolicheskie zabolevaniya u detej i podrostkov: diagnostika i podhody k lecheniju. M.: Litterra, 2024; 400 s. ISBN 978-5-4235-0417-5, DOI: 10.33029/4235-0417-5-NEI-2024-1-400. Russian.
7. Megarbane A, Bizzari S, Deepthi A, Sabbagh S, Mansour H, Chouery E, et al. A 20-year Clinical and Genetic Neuromuscular Cohort Analysis in Lebanon: An International Effort. *J Neuromuscul Dis*. 2022; 9 (1): 193–210. DOI: 10.3233/JND-210652.
8. Associacija medicinskih genetikov. Rossijskaja associacija pедиатрических центров. Vserossijskoe obshhestvo neurologov. Associacija professional'nyh uchastnikov hospisnoj pomoshhi. Federal'nye klinicheskie rekomendacii. Proksimal'naja spinal'naja myshechnaja atrofija 5q. 2023. Russian.
9. Tebieva IS. Jefferktivnost' neonatal'nogo skринinga v vyjavlenii kliniko-genealogicheskikh osobennostej nasledstvennyh boleznej i optimizacija sistemy ih diagnostiki i lechenija (dissertacija). Moskva, 2012. Russian.
10. Tebieva IS, Gabisova YuV, Zinchenko RA. Rezul'taty 15-letnego neonatal'nogo skринinga v Respublike Severnaja Osetija-Alanija. *Medicinskaja genetika*. 2023; 22 (2): 40–47. Russian.
11. Yuan Tian, Xinyun Zhu, Shubo Lv, Chenlu Jia, Linlin Zhang, Min Ni, et al. Analysis of gene mutations of medium-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency (MCADD) by next-generation sequencing in Henan, China. *Clinica Chimica Acta*. 2022; 536: 155–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.09.008>.
12. Pourfarzam M, Zadhoush F. Newborn Screening for inherited metabolic disorders; news and views. *J Res Med Sci*. 2013; 18 (9): 801–8;
13. Nikolaeva EA, Mamedov IS. Diagnostika i lechenie nasledstvennyh defektov obmena zhirnyh kislot u detej. *Rossijskij vestnik perinatologii i pediatrii*. 2009; 2: 51–65. Russian.
14. Surkov AN, Gundobina OS, Poljakova SI, Zhurkova NV, Zaharova EYu, i dr. Sluchaj nedostatochnosti acil-KoA-degidrogenazy zhirnyh kislot so srednej dlinoj cepi u rebenka dvuh let. *Pediatrija*. 2011; 5 (64): 14–18. Russian.
15. Wilcken B, Haas M, Joy P, Wiley V, Chaplin M, Black C, et al. Outcome of neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Australia: a cohort study. *Lancet*. 2007; 369 (9555): 37–42. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60029-4. PMID: 17208640.

16. Li YY, Xu J, Sun XC, Li HY, Mu K. Newborn screening and genetic variation of medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the Chinese population. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2022; 35 (10): 1264–71. DOI: 10.1515/jpem-2022-0394. PMID: 36068006.
17. Smith EH, Thomas C, McHugh D, Gavrilov D, Raymond K, Rinaldo P, et al. Allelic diversity in MCAD deficiency: the biochemical classification of 54 variants identified during 5 years of ACADM sequencing. *Mol Genet Metab.* 2010; 100 (3): 241–50. DOI: 10.1016/j.ymgme.2010.04.001. Epub 2010 Apr 8. PMID: 20434380.
18. Waisbren SE. Newborn screening for metabolic disorders. *JAMA.* 2006; 296 (8): 993–5. DOI: 10.1001/jama.296.8.993. PMID: 16926360.
19. Nikolaeva EA, Semjachkina AN. Sovremennye vozmozhnosti lechenija nasledstvennyh zabolevanij u detej. *Roscijskij vestnik perinatologii i pediatrii* 2018; 63 (4): 6–14. DOI: 10.21508/1027-4065-2018-63-4-6-14ju. Russian.
20. Andresen BS, Dobrowolski SF, O'Reilly L, Muenzer J, McCandless SE, Frazier DM, et al. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) mutations identified by MS/MS-based prospective screening of newborns differ from those observed in patients with clinical symptoms: identification and characterization of a new, prevalent mutation that results in mild MCAD deficiency. *Am J Hum Genet.* 2001; 68 (6): 1408-18. DOI: 10.1086/320602. Epub 2001 May 8. PMID: 11349232; PMCID: PMC1226127.
21. Andresen BS, Lund AM, Hougaard DM, Christensen E, Gahrn B, et al. MCAD deficiency in Denmark. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2012; 106 (2): 175–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.03.018>.

ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АСИММЕТРИИ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЖЕВАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ В ОРГАНИЗАЦИИ ЖЕВАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ

А. Ю. Шишелова^{1,2}, О. Ю. Гусева¹ ✉, И. С. Копецкий¹, В. Ансари¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Пироговский Университет), Москва, Россия

² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия

Приобретаемый в онтогенезе опыт жевания может приводить к формированию функциональной асимметрии аппарата жевания с неблагоприятным влиянием на функции челюстно-лицевой области. Целью работы было оценить асимметрию активности жевательных мышц у здоровых людей без дисфункций зубочелюстной системы. У 17 добровольцев (6 мужчин, 11 женщин, 18–23 лет) проводили оценку моторной функциональной асимметрии мозга с помощью стандартных тестов и регистрацию поверхностной электромиограммы (ЭМГ) собственно-жевательных (СЖМ) и височных мышц (ВМ): в покое, при максимальном сжатии челюстей, при жевании — изолированном (поочередно на левой и правой сторонах) и произвольном. На основе индексов асимметрии показателей ЭМГ (общей площади (ИАинт), средней амплитуды (ИАср) и продолжительности жевания (ИАвр)) мышц справа и слева были выделены и описаны три группы с разными проявлениями асимметрии: 1) со стабильной односторонней асимметрией активности СЖМ и ВМ; 2) с «динамичной асимметрией», различной для СЖМ и ВМ; 3) с «адаптивным контролем», когда асимметрия активности мышц была адекватна жевательной пробе. В третьей группе ИАинт для СЖМ и ВМ был равен $40 \pm 18\%$ и $97 \pm 20\%$ при жевании на левой стороне, $242 \pm 39\%$ и $127 \pm 32\%$ — на правой, $115 \pm 12\%$ и $115 \pm 24\%$ при свободном жевании. Основные статистически значимые различия ИАинт, ИАср и ИАвр между группами выявлены для СЖМ (влияние фактора «группа» на данные индексы $F = 11,0$, $p < 0,01$; $F = 5,72$ и $F = 3,73$, $p < 0,05$; ANOVA repeated measures). Таким образом, в молодом возрасте у ряда людей формируется функциональная асимметрия жевательных мышц в виде избыточного преобладания электрической активности на одной стороне лица, с изменением как амплитудного, так и временного компонентов «жевательных» всплесков ЭМГ.

Ключевые слова: жевание, электромиография, функциональная асимметрия жевания, жевательные мышцы, нейтральный прикус

Благодарности: благодарим профессора И. В. Погабало за консультативную помощь по методикам регистрации и анализа электромиограмм.

Вклад авторов: А. Ю. Шишелова — идея, концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка данных, написание и редактирование статьи; О. Ю. Гусева — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, литературный обзор, написание и редактирование статьи; И. С. Копецкий — редактирование и утверждение статьи для публикации; В. Ансари — сбор материала, литературный обзор.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 250 от 21 апреля 2025 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Юрьевна Гусева
ул. Островитянова, д. 1, 117513, г. Москва, Россия; o-guseva@bk.ru

Статья получена: 19.05.2025 **Статья принята к печати:** 09.06.2025 **Опубликована онлайн:** 19.06.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.031

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

INDIVIDUAL FEATURES OF THE MASTICATORY MUSCLE BIOELECTRICAL ACTIVITY IN ORGANIZATION OF CHEWING FUNCTION

Shishelova AY^{1,2}, Guseva OY¹ ✉, Kopetskiy IS¹, Ansari V¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov University), Moscow, Russia

² Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The chewing experience acquired during ontogeny may lead to developing functional asymmetry of the masticatory apparatus, adversely affecting the maxillofacial region functions. The study aimed to assess asymmetry of the masticatory muscle activity in healthy individuals showing no dentofacial system dysfunction. In 17 volunteers (6 males, 11 females aged 18–23 years), motor functional asymmetry of the brain was assessed using standard motor tests, and surface electromyogram (EMG) of the masseter (MM) and temporalis muscle (TMs) was recorded on the right and left sides: in the resting state, with the maximum voluntary bite force, during deliberate unilateral mastication (alternately on the left and right sides), and bilateral voluntary chewing. Three groups with various asymmetry manifestations were distinguished and characterized based on the asymmetry indices of standard EMG parameters (integrated EMG (Alint), average amplitude (Alav), and chewing bursts duration (Ald)) of the right and left muscles: 1) showing stable unilateral asymmetry of the MM and TM activity; 2) showing the “dynamic asymmetry” that was different for the MMs and TMs; 3) showing the “adaptive control”, when the muscle activity asymmetry was manifested adequately to the chewing test, and Alint of the MMs and TMs reached $40 \pm 18\%$ and $97 \pm 20\%$ during chewing on the left side, $242 \pm 39\%$ and $127 \pm 32\%$ during chewing on the right side, $115 \pm 12\%$ and $115 \pm 24\%$ during bilateral chewing. The major significant between-group differences in Alint, Alav, and Ald were reported for the MMs (the impact of the “group” factor on these indices was as follows: $F = 11.0$, $p < 0.01$; $F = 5.72$ and $F = 3.73$, $p < 0.05$; repeated measures ANOVA). Thus, in young adulthood, some people develop functional asymmetry of the masticatory muscles in the form of excessive predominance of electrical activity on one side of the face with changes in both amplitude and duration of the “chewing” EMG bursts.

Keywords: chewing, electromyography, functional chewing asymmetry, masticatory muscles, neutral bite

Acknowledgements: we would like to thank Professor I.V. Pogabalo for advice on the methods to record and analyze electromyography data.

Author contribution: Shishelova AY — study idea, concept and design, data acquisition and processing, statistical data processing, manuscript writing and editing; Guseva OY — study concept and design, data acquisition and processing, literature review, manuscript writing and editing; Kopetskiy IS — manuscript editing and approval before publishing; Ansari V — data acquisition, literature review.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol No. 250 dated 21 April 2025).

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga Yu. Guseva
Ostrovityanova, 1, 117513, Moscow, Russia; o-guseva@bk.ru

Received: 19.05.2025 **Accepted:** 09.06.2025 **Published online:** 19.06.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.031

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Процесс жевания представляет собой поведенческий акт, завершающийся формированием пищевого комка, адекватного для проглатывания [1]. Одним из ключевых компонентов функциональной системы любого поведенческого акта является программа действия, реализуемая системой моторного контроля головного мозга, организованной по принципу иерархии [2]. Первично ритмическую работу жевательных мышц обеспечивает генератор двигательных программ ствола мозга, координирующий активность нейронов моторного ядра тройничного нерва, иннервирующего жевательные мышцы [2]. Возбуждение этих нейронов при жевании непрерывно корректируют сенсорные сигналы из зубочелюстной системы, в первую очередь, от механорецепторов периодонта и проприорецепторов жевательных мышц [3], а также от различных других типов рецепторов челюстно-лицевой области [4], что является ключевым звеном безусловно-рефлекторного и, соответственно, произвольного компонента жевания. Кора больших полушарий через кортико-бульбарный тракт осуществляет высший контроль жевательного центра ствола мозга [5–7], обеспечивая в том числе условно-рефлекторный и произвольный компонент жевания.

Формирование индивидуальных особенностей жевательной активности определяется особенностями онтогенеза челюстно-лицевой области, состоянием зубочелюстной системы [8], а также нейрофизиологией мозга и жевательным опытом [9]. Адаптация к развитию функций челюстно-лицевой области в онтогенезе, равно как и межполушарные особенности моторного контроля индивидуума могут привести к формированию индивидуальной функциональной асимметрии жевания. Такая асимметрия должна проявляться в виде преимущественной активности жевательных мышц на одной стороне лица, вне зависимости от текущей рабочей стороны жевания. Нашей задачей было оценить возможность наличия функциональной асимметрии жевательной активности у здоровых взрослых людей молодого возраста без дисфункций зубочелюстной системы. Цель работы — определить динамику и асимметрию активности жевательных мышц у здоровых молодых добровольцев при принудительной и свободной смене стороны жевания.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 17 добровольцев (6 мужчин и 11 женщин) в возрасте 18–23 лет. Критерии включения: наличие полных интактных зубных рядов с нейтральным типом смыкания (I класс по Angle слева и справа); отсутствие клинических симптомов патологических изменений со стороны височно-нижнечелюстного сустава (ВНЧС). Критерии исключения: возраст меньше 18 лет, беременность, аллергическая реакция на миндаль, отказ пациента от участия в исследовании. В начале эксперимента оценивали моторную функциональную асимметрию мозга с помощью стандартных двигательных проб (скрещивание рук, «аплодирование», закидывание ноги на ногу) [10]. Затем регистрировали поверхностную электромиограмму (ЭМГ) в области собственно жевательных мышц (СЖМ) и височных мышц (ВМ) с использованием четырехканального миографа Синапис для стоматологических исследований («Нейротех», Таганрог, Россия). Применяли псевдомонопольные отведения биопотенциалов. Регистрировали ЭМГ в покое (10 с) при произвольном максимальном сжатии

челюстей (10 с) и во время жевательных проб, в каждой из которых обследуемый разжевывал одно ядро миндаля. Поочередно проводили три пробы с жеванием субстрата: 1) изолированно на левой стороне; 2) изолированно на правой стороне; 3) в свободном порядке смены рабочих сторон при жевании, «удобном» для исследуемого. Во время пробы ЭМГ регистрировали в течение 30 с, затем анализировали участки записи от момента начала жевания до появления рефлекса глотания. При обработке ЭМГ измеряли: общую площадь ЭМГ (интегрированная ЭМГ, мкВ*мс) — показатель, включающий амплитудные и временные характеристики ЭМГ; среднее значение амплитуды пиков колебаний биопотенциалов в течение пробы (Аср, мкВ) — показатель, высоко коррелирующий с силой сокращения мышцы [11]; суммарную продолжительность жевательной активности мышцы в течение пробы с жеванием (время жевания, с). Для оценки выраженности асимметрии электрической активности парных жевательных мышц рассчитывали индексы асимметрии для однотипных мышц справа и слева для каждой пробы по формуле $(X \text{ справа} / X \text{ слева}) \times 100\%$, где X — соответствующий показатель ЭМГ.

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью пакета прикладных программ «Statistica 12» (StatSoft Inc., США). Для анализа различий индексов асимметрии по совокупности проведенных жевательных проб был использован факторный анализ ANOVA repeated measures (*post-hoc*-тест Fisher), в пробе с максимальным сжатием челюстей — однофакторный непараметрический анализ Kruskal–Wallis ANOVA. Уровень статистической значимости полученных различий (p) указан на рисунках.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для первичной оценки асимметрии использовали индекс асимметрии интегрированной ЭМГ (ИАинт). Динамика ИАинт при жевании от пробы к пробе была схожей у 88% участников (рис. 1). При переходе от изолированного жевания на левой стороне к жеванию на правой стороне ИАинт увеличивался, что означает повышение активности мышц на правой стороне по сравнению с левой. Затем, во время свободного жевания, ИАинт снова снижался, оставаясь более высоким по сравнению с первой пробой (в 93% измерений) или схожим по величине (в 7%). По степени сдвига ИАинт при смене рабочей стороны жевания в соответствии с пробой мы разделили обследованных на три группы. У лиц группы I (с «стабильной асимметрией», $n = 6$) наблюдалось преобладание биоэлектрической активности СЖМ и ВМ на одной стороне лица в большинстве проб, заметно выраженное в пробе со свободным жеванием. У двух человек из этой группы активность жевательных мышц была выше на правой стороне (подгруппа Ia; ИАинт > 100%), у четырех — на левой стороне (подгруппа Ib; ИАинт < 100%) (рис. 1). У лиц группы II (с «динамичной асимметрией», $n = 5$) в ряде проб наблюдались разнонаправленные проявления асимметрии активности для СЖМ и ВМ. Мы включили в эту группу обследованных, у которых отсутствовала адаптация активности СЖМ или ВМ к одной или обеим пробам с изолированным жеванием, что проявлялось в значительном (> 20%) преобладании активности соответствующих мышц на стороне, противоположной рабочей. При этом ИАинт для одних парных мышц был выше 100%, для другой — ниже (рис. 1). К группе III (с «адаптивным контролем», $n = 6$) мы отнесли лиц, у которых

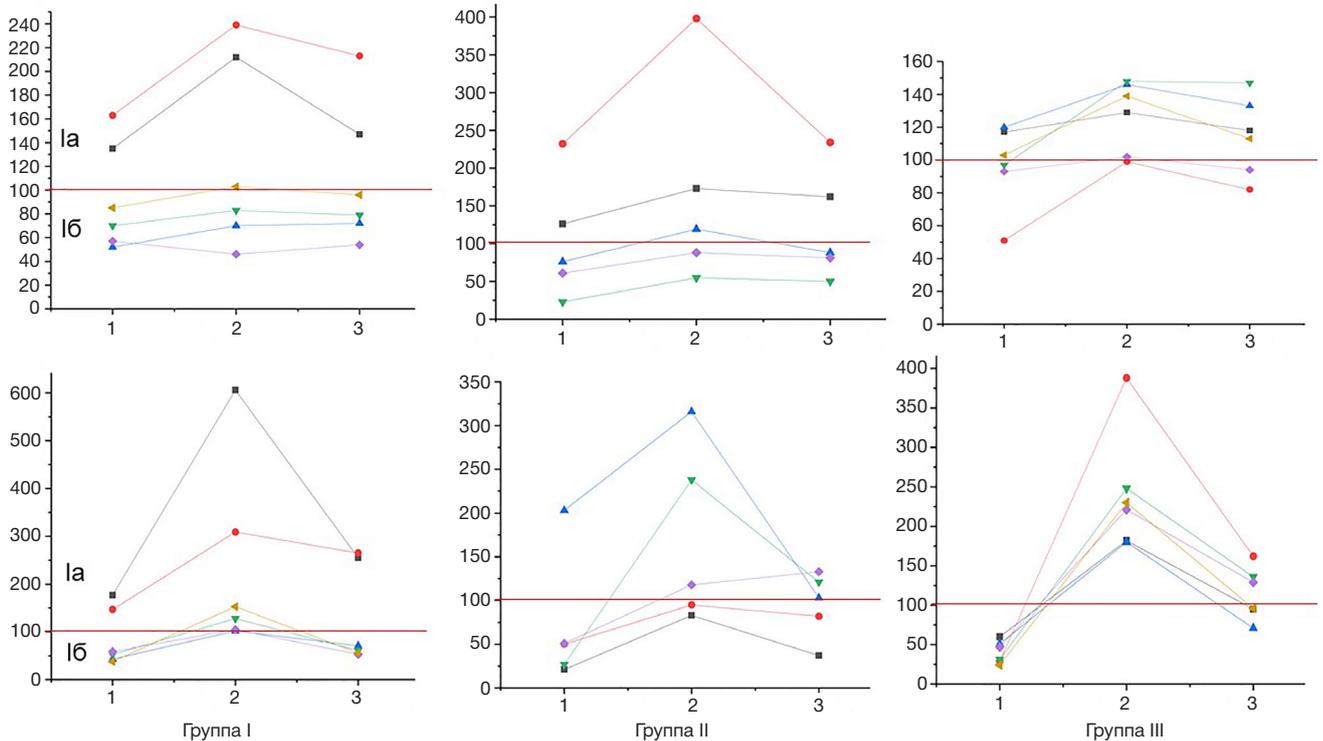


Рис. 1. Индивидуальная динамика ИАинт в выделенных группах. На оси X обозначены порядковые номера жевательных проб (см. «Пациенты и методы»), на оси Y — значения ИАинт (%). Верхний ряд ИАинт для височных мышц, нижний — для собственно жевательных мышц. Каждая линия показывает индивидуальную динамику ИАинт у участника исследования

во время проб с изолированным жеванием активность обеих мышц была выше на рабочей стороне (рис. 1). У трех человек динамика ИАинт допускала включение в группы II и III. У двух из них при жевании на левой стороне активность ВМ была незначительно выше справа ($\leq 20\%$), в остальных случаях наблюдалась адекватная адаптация к жеванию на одной рабочей стороне. При свободном жевании правосторонняя асимметрия ВМ у данных лиц сохранялась, однако различия между ВМ и СЖМ по выраженности асимметрии уменьшались. Поэтому мы отнесли этих участников к группе III. У третьего обследованного при жевании на правой стороне активность ВМ была на 12% выше слева, чем справа, и эта особенность сохранялась при свободном жевании с увеличением степени асимметрии, разнонаправленной для ВМ и СЖМ. Это дало нам основание включить данного участника в группу II.

Преобладание активности жевательных мышц на одной стороне, выявленное в подгруппах Ia и Ib, не совпадало с преобладанием движения правой или левой конечностей во время стандартных двигательных проб, отражающих межполушарную асимметрию моторного контроля (см. табл.).

Для височных мышц факторный анализ выявил статистически значимое влияние фактора «проба» на ИАинт ($F = 19,9; p < 0,0001$), а также тенденцию к взаимодействию факторов «группа» и «проба» ($p = 0,07$). Для СЖМ было показано статистически значимое влияние факторов «проба» ($F = 36,6; p < 0,0001$) и «группа» ($F = 11,0; p < 0,01$) на ИАинт, и статистически значимое взаимодействие факторов «группа» и «проба» ($F = 2,76; p < 0,05$).

Внутри выделенных групп статистически значимые различия значений ИАинт между пробами были обнаружены для всех групп, кроме подгруппы Ib (рис. 2). В пробе с жеванием на правой стороне ИАинт статистически значимо возрастал по сравнению с пробой с жеванием на левой стороне в подгруппе Ia и группе II для ВМ, в подгруппе Ia, группах II, III для СЖМ (*post-hoc*-анализ). Далее во время пробы со свободным жеванием величина ИАинт снижалась во всех этих группах. При сравнении ИАинт в пробах с жеванием на левой стороне и свободным жеванием величина ИАинт была статистически значимо меньше в первой пробе в группе II для ВМ и в группе III для СЖМ.

Статистически значимые межгрупповые различия значений ИАинт проявлялись преимущественно у СЖМ (рис. 2Б). Для подгруппы Ia обнаружено наибольшее число статистически значимых отличий значений ИАинт от его величины в остальных группах. У участников подгруппы Ia величина ИАинт была статистически значимо выше в каждой пробе по сравнению с другими группами (за исключением пробы с жеванием на левой стороне у участников группы II), что свидетельствует о выраженном преобладании активности СЖМ на правой стороне. У участников подгруппы Ib величина ИАинт, напротив, была статистически значимо ниже, чем у участников подгруппы Ia, во всех пробах, а также ниже, чем у лиц группы III в пробе с жеванием на правой стороне. Не было обнаружено статистически значимых различий значений ИАинт в проведенных жевательных пробах у участников групп II и III. В пробе со свободным жеванием у участников группы I наблюдалось значительное отклонение средних

Таблица. Доля участников (%) с доминированием движения конечности на правой стороне в выделенных группах

Ia	Iб	II	III
50%	75%	60%	67%

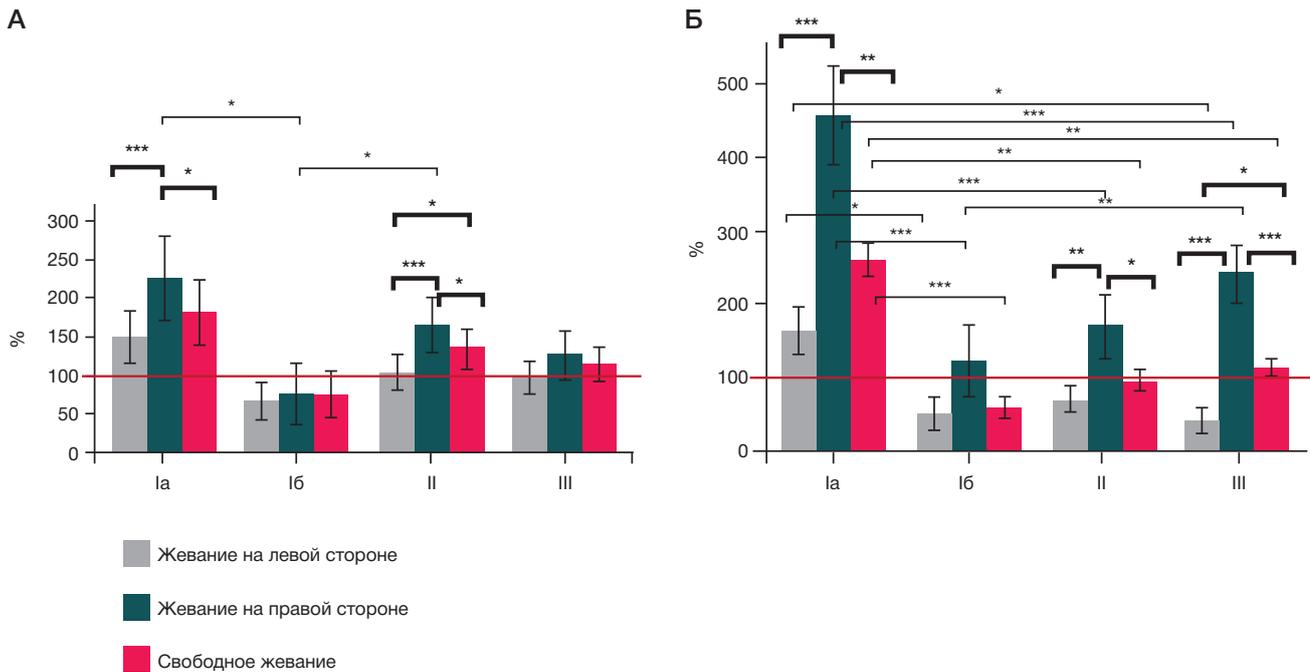


Рис. 2. ИАинт. Индекс асимметрии (%) общей площади ЭМГ жевательных мышц в проведенных жевательных пробах в выделенных группах исследуемых. Высота столбика соответствует среднему значению в группе, длина вертикальных линий — стандартной ошибке среднего значения. Красной линией обозначен уровень симметричной активности (ИАинт = 100%). **А.** Для височных мышц. **Б.** Для собственно жевательных мышц. Обозначения групп см. в тексте. Над столбиками круглыми скобками показаны статистически значимые различия (анализ ANOVA repeated measures, *post-hoc*-тест Fisher): *жирным шрифтом* обозначены различия между пробами в группе, *тонким* — между группами в однотипных пробах. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

значений ИАинт от 100% ($> 100\%$ в подгруппе Ia и $< 100\%$ в подгруппе Ib), в то время как в остальных группах значения данных индексов были более близки к 100%.

Для височных мышц статистически значимые межгрупповые различия значений ИАинт были выявлены только у участников группы I в пробе с жеванием на правой стороне (рис. 2А). Так, у участников подгруппы Ib величина ИАинт в данной пробе была ниже по сравнению с исследуемыми подгруппы Ia и группы II.

Затем сопоставили проявления асимметрии активности жевательных мышц при жевании в выделенных нами группах с индексом асимметрии интегрированной площади ЭМГ для аналогичных мышц слева и справа при максимальном сжатии челюстей (ИАсж). У участников из подгруппы Ia активность ВМ и СЖМ была выше справа, у большинства участников из подгруппы Ib (75%) — слева. В остальных группах у большего числа участников обнаружено преобладание активности ВМ и СЖМ справа по сравнению с левой стороной (у 60% в группе II для обеих групп мышц; 83% и 67% в группе III для ВМ и СЖМ соответственно). Значения ИАсж в группах показаны на рис. 3. Различия между группами были статистически не значимы.

Далее мы проанализировали различия между группами по индексу асимметрии Аср (ИАср) в жевательных пробах. Для височных мышц не обнаружено статистически значимых влияний исследуемых факторов на величину ИАср. Здесь *post-hoc*-анализ выявил единственное межгрупповое различие в пробе с жеванием на левой стороне между подгруппой Ib и группой II (рис. 4А).

Для СЖМ было обнаружено статистически значимое влияние факторов «группа» ($F = 5,72$; $p = 0,01$) и «проба» ($F = 34,17$; $p < 0,0001$) на величину ИАср. Динамика сдвигов ИАср для СЖМ от пробы к пробе была статистически высокозначимой почти для всех групп. У всех участников величина ИАср возрастала при жевании на правой стороне по сравнению с пробой с жеванием на левой стороне (*post-hoc*-

анализ) (рис. 4Б). В пробе со свободным жеванием величина ИАср значительно снижалась в подгруппе Ia, группах II, III и имела тенденцию к снижению в подгруппе Ib ($p = 0,07$).

Характер межгрупповых различий значений ИАср для СЖМ был схожим с различиями ИАинт (рис. 4Б). У участников подгруппы Ia ИАср был существенно выше 100% во всех пробах, что отражает наибольшую силу сокращения СЖМ на правой стороне. В подгруппе Ia ИАср был статистически значимо выше в пробе с жеванием на

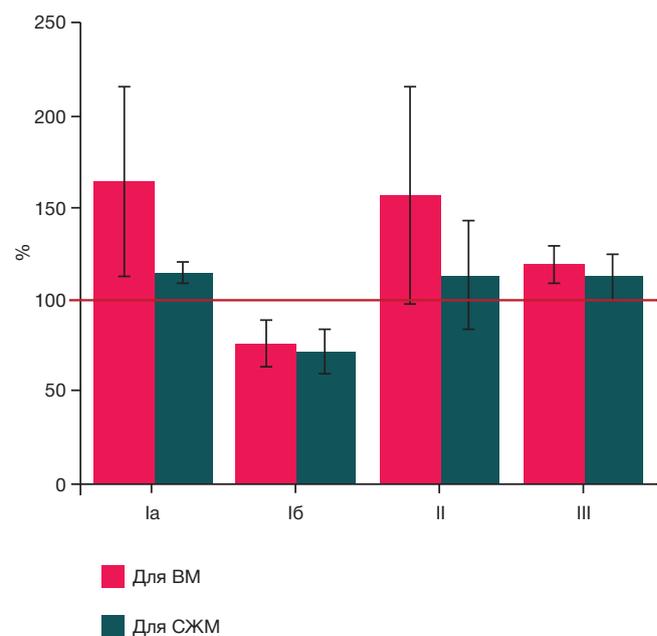


Рис. 3. ИАсж. Индекс асимметрии (%) общей площади ЭМГ жевательных мышц в пробе с максимальным сжатием челюстей в выделенных группах исследуемых. Высота столбика соответствует среднему значению в группе, длина вертикальных линий — стандартной ошибке среднего значения. Красной линией обозначен уровень симметричной активности (ИАсж = 100%). Обозначения групп см. в тексте

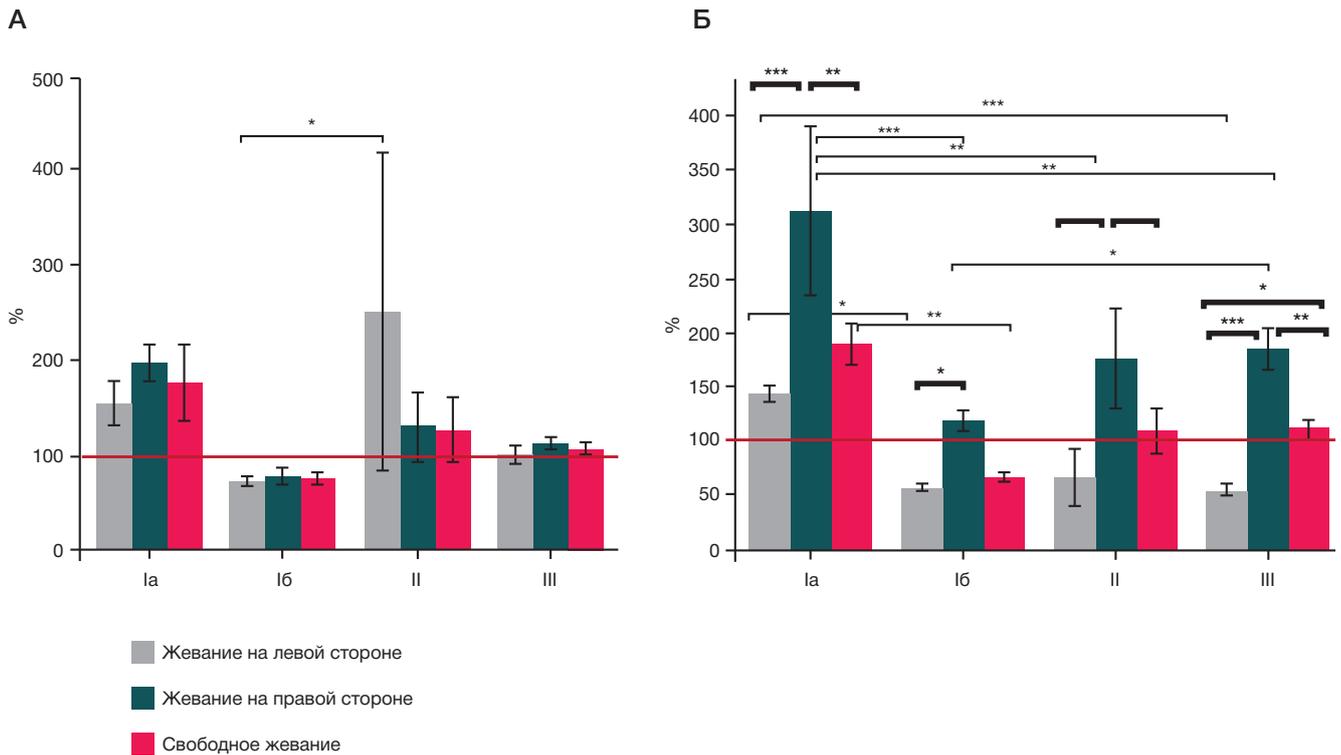


Рис. 4. ИАср. Индекс асимметрии (%) средней амплитуды пиков колебаний ЭМГ жевательных мышц (Аср) в проведенных жевательных пробах в выделенных группах исследуемых. Высота столбика соответствует среднему значению в группе, длина вертикальных линий — стандартной ошибке среднего значения. Красной линией обозначен уровень симметричной активности (ИАср = 100%). **А.** Для височных мышц. **Б.** Для собственно жевательных мышц. Обозначения групп см. в тексте. Над столбиками круглыми скобками показаны статистически значимые различия (анализ ANOVA repeated measures, *post-hoc*-тест Fisher): жирным шрифтом обозначены различия между пробами в группе, тонким — между группами в однотипных пробах. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

левой стороне по сравнению с подгруппой Iб и группой III, в пробе с жеванием на правой стороне по сравнению с остальными группами. В пробе со свободным жеванием ИАср у участников подгруппы Ia был статистически значимо выше, чем у участников подгруппы Iб, и имел тенденцию к увеличению по сравнению с участниками групп II и III ($p < 0,07$). У участников подгруппы Iб величина ИАср была намного меньше 100% в пробах с жеванием на левой стороне и при свободном жевании, что свидетельствует о значительном преобладании активности жевательных мышц на левой стороне. Значение ИАср у участников подгруппы Iб было статистически значимо ниже, чем у участников подгруппы Ia во всех пробах, и по сравнению с группой III — в пробе с жеванием на правой стороне. Также можно заметить тенденцию к более низкому значению ИАср у участников подгруппы Iб по сравнению с группой II в пробе с жеванием на правой стороне ($p < 0,1$). Величина ИАср в группе II не отличалась статистически значимо от величины ИАср в других группах. Как и для ИАинт, во время свободного жевания среднее значение ИАср было значительно больше 100% у участников подгруппы Ia, ниже 100% — в подгруппе Iб, близко к 100% — в группах II и III.

Далее мы оценили индекс асимметрии суммарной продолжительности («времени жевания») вспышек активности жевательных мышц в жевательных пробах (ИАвр). Для височных мышц было выявлено статистически значимое влияние фактора «проба» на величину ИАвр ($F = 5,09$; $p < 0,05$). Межгрупповые различия значений ИАвр для ВМ не были обнаружены. *Post-hoc*-анализ показал статистически значимое различие величин ИАвр между пробами с жеванием на левой и на правой сторонах в группах II и III (рис. 5А). Средние значения ИАвр в этих группах соответствовали характеру пробы: менее 100% —

при жевании на левой стороне и более 100% — при жевании на правой стороне.

Для СЖМ было обнаружено статистически значимое влияние фактора «группа» на величину ИАвр ($F = 3,73$; $p < 0,05$) и взаимодействие факторов «группа» и «проба» ($F = 2,97$; $p < 0,05$). Статистически значимые различия ИАвр между пробами наблюдали только в группе III (*post-hoc*-анализ; рис. 5Б), в которой величина ИАвр была наиболее низкой в пробе с жеванием на левой стороне (менее 100%), что свидетельствует о более продолжительной жевательной активности СЖМ на левой стороне. Во второй пробе, с жеванием на правой стороне, величина ИАвр заметно возросла, значительно превышая 100%, что соответствует более длительным сокращениям СЖМ на правой стороне (рис. 5Б). В пробе со свободным жеванием величина ИАвр статистически значимо снижалась, приближаясь к 100%.

Наибольшие межгрупповые различия значений ИАвр для СЖМ зафиксированы в подгруппе Ia, как и для других индексов асимметрии, описанных выше (рис. 5Б). Так, у участников подгруппы Ia величина ИАвр была статистически значимо выше, чем у участников группы III в пробе с жеванием на левой стороне и участников группы II в пробе со свободным жеванием. У участников подгруппы Iб и группы II величина ИАвр была статистически значимо ниже, чем у участников группы III в пробе с жеванием на правой стороне.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании данных ЭМГ собственно жевательных и височных мышц у добровольцев, имеющих полные интактные зубные ряды с нейтральным типом смыкания

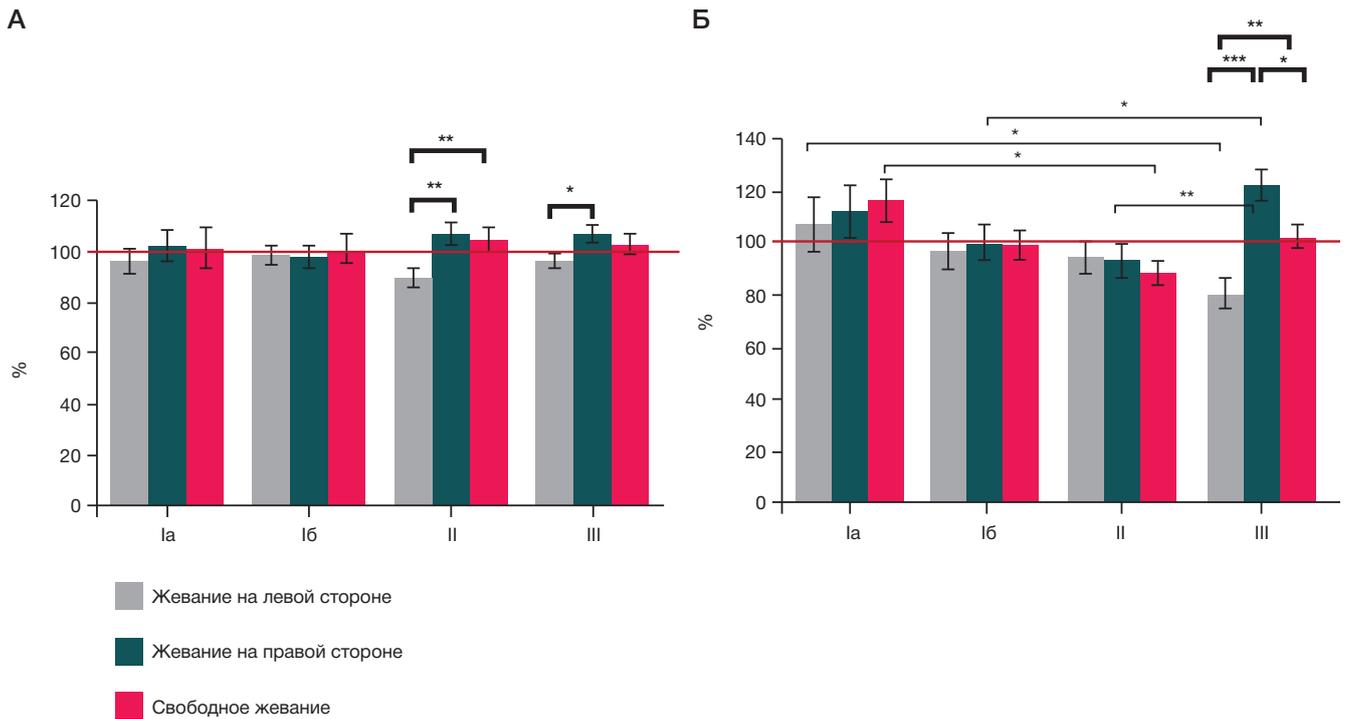


Рис. 5. ИАвр. Индекс асимметрии (%) «времени жевания» (ИАвр) жевательных мышц в проведенных жевательных пробах в выделенных группах исследуемых. Высота столбика соответствует среднему значению в группе, длина вертикальных линий — стандартной ошибке среднего значения. Красной линией обозначен уровень одинаковой продолжительности жевательной активности симметричных мышц справа и слева (ИАвр = 100%). **А.** Для височных мышц. **Б.** Для собственно жевательных мышц. Обозначения групп см. в тексте. Над столбиками *круглыми скобками* показаны статистически значимые различия (анализ ANOVA repeated measures, *post-hoc*-тест Fisher): *жирным шрифтом* обозначены различия между пробами в группе, *тонким* — между группами в однотипных пробах. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

(I класс по Angle слева и справа), без клинических симптомов патологических изменений со стороны ВНЧС мы выделили и описали несколько видов асимметрии активности парных жевательных мышц.

Было показано, что у 35% участников исследования асимметрия общей электрической активности парных мышц справа и слева во время жевательных движений соответствует жевательной задаче. Во время проб с изолированным жеванием активность обоих типов мышц у данных лиц была значимо выше на рабочей стороне, а во время произвольного жевания у них не наблюдалось ярко выраженной асимметрии активности. Таким образом, моторный контроль при такой организации жевания обеспечивает адекватное вовлечение жевательных мышц в программу жевания, поэтому мы назвали данных участников исследования группой с «адаптивным контролем». У участников из остальной части выборки наблюдалась дезадаптивная асимметрия активности ведущих жевательных мышц во время жевания на одной стороне и при свободном жевании. При этом у 35% участников исследования наблюдалось выраженное преобладание биоэлектрической активности жевательных мышц на одной стороне лица во всех пробах. Мы назвали участников с такими особенностями жевания группой со «стабильной асимметрией». У остальных 30% участников во время жевания возникали разнонаправленные проявления асимметрии активности для СЖМ и ВМ, при этом во время проб с изолированным жеванием у них наблюдалось отсутствие преобладания активности на рабочей стороне, как минимум, в одной из пар исследованных мышц. Эту группу мы назвали группой с «динамической асимметрией». Анализ амплитудного и временного компонентов ЭМГ во время жевательных движений у участников данных групп также показал наличие статистически значимых

межгрупповых различий в асимметрии этих показателей. При этом основные различия были выявлены для СЖМ, как между группами, так и между пробами внутри каждой группы.

Имеющиеся в литературе данные по асимметрии электрической активности ведущих жевательных мышц у здоровых людей достаточно разноречивы. По-видимому, это связано с разным дизайном экспериментов. Так, в ряде исследований проводили оценку асимметрии показателей ЭМГ жевательных мышц только с помощью пробы с максимальным сжатием челюстей [12, 13]. Однако, как показано в нашей работе, не наблюдается полного совпадения направленности асимметрии парных жевательных мышц при максимальном сжатии челюстей и жевании натурального субстрата. Хотя тренд к преобладанию электрической активности СЖМ и ВМ на одной стороне лица в пробе с максимальным сжатием сохраняется для группы со «стабильной асимметрией», статистически значимых различий значений индекса асимметрии интегрированной ЭМГ между группами не было обнаружено. Поскольку произвольное сжатие челюстей и жевание пищи представляют собой различные виды поведенческих реакций, направленные на достижение разных результатов, логично предположить, что будут различия в организации моторных программ при выполнении данных тестов. В других исследованиях оценку электрической активности жевательных мышц осуществляли только при изолированном жевании (на одной стороне) [14, 15], что не дает полноценной картины организации моторного контроля жевания. Кроме того, асимметрию активности жевательных мышц оценивают, как правило, без выделения подгрупп в соответствии с характером асимметрии в различных пробах [13, 15, 16]. Это затрудняет сопоставление полученных нами результатов

с данными литературы по исследованию проявления функциональной асимметрии жевательной активности. Тем не менее факты, представленные в статьях по данной тематике, позволяют нам сделать ряд предположений в отношении механизмов выявленных различий асимметрии активности жевательных мышц в выделенных нами группах.

Соотношение активности жевательных мышц при жевании, в первую очередь, отражает особенности моторного контроля. Отсутствие патологий ВНЧС, аномалий прикуса и поражений зубов у участников исследования свидетельствует о ведущем влиянии поведенческих особенностей на формирование асимметрии работы жевательных мышц. Одним из таких факторов могла бы быть функциональная межполушарная асимметрия, проявляющаяся в доминировании определенной руки или ноги при движении. Проведенные нами двигательные пробы [10] показали преобладание «правшей» в каждой из выделенных нами групп. Это свидетельствует об отсутствии прямой связи между наличием межполушарной асимметрии в организации моторного контроля мышц конечностей и жевательных мышц, что представляется логичным в связи с разными типами поведения, задействующими данные группы мышц.

Обнаруженное нами отсутствие точного соответствия между проявлением билатеральной асимметрии активности жевательных мышц при максимальном сжатии челюстей и при жевании, на наш взгляд, показывает различную корковую организацию вовлечения быстрых и медленных двигательных единиц в сокращение жевательных мышц при выполнении привычного действия (жевания пищи) и в непривычном и неспецифическом тесте сжатия челюстей.

Интересно, что большинство различий между группами по характеру асимметрии было выявлено для СЖМ. Согласно данным литературы, управление СЖМ и ВМ на правой и левой сторонах осуществляется содружественно, что, например, выражается в наличии статистически значимых корреляций между ЭМГ активностью мышц на левой и правой сторонах, а также между активностью правой СЖМ и обеих ВМ при максимальном сжатии челюстей [8]. Это обеспечивает координацию сокращения мышц во время жевания. Однако моторный контроль в отношении каждой мышцы специфичен, что проявляется, в частности, в невысоком коэффициенте указанных выше корреляций (не более 0,6), отсутствии корреляционной связи между активностью левой СЖМ и обеих ВМ, а также в различной степени активации каждой из данных мышц в разных функциональных задачах (жевании различных субстратов, сжатии челюстей, ритмическом движении челюстей и др.) [17]. Таким образом, индивидуальный характер жевания может выражаться в различной степени асимметрии активности СЖМ и ВМ.

В ряде исследований обнаружено, что при подобной регистрации ЭМГ во время жевательных проб вклад СЖМ в общую электрическую активность данных жевательных мышц при жевании твердой пищи выше, чем вклад ВМ: как при свободном жевании [16], так и на рабочей стороне при изолированном жевании [18]. В последнем случае асимметрия интегральной ЭМГ между рабочей и противоположной сторонами выше для СЖМ, чем для ВМ [14, 16, 19]. Кроме того, программа моторного контроля в отношении СЖМ более лабильна, на что указывает, например, повышение частоты колебаний электрических потенциалов СЖМ при сжатии челюстей после кратковременной нормализации окклюзии с помощью шины у стоматологических пациентов, наряду с отсутствием статистически значимых изменений в частоте колебаний потенциала ВМ [20]. Эти факты подтверждают большее значение управления активностью СЖМ по сравнению с ВМ при организации жевания, что может приводить к большей вариативности проявления билатеральной асимметрии для СЖМ среди людей с отсутствием патологии челюстно-лицевой области. В связи с этим полученные нами данные отражают преимущественно проявления индивидуальной поведенческой адаптации жевательной функции. Такие поведенческие компоненты могут оказывать влияние на стоматологические процессы. Например, наличие дисфункции ВНЧС может сопровождаться различными сдвигами электрической активности СЖМ и ВМ и ее асимметрии в разных исследованиях [21]. Описанные нами виды соотношения активности жевательных мышц у здоровых людей позволят проводить более надежную и точную диагностику и коррекцию их функциональной асимметрии.

ВЫВОДЫ

У ряда стоматологически здоровых людей молодого возраста имеется односторонняя асимметрия электрической активности височных и собственно жевательных мышц во время жевания, не коррелирующая с асимметрией активности при максимальном сжатии челюстей и с доминированием конечностей в моторных тестах. По выраженности асимметрии интегральной ЭМГ при жевании были выделены три группы: 1) со стабильным преобладанием активности жевательных мышц на одной стороне лица; 2) с разнонаправленной асимметрией для височных и собственно жевательных мышц; 3) с преобладанием активности мышц на рабочей стороне во время изолированного жевания и незначительной асимметрией при произвольном жевании. Выделенные группы различаются также по асимметрии показателей ЭМГ, характеризующих интенсивность и длительность возбуждения собственно жевательных мышц.

Литература

1. Алявия О., Нишанова А., Гулямова С. Функциональная система, обеспечивающая процессы пищеварения в ротовой полости. *Стоматология*. 2018; 1 (70): 54–57.
2. Gerstner G, Madhavan S and Crane E. Mammalian Oral Rhythms and Motor Control. *Biomechanics in Applications*. InTech. 2011. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/19501>.
3. Piancino MG, Isola G, Cannavale R, Cutroneo G, Vermiglio G, Bracco P, Anastasi GP. From periodontal mechanoreceptors to chewing motor control: A systematic review. *Arch Oral Biol*. 2017; 78: 109–121. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.02.010.
4. van der Glas HW, van der Bilt A, Abbink JH, Mason AG, Cadden SW. Functional roles of oral reflexes in chewing and biting: Phase-, task- and site-dependent reflex sensitivity. *Arch Oral Biol*. 2007; 52 (4): 365–369. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.10.022>.
5. Nordstrom MA. Insights into the bilateral cortical control of human masticatory muscles revealed by transcranial magnetic stimulation. *Arch*

- Oral Biol. 2007; 52 (4): 338–42. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2006.09.013.
6. Onozuka M, Fujita M, Watanabe K, Hirano Y, Niwa M, Nishiyama K, et al. Age-related changes in brain regional activity during chewing: a functional magnetic resonance imaging study. *J Dent Res.* 2003; 82: 657–660.
 7. Quintero A, Ichesco E, Myers C, Schutt R, Gerstner GE. Brain activity and human unilateral chewing: an fMRI study. *J Dent Res.* 2013; 92: 136–42.
 8. Pyo CY, Kim TH, Kim DH. Association between masticatory muscle activity and oral conditions in young female college students. *Anat Cell Biol.* 2021; 54 (4): 479–88. DOI: 10.5115/acb.21.107.
 9. Almotairy N, Kumar A, Trulsson M, Grigoriadis A. Development of the jaw sensorimotor control and chewing — a systematic review. *Physiol Behav.* 2018; 194: 456–65. DOI: 10.1016/j.physbeh.2018.06.037.
 10. Гурижева М. И. Связи двигательных и визуальных проб, отражающих функциональную асимметрию полушарий головного мозга девушек. Биолетень медицинских интернет-конференций. 2017; 7 (6): 1154–8.
 11. Bogdanov V Type of correlation between bite force and EMG activity of the temporalis and masseter muscles during maximal and submaximal clenching. *Folia Medica.* 2023; 65 (6): 975–85. Available from: <https://doi.org/10.3897/folmed.65.e107180>.
 12. Ferrario VF, Sforza C, Colombo A, Ciusa V. An electromyographic investigation of masticatory muscles symmetry in normo-occlusion subjects. *J Oral Rehabil.* 2000; 27 (1): 33–40. DOI: 10.1046/j.1365-2842.2000.00490.x.
 13. Hotta GH, Oliveira AIS de, Oliveira AS de, Pedroni CR. Electromyography and asymmetry index of masticatory muscles in undergraduate students with temporomandibular disorders. *Brazilian Journal of Oral Sciences.* 2015; 14 (2): 176–81. DOI: 10.1590/1677-3225v14n2a15.
 14. Kimoto K, Fushima K, Tamaki K, Toyoda M, Sato S, Uchimura N. Asymmetry of masticatory muscle activity during the closing phase of mastication. *Cranio.* 2000; 18 (4): 257–63. DOI: 10.1080/08869634.2000.11746139.
 15. Na SH, Kang DW. Comparative Electromyographic Analysis Of Masticatory Muscles Between Bilateral And Unilateral Masticators. *J Korean Acad Prosthodont.* 2002; 40 (6): 577–89.
 16. Mioche L, Bourdiol P, Martin JF, Noël Y. Variations in human masseter and temporalis muscle activity related to food texture during free and side-imposed mastication. *Arch Oral Biol.* 1999; 44 (12): 1005–12. DOI: 10.1016/s0003-9969(99)00103-x. PMID: 10669078.
 17. Farella M, Palla S, Erni S, Michelotti A, Gallo L. Masticatory muscle activity during deliberately performed oral tasks. *Physiol Meas.* 2008; 29 (2008): 1397–410. DOI: 10.1088/0967-3334/29/12/004.
 18. Fueki K, Yoshida E, Sugiura T, Igarashi Y. Comparison of electromyographic activity of jaw-closing muscles between mixing ability test and masticatory performance test. *J Prosthodont Res.* 2009; 53 (2): 72–7. DOI: 10.1016/j.jpor.2008.09.003. Epub 2008 Dec 27. PMID: 19318076.
 19. Tomonari H, Seong C, Kwon S, Miyawaki S. Electromyographic activity of superficial masseter and anterior temporal muscles during unilateral mastication of artificial test foods with different textures in healthy subjects. *Clin Oral Investig.* 2019; 23 (9): 3445–55. DOI: 10.1007/s00784-018-2754-x. Epub 2019 Jan 3. PMID: 30607620.
 20. Шатров И. М., Жолудев С. Е. Электромиографическая оценка реакции жевательных и височных мышц на нагрузку как показатель функциональной адаптации зубочелюстной системы. *Проблемы стоматологии.* 2016; 1: 103–9.
 21. Marcelino V, De Rovere S, Paço M, Gonçalves M, Marcelino S, Guimarães AS, et al. Masticatory Function in Individuals with Temporomandibular Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Life (Basel).* 2023; 13 (2): 472. DOI: 10.3390/life13020472.

References

1. Alyavija O, Nishanova A, Gulyamova S. Funkcional'naja sistema, obespechivajushhaja processy pishhevarenija v rotovoj polosti. *Stomatologija.* 2018; 1 (70): 54–57. Russian.
2. Gerstner G, Madhavan S and Crane E. Mammalian Oral Rhythms and Motor Control. *Biomechanics in Applications.* InTech. 2011. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/19501>.
3. Piancino MG, Isola G, Cannavale R, Cutroneo G, Vermiglio G, Bracco P, Anastasi GP. From periodontal mechanoreceptors to chewing motor control: A systematic review. *Arch Oral Biol.* 2017; 78: 109–121. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.02.010.
4. van der Glas HW, van der Bilt A, Abbink JH, Mason AG, Cadden SW. Functional roles of oral reflexes in chewing and biting: Phase-, task- and site-dependent reflex sensitivity. *Arch Oral Biol.* 2007; 52 (4): 365–369. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.10.022>.
5. Nordstrom MA. Insights into the bilateral cortical control of human masticatory muscles revealed by transcranial magnetic stimulation. *Arch Oral Biol.* 2007; 52 (4): 338–42. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2006.09.013.
6. Onozuka M, Fujita M, Watanabe K, Hirano Y, Niwa M, Nishiyama K, et al. Age-related changes in brain regional activity during chewing: a functional magnetic resonance imaging study. *J Dent Res.* 2003; 82: 657–660.
7. Quintero A, Ichesco E, Myers C, Schutt R, Gerstner GE. Brain activity and human unilateral chewing: an fMRI study. *J Dent Res.* 2013; 92: 136–42.
8. Pyo CY, Kim TH, Kim DH. Association between masticatory muscle activity and oral conditions in young female college students. *Anat Cell Biol.* 2021; 54 (4): 479–88. DOI: 10.5115/acb.21.107.
9. Almotairy N, Kumar A, Trulsson M, Grigoriadis A. Development of the jaw sensorimotor control and chewing — a systematic review. *Physiol Behav.* 2018; 194: 456–65. DOI: 10.1016/j.physbeh.2018.06.037.
10. Gurizheva MI. Svjazi dvigatel'nyh i vizual'nyh prob, otrazhajushih funkcional'nuju asimmetriju polusharij golovnogo mozga devushek. *Bjulleten' medicinskih internet-konferencij.* 2017; 7 (6): 1154–8. Russian.
11. Bogdanov V Type of correlation between bite force and EMG activity of the temporalis and masseter muscles during maximal and submaximal clenching. *Folia Medica.* 2023; 65 (6): 975–85. Available from: <https://doi.org/10.3897/folmed.65.e107180>.
12. Ferrario VF, Sforza C, Colombo A, Ciusa V. An electromyographic investigation of masticatory muscles symmetry in normo-occlusion subjects. *J Oral Rehabil.* 2000; 27 (1): 33–40. DOI: 10.1046/j.1365-2842.2000.00490.x.
13. Hotta GH, Oliveira AIS de, Oliveira AS de, Pedroni CR. Electromyography and asymmetry index of masticatory muscles in undergraduate students with temporomandibular disorders. *Brazilian Journal of Oral Sciences.* 2015; 14 (2): 176–81. DOI: 10.1590/1677-3225v14n2a15.
14. Kimoto K, Fushima K, Tamaki K, Toyoda M, Sato S, Uchimura N. Asymmetry of masticatory muscle activity during the closing phase of mastication. *Cranio.* 2000; 18 (4): 257–63. DOI: 10.1080/08869634.2000.11746139.
15. Na SH, Kang DW. Comparative Electromyographic Analysis Of Masticatory Muscles Between Bilateral And Unilateral Masticators. *J Korean Acad Prosthodont.* 2002; 40 (6): 577–89.
16. Mioche L, Bourdiol P, Martin JF, Noël Y. Variations in human masseter and temporalis muscle activity related to food texture during free and side-imposed mastication. *Arch Oral Biol.* 1999; 44 (12): 1005–12. DOI: 10.1016/s0003-9969(99)00103-x. PMID: 10669078.
17. Farella M, Palla S, Erni S, Michelotti A, Gallo L. Masticatory muscle activity during deliberately performed oral tasks. *Physiol Meas.* 2008; 29 (2008): 1397–410. DOI: 10.1088/0967-3334/29/12/004.
18. Fueki K, Yoshida E, Sugiura T, Igarashi Y. Comparison of electromyographic activity of jaw-closing muscles between mixing ability test and masticatory performance test. *J Prosthodont Res.* 2009; 53 (2): 72–7. DOI: 10.1016/j.jpor.2008.09.003. Epub 2008 Dec 27. PMID: 19318076.
19. Tomonari H, Seong C, Kwon S, Miyawaki S. Electromyographic activity of superficial masseter and anterior temporal muscles during unilateral mastication of artificial test foods with different textures in healthy subjects. *Clin Oral Investig.* 2019; 23 (9): 3445–55. DOI: 10.1007/s00784-018-2754-x. Epub 2019 Jan 3. PMID: 30607620.

20. Shatrov IM, Zholudev SE. Jelektromiograficheskaja ocenka reakcii zhevatel'nyh i visochnyh myshc na nagruzku kak pokazatel' funkcional'noj adaptacii zubocheľjustnoj sistemy. Problemy stomatologii. 2016; 1: 103–9. Russian.
21. Marcelino V, De Rovere S, Paço M, Gonçalves M, Marcelino S, Guimarães AS, et al. Masticatory Function in Individuals with Temporomandibular Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. Life (Basel). 2023; 13 (2): 472. DOI: 10.3390/life13020472.

ОЦЕНКА РОЛИ ПЕЧЕНОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА В БИОТРАНСФОРМАЦИИ СИДНОНИМИНОВ *IN VIVO*Н. С. Попов¹✉, В. М. Терехов¹, М. С. Баранов², В. Ю. Балабаньян², Д. Е. Каурова², И. Н. Мяснянко², Е. А. Терехова¹¹ Тверской государственный медицинский университет, Тверь, Россия² Научно-исследовательский институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Исследование биотрансформации фармакологически активных молекул — важнейший этап разработки лекарственных средств, результаты которого позволяют выявить активные и токсичные метаболиты, прогнозировать лекарственные взаимодействия, а также являются фундаментальной основой для целенаправленного конструирования молекул новых лекарственных кандидатов. Основным органом, принимающим участие в биотрансформации лекарств, является печень. Широко используемые в настоящее время методы исследования метаболизма *in vitro* не позволяют выявить продукты внепеченочной биотрансформации лекарственных молекул. Целью исследования было разработать *in vivo* подход к определению роли печени в биотрансформации молекул лекарственных кандидатов. Предложенный подход основан на осуществлении сосудистой изоляции печени у лабораторных крыс, выполненной хирургическим путем. Участие данного органа в биотрансформации фармакологически активных молекул показано на примере соединения-лидера из группы сиднониминов, обладающего сосудорасширяющей активностью. Показано, что исключение печени из системного кровотока не приводит к образованию метаболитов изучаемого соединения, идентифицируемых с помощью хромато-масс-спектрометрии. Полученные результаты могут служить основой для прогнозирования фармакокинетики, эффективности и безопасности лекарственных средств.

Ключевые слова: биотрансформация, фармакокинетика, сиднонимин, вазодилаторы, хромато-масс-спектрометрия

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания, тема научно-исследовательской работы: «Разработка лекарственного кандидата, обладающего преимущественно центрально-сосудорасширяющим действием для лечения цереброваскулярных патологий», номер госрегистрации — 124020900020-4.

Вклад авторов: Н. С. Попов — поиск метаболитов соединения ВВР2023, разработка биоаналитической методики, подготовка рукописи; В. М. Терехов — разработка дизайна сосудистой изоляции печени у крыс, выполнение оперативного вмешательства; М. С. Баранов — синтез соединения ВВР2023 и его метаболитов, подготовка рукописи; В. Ю. Балабаньян — постановка цели, разработка дизайна исследования, подготовка рукописи; Д. Е. Каурова — обзор литературы, подготовка рукописи; И. Н. Мяснянко — синтез соединения ВВР2023 и его метаболитов, подготовка рукописи; Е. А. Терехова — разработка дизайна сосудистой изоляции печени у крыс, выполнение оперативного вмешательства; все авторы внесли равнозначный вклад в подготовку публикации, подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России (протокол № 5 от 19 июня 2024 г.). Все эксперименты выполнены в соответствии с Правилами лабораторной практики (приказ Минздрава России от 23.08.2010 № 708н, Директива Европейского парламента, Совет Европейского союза 2010/63/ЕС по защите позвоночных животных, используемых для научных целей).

✉ **Для корреспонденции:** Никита Сергеевич Попов
ул. Советская, д. 4, г. Тверь, 170100, Россия; ns.popov@mail.ru

Статья получена: 16.04.2025 **Статья принята к печати:** 30.04.2025 **Опубликована онлайн:** 15.05.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.026

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

IN VIVO ASSESSMENT OF THE ROLE OF LIVER METABOLISM IN SYDNONE IMINE BIOTRANSFORMATIONPopov NS¹ ✉, Terekhov VM¹, Baranov MS², Balabanyan VYu², Kaurava DE², Myasnyanko IN², Terekhova EA¹¹ Tver State Medical University, Tver, Russia² Research Institute of Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Assessment of pharmacologically active molecule biotransformation represents the most important phase of drug development, the results of which make it possible to identify active and toxic metabolites and provide a fundamental basis for the targeted design of new candidate drug molecules. The liver is the main organ involved in biotransformation of drugs. The currently widely used *in vitro* metabolism assessment methods do not allow one to identify products of extrahepatic drug molecule biotransformation. The study aimed to develop an *in vivo* approach to determination of the role of the liver in biotransformation of candidate drug molecules. The approach proposed is based on the vascular liver isolation performed surgically in laboratory rats. The organ involvement in biotransformation of pharmacologically active molecules is exemplified by the leader compound of the sydnone imine group possessing vasodilatory activity. It has been shown that elimination of the liver from systemic blood flow does not result in generation of the test compound metabolites identified by chromatography–mass spectrometry. The findings can provide the basis for prediction of drug pharmacokinetics, efficacy, and safety.

Keywords: biotransformation, pharmacokinetics, sydnone imines, vasodilators, chromatography–mass spectrometry

Funding: the study was carried out under the state assignment for the research project "Development of the Candidate Drug Possessing Mostly Central Vasodilatory Activity for Treatment of Cerebrovascular Disorders", state registration number 124020900020-4.

Author contribution: Popov NS — search for the BBP2023 compound metabolites, bioanalytical method development, manuscript writing; Terekhov VM — developing the design of vascular liver isolation in rats, surgical procedure; Baranov MS — synthesis of the BBP2023 compound and its metabolites, manuscript writing; Balabanyan VYu — goal setting, developing the study design, manuscript writing, Kaurava DE — literature review, manuscript writing; Myasnyanko IN — synthesis of the BBP2023 compound and its metabolites, manuscript writing; Terekhova EA — developing the design of vascular liver isolation in rats, surgical procedure; all authors contributed to the publication equally, they confirm compliance of authorship with the ICMJE international criteria.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Tver State Medical University (protocol No. 5 dated 19 June 2024). All experiments were conducted in accordance with the principles of Good Laboratory Practice (Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 708n of 23.08.2010, Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes).

✉ **Correspondence should be addressed:** Nikita S. Popov
Sovetskaya, 4, Tver, 170100, Russia; ns.popov@mail.ru

Received: 16.04.2025 **Accepted:** 30.04.2025 **Published online:** 15.05.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.026

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Исследование биотрансформации молекул-кандидатов — важнейший этап разработки лекарственных средств (ЛС) [1]. Образование токсичных метаболитов ЛС является фактором, вносящим существенный вклад в безопасность проводимой фармакотерапии и причиной неудач при проведении доклинических и клинических испытаний [2]. Наоборот, образование фармакологически активных метаболитов может значительно повышать эффективность применения ЛС [3], а также служить основой для разработки новых лекарственных молекул [4]. Сведения о биотрансформации ЛС имеют важное значение на этапе разработки состава и технологии производства лекарственных форм [5], а также позволяют прогнозировать многие лекарственные взаимодействия [6]. Кроме того, данные о путях метаболизма известных соединений лежат в основе целенаправленного конструирования молекул новых лекарственных кандидатов [7].

Основным органом, принимающим участие в биотрансформации ЛС, является печень [8]. Исследование метаболизма лекарственных кандидатов на этапе ранней разработки в основном осуществляют *in vitro* путем инкубирования веществ с микросомальной фракцией печени, содержащей различные ферменты [9–11]. Данный подход общепринят, доступен и воспроизводим [12]. Кроме того, он позволяет идентифицировать отдельные цитохромы, участвующие в метаболизме конкретного вещества [13]. Однако такой способ имеет ряд существенных недостатков, среди которых можно выделить отсутствие возможности выявления продуктов внепеченочной биотрансформации ЛС [14]. Альтернативным подходом является исследование биотрансформации *in vivo*, при котором лабораторные животные получают исследуемый препарат, после чего через определенное время у них производят забор биологического материала (плазма крови, моча, фрагменты внутренних органов), который исследуют на предмет содержания вероятных метаболитов [15]. Полученные при этом результаты также не могут дать точное представление об участии печени в процессах биотрансформации ЛС.

Один из подходов к определению участия печени в метаболизме фармакологически активных веществ — исключение данного органа из системного кровотока хирургическим путем, проводимое непосредственно перед введением исследуемого препарата. Сравнение результатов хромато-масс-спектрометрического определения вероятных метаболитов в биоматериале, полученных от лабораторных животных с сосудистой изоляцией печени и без нее, позволяет сделать выводы о роли гепатоцитов в биотрансформации исследуемых молекул.

Цель настоящего исследования — разработка *in vivo* подхода к определению роли печени в биотрансформации молекул лекарственных кандидатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все экспериментальные работы, включая фармакологическую и биоаналитическую часть, были выполнены на базе научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России.

В качестве объекта экспериментального изучения участия печени в биотрансформации лекарственных средств использовали соединение-лидер ВВР2023, представляющее собой производное сиднонимина, обладающее сосудорасширяющей активностью (рис. 1).

На первом этапе исследования на основании сведений об общих путях биотрансформации ксенобиотиков осуществляли прогнозирование структуры предполагаемых метаболитов соединения ВВР2023, для которых рассчитывали точные значения моноизотопных масс (табл. 1).

На втором этапе проводили фармакологический эксперимент, целью которого было получение биологического материала (плазма крови), содержащего вероятные метаболиты. Исследования были выполнены на самцах крыс Wistar пола массой около 250 г (питомник ООО «СМК СТЕЗАР», Россия). Клетки с животными находились в контролируемых условиях окружающей среды (20–26 °С и 30–70% относительная влажность). В комнатах содержания животных поддерживали 12-часовой цикл освещения и производили 8–10-кратную смену объема воздуха в час. Крыс кормили полнорационным комбикормом ПК-120 («Лабораторкорм», Россия), поили фильтрованной водопроводной водой *ad libitum*. Чистку клеток, влажную уборку комнат, а также замену бутылок с водой на новые осуществляли ежедневно. Вечером накануне эксперимента животные были лишены корма.

В ходе проведения исследования трем крысам однократно внутривенно вводили активную фармацевтическую субстанцию (АФС) ВВР2023 в форме 10%-й эмульсии кукурузного масла в дозе 1/100 LD₅₀. Через 3 ч после введения препарата производили забор крови из хвостовой вены крыс в объеме 0,1 мл с помощью инсулинового шприца, содержащего 2 МЕ гепарина натрия. Собранную кровь немедленно переносили в пробирки типа Эппендорф объемом 0,2 мл, плазму получали с помощью лабораторной центрифуги LMC-4200R (Biosan, Латвия) при комнатной температуре и частоте вращения ротора 3000 об./мин в течение 10 мин. Полученную плазму в объеме 50 мкл объединяли с 800 мкл метанола с добавлением 0,5% муравьиной кислоты, пробы перемешивали на вортексе Microspin FV-2400 (Biosan, Латвия) в течение 15 с, выдерживали при температуре –40 °С — в морозильнике MDF-136 (Sanyo, Япония) в течение 30 мин, после чего супернатант отделяли с помощью центрифуги D-37520 (Sigma, Германия) при ускорении 15 000 g и температуре –10 °С

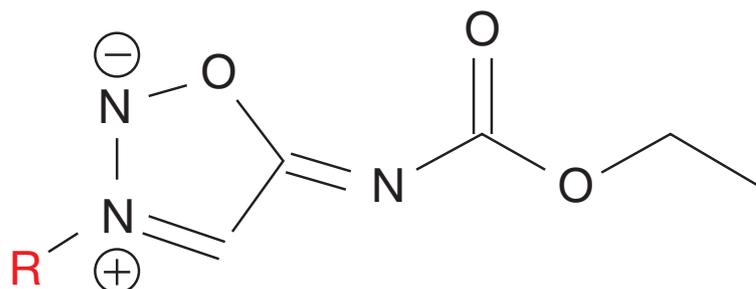


Рис. 1. Структурная формула ВВР2023, где R — разветвленный предельный углеводородный радикал (C₇H₁₅)

Таблица 1. Предполагаемые продукты биотрансформации соединения ВВР2023 и их моноизотопные молекулярные массы

Вероятный метаболит	Молекулярная масса, Да	Вероятный метаболит	Молекулярная масса, Да
ВВР2023	255,16	R-NH ₂	115,13
ВВР2023 + OH	271,15	ВВР2023 + OH + глюкуроновая кислота	447,19
ВВР2023 + 2OH	287,15	ВВР2023 - (CO)OC ₂ H ₅ + OH + глюкуроновая кислота	375,16
ВВР2023 + 3OH	303,15	R-NH ₂ + OH	131,13
ВВР2023 - (CO)OC ₂ H ₅	183,14	R-NH ₂ + OH + глюкуроновая кислота	307,16
ВВР2023 - (CO)OC ₂ H ₅ + OH	199,13	ВВР2023 + OH + серная кислота	351,11
ВВР2023 - (CO)OC ₂ H ₅ + 2OH	215,13	ВВР2023 + глутатион	560,23
ВВР2023 - (CO)OC ₂ H ₅ - NO	154,15	ВВР2023 - (CO)OC ₂ H ₅ - NO + OH + глюкуроновая кислота	346,17

Примечание: R — разветвленный предельный углеводородный радикал (C₇H₁₃).

в течение 20 мин. Надосадочную жидкость пропускали через мембранный фильтр 0,22 мкм («Лаборатория воды», Россия), напрямую вводили в электрораспылительный источник ионов масс-спектрометра AB Sciex 3200 MD Qtrap (Sciex, Сингапур) с помощью встроенного шприцевого насоса со скоростью 10 мкл/мин. Вначале проводили масс-спектрометрический анализ соединения ВВР2023 с целью идентификации характеристических ионов-продуктов (режим Product Ion). Учитывая, что потенциальные метаболиты при фрагментации могут образовывать ионы-продукты, по значению m/z (отношение массы к числу зарядов) совпадающие с фрагментарными ионами соединения ВВР2023, проводили обратный скрининг молекулярных ионов по соответствующим ионам-продуктам (режим Precursor Ion). Выявленные сигналы сравнивали с теоретически рассчитанными значениями моноизотопной массы предполагаемых метаболитов. В случае совпадения этих значений выявленные продукты биотрансформации соединения ВВР2023 подвергали масс-спектрометрическому анализу в режиме Product Ion с целью косвенного подтверждения химической структуры. Результаты масс-спектрометрического исследования в дальнейшем были использованы для детектирования предполагаемых метаболитов в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) при осуществлении

хроматографического анализа плазмы крови интактных крыс и животных, получавших соединение ВВР2023. С этой целью были подобраны условия хроматографирования, указанные в табл. 2.

Для оценки участия печени в биотрансформации соединения ВВР2023 на третьем этапе эксперимента у трех крыс было осуществлено оперативное вмешательство с целью исключения данного органа из системного кровотока. В зоне проведения операции у животных полностью удаляли шерсть с кожи, для премедикации подкожно вводили 0,1%-й раствор атропина сульфата («Дальхимфарм», Россия) в дозе 0,04 мг/кг. Крыс позиционировали на спине. Под наркозом, вызванным подкожным введением комбинации тилетамина гидрохлорида 5 мг, золазепам 5 мг (Золетил, Virbac, Франция) и ксилазина 4 мг («Нита-Фарм», Россия), производили верхнесрединную лапаротомию, петли кишечника извлекали, отводили влево, оборачивали салфетками, смоченными подогретым стерильным физиологическим раствором, устанавливали ранорасширитель Адсона. Выделяли воротную вену (*vena portae*) и чревный ствол (*truncus celiacus*), перевязывали нитью лавсан USP 3/0 («Медтехника», Россия) и пересекали между лигатурами (рис. 2). Важный момент при перевязке воротной вены — наложение лигатур до начала отхождения от нее ветвей, идущих в печень. После сосудистой

Таблица 2. Хроматографические параметры определения предполагаемых продуктов биотрансформации соединения ВВР2023

Хроматограф	Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, США)			
Хроматографическая колонка	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм			
Защитная колонка	Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 × 12,5 мм, 5 мкм			
Элюент А	Деионизированная вода + 0,1%-ная муравьиная кислота			
Элюент В	Ацетонитрил + 0,1%-ная муравьиная кислота			
Программа градиента	Время, мин	Скорость потока, мл/мин	% А	% В
	0,0		90	10
	1,0		90	10
	4,0		5	95
	8,0		5	95
	8,01		90	10
12,0	90	10		
Температура термостата колонки, °С	30			
Объем пробы, мкл	10			
Общая продолжительность анализа, мин	12			
Промывка инжектора	Через порт промывки, 3 с, 50%-й водный раствор метанола			

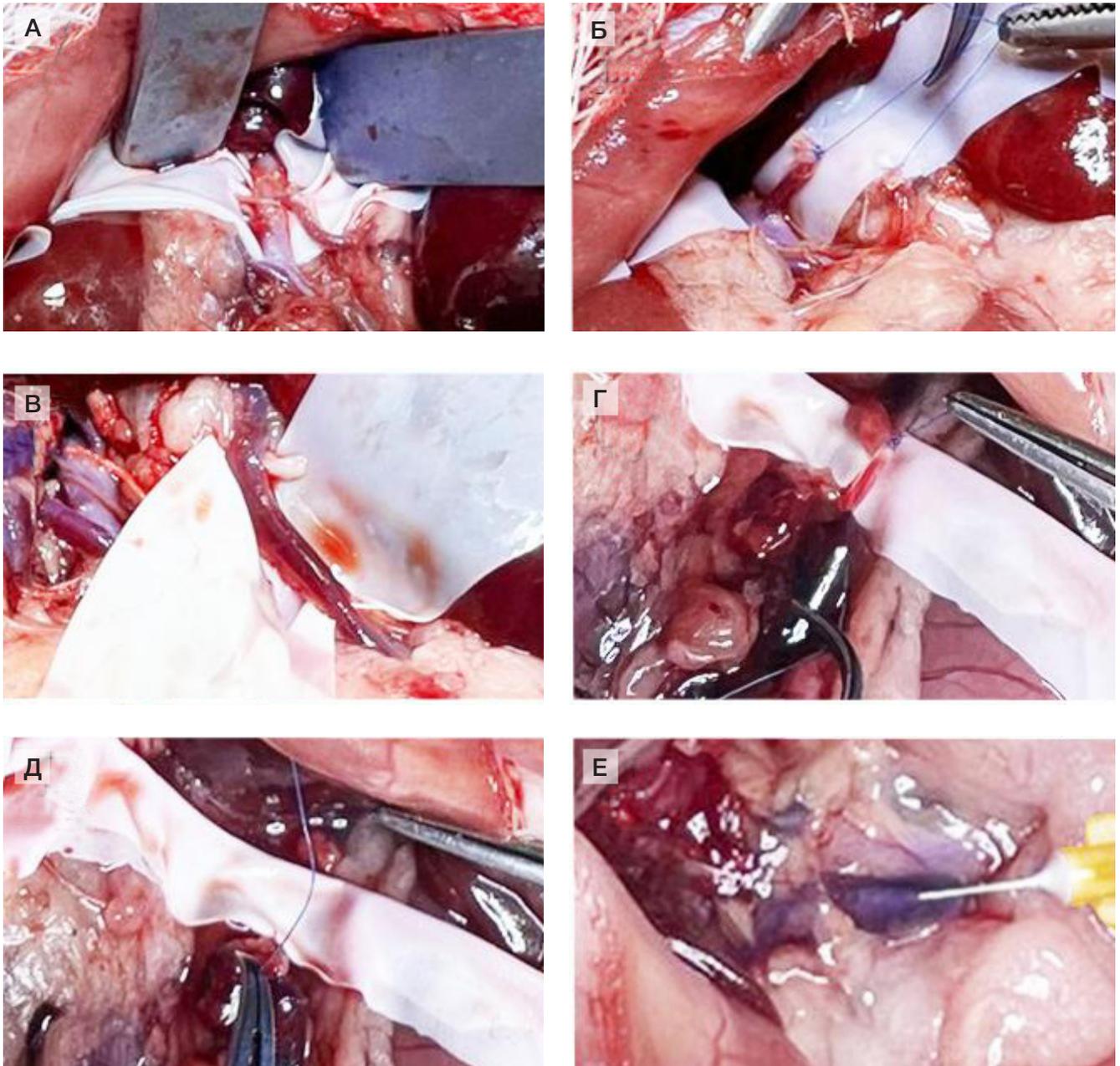


Рис. 2. Процесс сосудистой изоляции печени у крыс и внутривенное введение препарата BVP2023. **А.** Скелетизация брюшной аорты (*aorta abdominalis*) с чревным стволом (*truncus celiacus*) **Б.** Культы чревного ствола с наложенными на него лигатурами. **В.** Выделение воротной вены (*vena portae*). **Г.** Воротная вена с наложенными на нее лигатурами. **Д.** Пересечение воротной вены между лигатурами. **Е.** Введение препарата в нижнюю полую вену (*v. cava inferior*). Для повышения информативности в ходе проведения операции использовали контраст из стерильной латексной перчатки

изоляции печени в подпеченочный сегмент нижней полой вены (*vena cava inferior*) с помощью инсулинового шприца с иглой 30G (Inecta, Китай) вводили раствор (27,5 мг/мл) соединения BVP2023 в объеме 0,1 мл ($1/100 LD_{50}$), на место прокола накладывали гемостатическую губку («Лужский завод Белкозин», Россия). После достижения гемостаза лапаротомную рану ушивали послойно.

Через 3 ч после введения препарата производили забор крови из хвостовой вены крыс; получение и дальнейшую пробоподготовку плазмы осуществляли по ранее указанной методике. Обработанные образцы подвергали хроматографическому анализу с целью обнаружения метаболитов соединения BVP2023. Кроме того, выполняли исследование биоматериала, полученного от интактных крыс и ложнопериоперированных животных (без изоляции печени), которым внутривенно

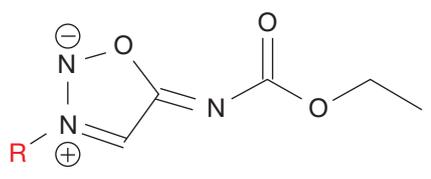
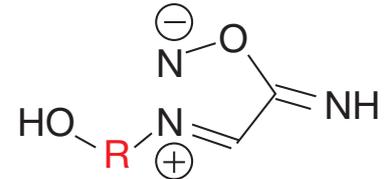
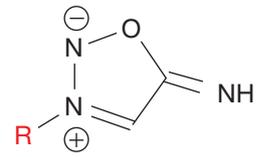
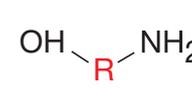
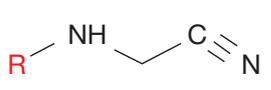
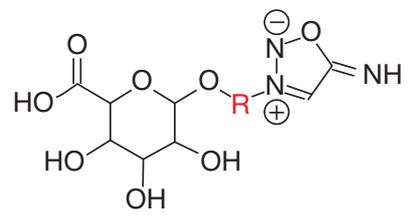
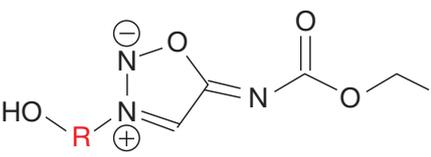
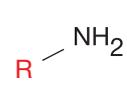
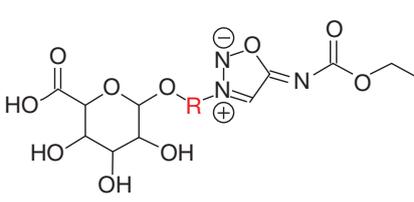
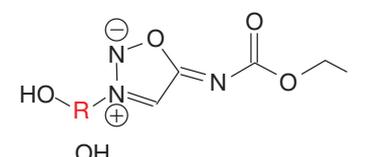
вводили препарат аналогичным образом. После забора крови животных подвергали эвтаназии с помощью ингаляции углекислого газа.

Обработку первичных данных хромато-масс-спектрометрического анализа выполняли с помощью встроеного программного обеспечения (ПО) AB Sciex Analyst 1.3.6 (AB Sciex, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате скрининга плазмы крови крыс, которым внутрижелудочно вводили исследуемый препарат, было выявлено наличие метаболита, представляющего собой соединение BVP2023, лишенное этоксикарбонильной группы. Кроме этого, обнаружен продукт, образующийся после отщепления монооксида азота (NO) от

Таблица 3. Структурные формулы идентифицированных метаболитов соединения ВВР2023 и MRM-переходы, используемые для детекции при хроматографическом анализе

Структурная формула	MRM-переход, m/z	Структурная формула	MRM-переход, m/z
	256,2/57,1 256,2/102,1		200,1/73,1 200,1/86,1
	184,1/57,1 184,1/86,1		132,1/114,1 132,1/86,1
	155,2/57,1 155,2/95,0		376,2/86,1 376,2/115,1 376,2/183,1
	272,2/102,1 272,2/73,1		
	116,1/57,1 116,1/99,1		448,2/255,2 448,2/158,1 448,2/102,1
	288,2/102,1 288,2/89,1		

Примечание: R — разветвленный предельный углеводородный радикал (C₇H₁₅).

вышеуказанной молекулы. Данный факт может косвенно свидетельствовать о предполагаемой фармакодинамике исследуемого соединения-лидера. Также в результате скрининга были выявлены моно- и дигидроксилированные производные вышеуказанных метаболитов и исходного соединения, а также эфиры этих соединений с глюкуроновой кислотой (табл. 3). Некоторые выявленные метаболиты были синтезированы и использованы в качестве стандартов для постановки методики и последующего проведения хроматографического анализа. Совпадение времени удерживания данных соединений подтверждает правильность их идентификации на этапе скрининга.

По результатам исследования плазмы интактных крыс не выявлено хроматографических пиков, соответствующих соединению ВВР2023 и его метаболитам, что подтверждает селективность разработанной методики идентификации. Анализ образцов плазмы ложнооперированных животных (без изолирования печени), которым внутривенно вводили исследуемое соединение в дозе 1/100 LD₅₀ за 3 ч до забора крови, позволил обнаружить хроматографические

сигналы всех выявленных на втором этапе продуктов биотрансформации (рис. 3).

Результаты хроматографического анализа плазмы крови крыс, которые получали АФС ВВР2023 в аналогичной дозе после осуществления сосудистой изоляции печени, подтвердили наличие сигнала, соответствующего исходному соединению. При этом площадь хроматографического пика превышала таковую при анализе биоматериала, полученного от ложнооперированных животных, в среднем в 2,8 раз. Кроме того, выявлено отсутствие пиков, соответствующих ранее обнаруженным продуктам биотрансформации соединения ВВР2023 (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты позволяют сделать заключение о непосредственном участии печени в образовании идентифицированных метаболитов соединения ВВР2023 у крыс. Важным фактором при осуществлении вышеописанного эксперимента было использование абсолютно здоровых животных, так как любые

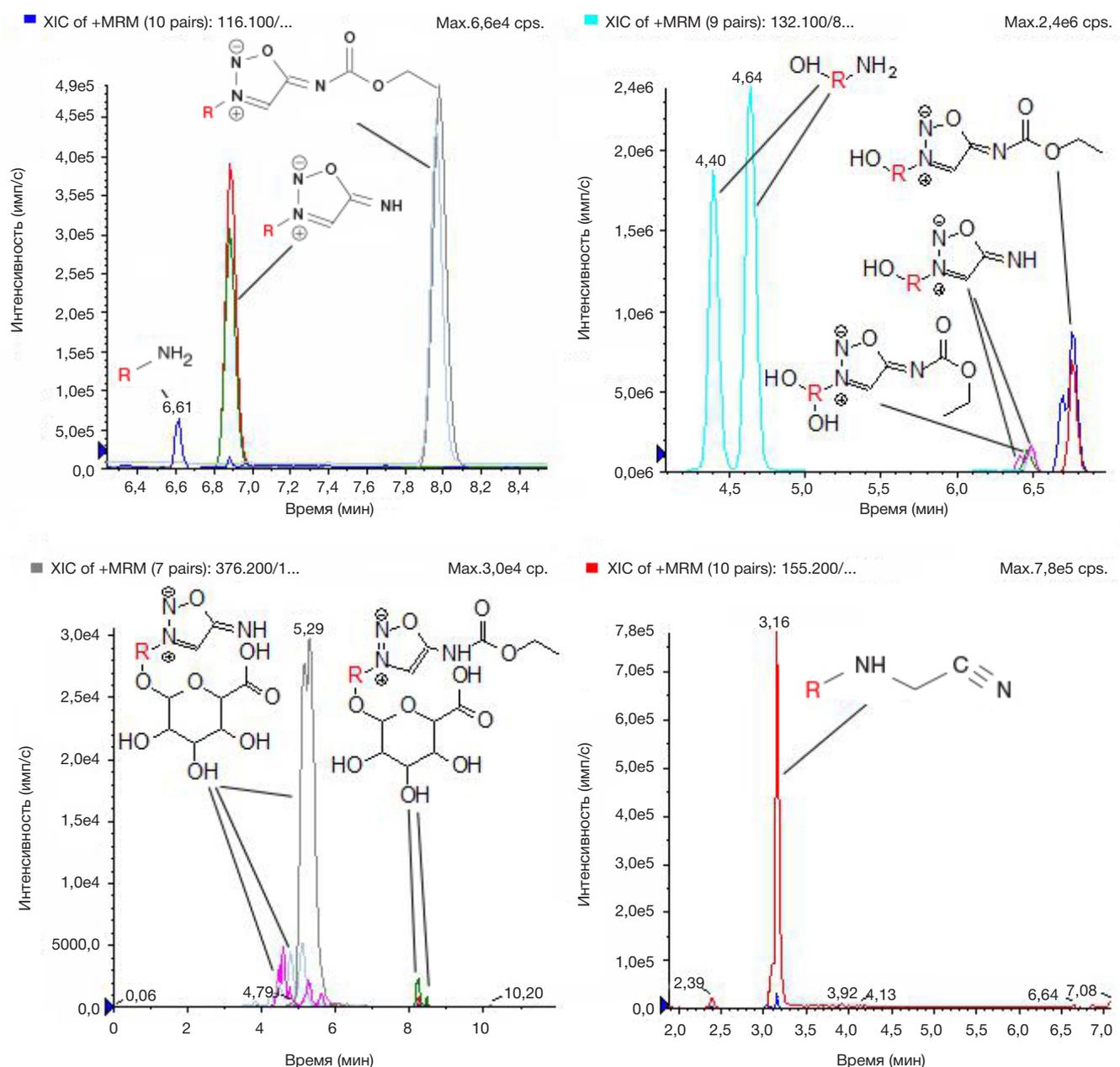


Рис. 3. Фрагменты хроматограмм плазмы крови ложнооперированных крыс, которым внутривенно вводили соединение ВВР2023 в дозе 1/100 LD₅₀. R — разветвленный предельный углеводородный радикал (C₇H₁₅)

повреждения гепатоцитов, приводящие к появлению в плазме крови печеночных ферментов, могут существенно повлиять на достоверность полученных результатов. Одним из недостатков данного подхода является невозможность исследовать препараты, имеющие исключительно энтеральные лекарственные формы. Попадание изучаемого вещества в системный кровоток в этом случае невозможно по причине наложения лигатуры на воротную вену. Кроме того, при проведении данного эксперимента следует учитывать возможное взаимодействие лекарственного кандидата с компонентами наркоза.

Одним из вариантов реализованного подхода является использование временного ограничения кровотока через печень путем наложения хирургических клипс на соответствующие сосуды. Через определенное время после введения препарата осуществляется забор крови с последующим восстановлением кровотока. Повторное взятие крови через установленный временной интервал с дальнейшим анализом плазмы на предмет наличия

метаболитов позволит учитывать индивидуальные особенности животного в биотрансформации конкретного лекарственного кандидата. Вероятно, подобный подход может быть реализован и в отношении других органов, например почек.

ВЫВОДЫ

Предложенный в настоящем исследовании подход к оценке участия печени в биотрансформации кандидатных молекул на ранних этапах разработки лекарственных средств является универсальным и информативным. Он может быть использован как самостоятельный прием изучения метаболизма *in vivo*, так и в дополнении к широко применяемым методам *in vitro*. Полученные в ходе реализации данного подхода результаты могут служить основой для прогнозирования фармакокинетики, эффективности и безопасности лекарственных средств.

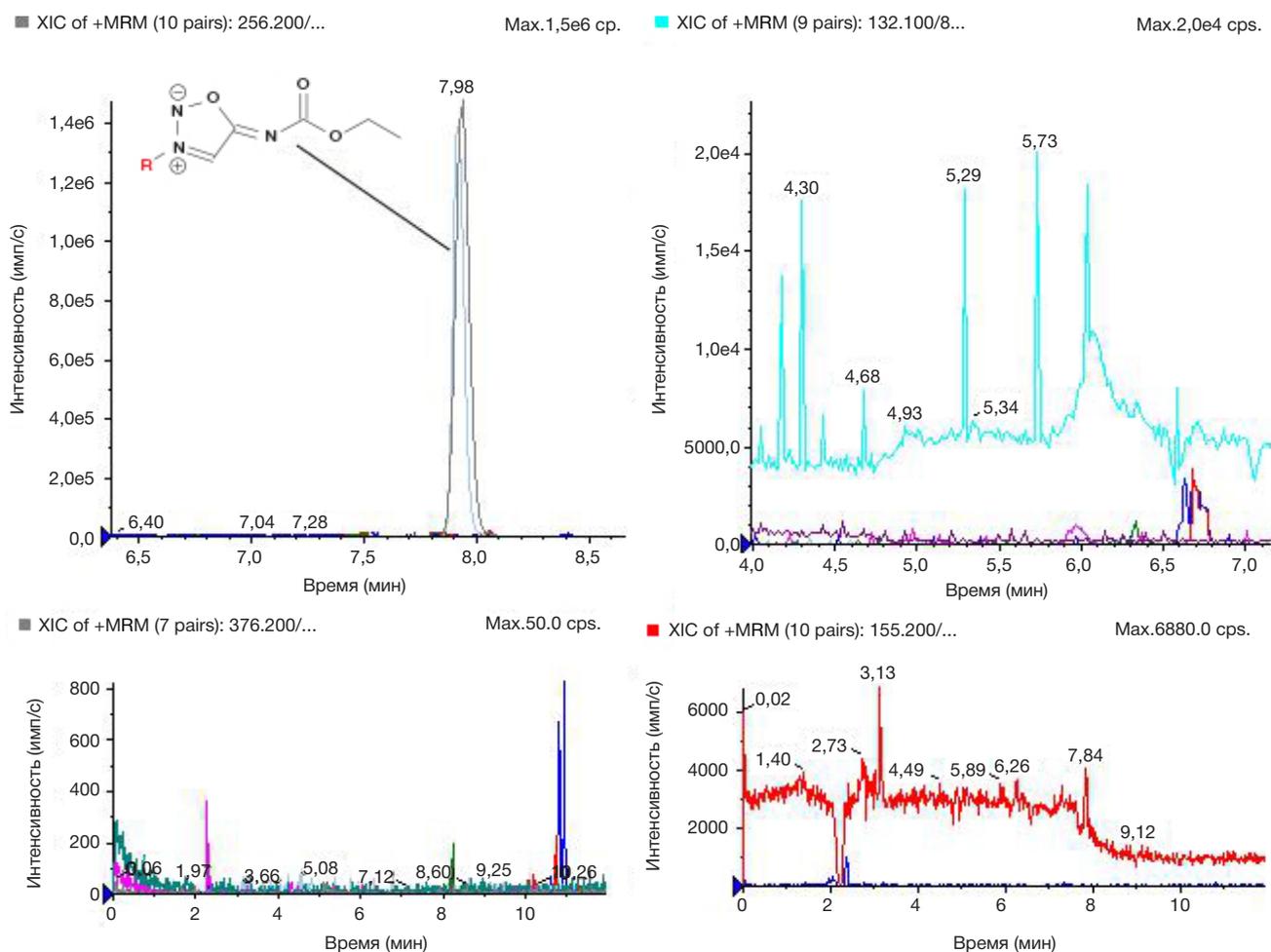


Рис. 4. Фрагменты хроматограмм плазмы крови крыс с сосудистой изоляцией печени, получавших внутривенно соединение ВВР2023 в дозе 1/100 LD₅₀. R — разветвленный предельный углеводородный радикал (C₇H₁₅)

Литература

- Shanu-Wilson J, Evans L, Wrigley S, Steele J, Atherton J, Boer J. Biotransformation: impact and application of metabolism in drug discovery. *ACS Medicinal Chemistry Letter*. 2020; 11 (11): 2087–2107. DOI: 10.1021/acsmchemlett.0c00202.
- Baillie TA, Rettie AE. Role of biotransformation in drug-induced toxicity: influence of intra- and inter-species differences in drug metabolism. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2011; 26 (1): 15–29. DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-10-RV-089.
- Obach RS. Pharmacologically active drug metabolites: impact on drug discovery and pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*. 2013; 65 (2): 578–640. DOI: 10.1124/pr.111.005439.
- Fura A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. *Drug discovery today*. 2006; 11 (3–4): 133–42. DOI: 10.1016/S1359-6446(05)03681-0.
- Mahanur V, Rajge R, Tawar MA. Review on emerging oral dosage forms which helps to bypass the hepatic first pass metabolism. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*. 2022; 12 (1): 47–52. DOI: 10.52711/2231-5713.2022.00009.
- Klomp F, Wenzel C, Drozdziak M, Oswald S. Drug–drug interactions involving intestinal and hepatic CYP1A enzymes. *Pharmaceutics*. 2020; 12 (12): 1201. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121201.
- Cerny MA, Kalgutkar AS, Obach RS, Sharma R, Spracklin DK, Walker GS. Effective application of metabolite profiling in drug design and discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020; 63 (12): 6387–406. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01840.
- Rai M, Paudel N, Sakhrie M, Gemmati D, Khan IA, Tisato V, Singh AV. Perspective on quantitative structure–toxicity relationship (QSTR) models to predict hepatic biotransformation of xenobiotics. *Livers*. 2023; 3 (3): 448–62. DOI: 10.3390/livers3030032.
- Peeters L, Vervliet P, Foubert K, Hermans N, Pieters L, Covaci A. A comparative study on the in vitro biotransformation of medicagenic acid using human liver microsomes and S9 fractions. *Chemico-Biological Interactions*. 2020; 328: 109192. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109192.
- Horspool AM, Wang T, Scaringella YS, Taub ME, Chan TS. Human liver microsomes immobilized on magnetizable beads: a novel approach to study in vitro drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*. 2020; 48 (8): 645–654. DOI: 10.1124/dmd.120.090696.
- Ooka M, Lynch C, Xia M. Application of in vitro metabolism activation in high-throughput screening. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21 (21): 8182. DOI: 10.3390/ijms21218182.
- Knights KM, Stresser DM, Miners JO, Crespi CL. In vitro drug metabolism using liver microsomes. *Current protocols in pharmacology*. 2016; 74 (1): 7–8. DOI: 10.1002/cpph.9.
- Venkatakrishnan K, von Moltke LL, Greenblatt DJ. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2001; 41 (11): 1149–79. DOI: 10.1177/00912700122012724.
- Pelkonen O, Raunio H. In vitro screening of drug metabolism during drug development: can we trust the predictions? *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2005; 1 (1): 49–59. DOI: 10.1517/17425255.1.1.49.

15. Zhu C, Wan M, Cheng H, Wang H, Zhu M, Wu C. Rapid detection and structural characterization of verapamil metabolites in rats by UPLC–MSE and UNIFI platform. *Biomedical Chromatography*. 2020; 34 (1): e4702. DOI: 10.1002/bmc.4702.
16. Lee K, Lee JY, Lee K, Jung CR, Kim MJ, Kim JA, Oh SJ. Metabolite profiling and characterization of LW6, a novel HIF-1 α inhibitor, as an antitumor drug candidate in mice. *Molecules*. 2021; 26 (7): 1951. DOI: 10.3390/molecules26071951.

References

- Shanu-Wilson J, Evans L, Wrigley S, Steele J, Atherton J, Boer J. Biotransformation: impact and application of metabolism in drug discovery. *ACS Medicinal Chemistry Letter*. 2020; 11 (11): 2087–2107. DOI: 10.1021/acsmchemlett.0c00202.
- Baillie TA, Rettie AE. Role of biotransformation in drug-induced toxicity: influence of intra-and inter-species differences in drug metabolism. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2011; 26 (1): 15–29. DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-10-RV-089.
- Obach RS. Pharmacologically active drug metabolites: impact on drug discovery and pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*. 2013; 65 (2): 578–640. DOI: 10.1124/pr.111.005439.
- Fura A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. *Drug discovery today*. 2006; 11 (3–4): 133–42. DOI: 10.1016/S1359-6446(05)03681-0.
- Mahanur V, Rajge R, Tawar MA. Review on emerging oral dosage forms which helps to bypass the hepatic first pass metabolism. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*. 2022; 12 (1): 47–52. DOI: 10.52711/2231-5713.2022.00009.
- Klomp F, Wenzel C, Drozdziak M, Oswald S. Drug–drug interactions involving intestinal and hepatic CYP1A enzymes. *Pharmaceutics*. 2020; 12 (12): 1201. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121201.
- Cerny MA, Kalgutkar AS, Obach RS, Sharma R, Spracklin DK, Walker GS. Effective application of metabolite profiling in drug design and discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020; 63 (12): 6387–406. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01840.
- Rai M, Paudel N, Sakhrie M, Gemmati D, Khan IA, Tisato V, Singh AV. Perspective on quantitative structure–toxicity relationship (QSTR) models to predict hepatic biotransformation of xenobiotics. *Livers*. 2023; 3 (3): 448–62. DOI: 10.3390/livers3030032.
- Peeters L, Vervliet P, Foubert K, Hermans N, Pieters L, Covaci A. A comparative study on the in vitro biotransformation of medicagenic acid using human liver microsomes and S9 fractions. *Chemico-Biological Interactions*. 2020; 328: 109192. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109192.
- Horspool AM, Wang T, Scaringella YS, Taub ME, Chan TS. Human liver microsomes immobilized on magnetizable beads: a novel approach to study in vitro drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*. 2020; 48 (8): 645–654. DOI: 10.1124/dmd.120.090696.
- Ooka M, Lynch C, Xia M. Application of in vitro metabolism activation in high-throughput screening. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21 (21): 8182. DOI: 10.3390/ijms21218182.
- Knights KM, Stresser DM, Miners JO, Crespi CL. In vitro drug metabolism using liver microsomes. *Current protocols in pharmacology*. 2016; 74 (1): 7–8. DOI: 10.1002/cpph.9.
- Venkatakrishnan K, von Moltke LL, Greenblatt DJ. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2001; 41 (11): 1149–79. DOI: 10.1177/00912700122012724.
- Pelkonen O, Raunio H. In vitro screening of drug metabolism during drug development: can we trust the predictions? *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2005; 1 (1): 49–59. DOI: 10.1517/17425255.1.1.49.
- Zhu C, Wan M, Cheng H, Wang H, Zhu M, Wu C. Rapid detection and structural characterization of verapamil metabolites in rats by UPLC–MSE and UNIFI platform. *Biomedical Chromatography*. 2020; 34 (1): e4702. DOI: 10.1002/bmc.4702.
- Lee K, Lee JY, Lee K, Jung CR, Kim MJ, Kim JA, Oh SJ. Metabolite profiling and characterization of LW6, a novel HIF-1 α inhibitor, as an antitumor drug candidate in mice. *Molecules*. 2021; 26 (7): 1951. DOI: 10.3390/molecules26071951.

КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ ПАЦИЕНТА С ЧЕТЫРЬМА ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННЫМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ И ТОЛСТОЙ КИШКИ

Е. С. Попова¹✉, А. Н. Агбальян¹, В. Д. Титов¹, В. П. Моисеева¹, С. В. Машин², В. А. Анфимиади¹, Г. М. Жуков¹, А. О. Бондаревская¹, Л. М. Гаврилюк¹

¹ Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

В настоящее время одной из сложных и малоизученных проблем онкологии является возникновение первично-множественных злокачественных опухолей. После установления диагноза злокачественного новообразования у пациентов возрастает риск появления новой первичной неметастатической опухоли. В статье представлено клиническое наблюдение пациента с четырьмя первично-множественными злокачественными опухолями двенадцатиперстной и толстой кишки. Через 9 месяцев после панкреатодуоденальной резекции рака двенадцатиперстной кишки, фотодинамической терапии и 12 курсов ПХТ возник синхронный рак слепой кишки и ректосигмоидного соединения. Проведено 8 курсов химиотерапии капецитобином, на фоне которой отмечено прогрессирование процесса, и 16 курсов ПХТ. Спустя 2 года возник рак прямой кишки, по поводу которого выполнили резекцию прямой кишки, 4 курса ПХТ и таргетную терапию. Данный клинический случай акцентирует внимание на необходимости дополнительных исследований в области терапии пациентов с синхронными или метасинхронными первичными множественными опухолями, обеспечение своевременной диагностики и мультидисциплинарного подхода к лечению у онкологических пациентов.

Ключевые слова: аденокарцинома двенадцатиперстной кишки, аденокарцинома прямой кишки, аденокарцинома ректосигмоидного соединения, аденокарцинома слепой кишки, первично-множественные злокачественные опухоли

Вклад авторов: Е. С. Попова, В. Д. Титов — написание статьи, редактирование; Г. М. Жуков, А. Н. Агбальян — анализ данных, обзор литературы, написание статьи; А. О. Бондаревская, Л. М. Гаврилюк — сбор данных, обзор литературы, написание статьи; С. В. Машин, В. А. Анфимиади — концепция и дизайн, обзор литературы, написание статьи; В. П. Моисеева — обзор литературы, написание и редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: пациент подписал добровольное информированное согласие на публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Сергеевна Попова
ул. 26 линия, 35/2, г. Ростов-на-Дону, 344037, Россия; popovaekse@mail.ru

Статья получена: 07.04.2025 **Статья принята к печати:** 19.05.2025 **Опубликована онлайн:** 27.05.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.028

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CASE REPORT OF THE PATIENT WITH FOUR MULTIPLE PRIMARY MALIGNANT TUMORS IN THE DUODENUM AND COLON

Popova ES¹✉, Agbalyan AN¹, Titov VD¹, Moiseeva VP¹, Mashin SV², Anfimiadi VA¹, Zhukov GM¹, Bondarevskaya AO¹, Gavriilyuk LM¹

¹ Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Currently, the occurrence of multiple primary malignant tumors is one of the complex and poorly understood issues of oncology. After the diagnosis of malignant neoplasm is established, the risk of a new primary, non-metastatic tumor increases in a patient. The paper presents a case report of the patient with four multiple primary malignant tumors in the duodenum and colon. Synchronous cancer of the cecum and rectosigmoid junction occurred after 9 months of the duodenal cancer pancreaticoduodenal resection, photodynamic therapy, and 12 multiagent chemotherapy courses. The patient received 8 courses of chemotherapy with capecitabine, during which cancer progression was reported, and 16 multiagent chemotherapy courses. Two years later rectal cancer occurred, due to which rectal re-resection was conducted, along with 4 multiagent chemotherapy courses and target therapy. This clinical case emphasizes that it is necessary to perform additional assessment when treating patients with synchronous or metachronous multiple primary tumors to ensure the timely diagnosis and multidisciplinary approach to treatment of cancer patients.

Keywords: duodenal adenocarcinoma, rectal adenocarcinoma, rectosigmoid adenocarcinoma, cecal adenocarcinoma, multiple primary malignant tumors

Author contribution: Popova ES, Titov VD — manuscript writing, editing; Zhukov GM, Agbalyan AN — data analysis, literature review, manuscript writing; Bondarevskaya AO, Gavriilyuk LM — data acquisition, literature review, manuscript writing; Mashin SV, Anfimiadi VA — concept and design, literature review, manuscript writing; Moiseeva VP — literature review, manuscript writing and editing.

Compliance with ethical standards: the patient submitted the informed consent for publication of anonymized personal medical data.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina S. Popova
26 Liniya, 35/2, Rostov-on-Don, 344037, Russia; popovaekse@mail.ru

Received: 07.04.2025 **Accepted:** 19.05.2025 **Published online:** 27.05.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.028

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

После установления диагноза злокачественного новообразования у пациентов возрастает риск появления новой первичной нематастатической опухоли (первично-множественной злокачественной опухоли, ПМЗО). ПМЗО встречается у 2–17% людей, которые прошли лечение по поводу первой опухоли; риск возникновения ПМЗО у них возрастает в 1,1–1,6 раза по сравнению с общей популяцией [1]. Первое упоминание о ПМЗО датируется 1793 годом, когда J. Pearson описал случай метакронного рака обеих молочных желез и матки [2]. В 1947 г. Н. Н. Петров внес описание критериев первичной множественности в первое советское руководство по клинической онкологии: «опухоли не должны быть метастатическими, занесенными по току лимфы, крови или по серозным полостям, ни отпечатками, развившимися от соприкосновения» [3].

В настоящее время используют два наиболее распространенных определения, представленные в проекте Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) и International Association of Cancer Registries and International Agency for Research on Cancer (IACR/IARC). Согласно рекомендациям базы данных SEER, для разграничения синхронных и метакронных ПМЗО следует использовать двухмесячный интервал. В то же время Международное агентство по изучению рака (IARC) предлагает считать опухоли синхронными, если они диагностированы с интервалом менее 6 месяцев (или метакронными при интервале более 6 месяцев) при условии, что они локализируются в разных органах [4].

Рак тонкого кишечника (РТК) относится к редким злокачественным опухолям: его выявляют приблизительно в 0,6% случаев возникновения онкозаболеваний и в 3–6% случаев опухолей ЖКТ; смертность от РТК составляет 0,3% от общего числа летальных исходов у онкопациентов в мире. В 31,6% случаев РТК диагностируют на ранней стадии развития. Общая выживаемость в течение 5 лет в случае локализованного рака тонкого кишечника достигает 84,8%. Согласно статистическим данным, в период с 2012 по 2021 г. средний ежегодный рост новых случаев РТК составил 2,2%, а с 2013 по 2022 г. уровень смертности увеличивался в среднем на 2% в год [5, 6]. Первичные злокачественные опухоли двенадцатиперстной кишки возникают редко. Они составляют примерно 61% от всех случаев рака тонкого кишечника [7]. Согласно данным ВОЗ, колоректальный рак (КРР) занимает 2-е место среди причин смертности от онкологических заболеваний в мире. В 2020 г. было зарегистрировано свыше 1,9 млн новых случаев КРР, а число смертей от этого заболевания превысило 930 000 случаев [7].

Авторы одного из ретроспективных исследований проанализировали 55 случаев КРР [8] и отметили, что рак желудка был наиболее часто встречающимся злокачественным образованием, связанным с КРР (20% случаев). Далее по частоте встречаемости расположились рак пищевода, рак матки и рак легких, и лишь у одного пациента был диагностирован рак двенадцатиперстной кишки, который выявили первым, а КРР — более чем через 6 месяцев [8].

В данной статье представлено клиническое наблюдение пациента с четырьмя первично-множественными злокачественными опухолями двенадцатиперстной и толстой кишки.

Описание клинического случая

Пациентка Л., 56 лет, находится в онкологическом диспансере г. Азова. В 2020 г. при обследовании, в связи

с наличием жалоб на снижение веса, желтушность кожных покровов, а также зуд, была выявлена опухоль двенадцатиперстной кишки (по данным ФГДС от 10.08.2020): инфильтративно-язвенный с-г залуковичных отделов двенадцатиперстной кишки, в биоптатах определена умеренно-дифференцированная аденокарцинома, МРТ-картина опухолевого поражения стенок двенадцатиперстной кишки, головки поджелудочной железы и парапанкреатической клетчатки. Данных, подтверждающих другие ЗНО, при обследовании получено не было; на фиброколоноскопии от 10.08.2020 на 30 см от ануса выявлен полип. Установлен диагноз: рак двенадцатиперстной кишки, cT4N0M0, стадия IIb, клиническая группа 2, механическая желтуха. Чрескожная чреспеченочная холангиостомия была выполнена 13.08.2020, и после нормализации показателей билирубина (общий билирубин 8,8 мкмоль/л) и предоперационной подготовки 21.08.2020 было выполнено оперативное вмешательство в следующем объеме: лапаротомия, гастропанкреатодуоденальная резекция, холецистэктомия с сеансом интраоперационной фотодинамической терапии на ложе удаленной опухоли. Послеоперационный период протекал без осложнений, пациентке проводили сопроводительную послеоперационную фармакотерапию, в том числе антибиотико- и тромبوпротективную.

После гистологического исследования операционного материала от 28.08.2020 получено заключение: низкодифференцированная аденокарцинома G3 — high grade с изъязвлением слизистой оболочки, прорастанием всех слоев стенки кишки, инвазией в ткань поджелудочной железы, очагами некроза, лимфоидной инфильтрацией по периферии опухоли, инвазией периневральных пространств, наличием опухолевых эмболов в лимфатических и кровеносных сосудах. В 12 исследованных лимфатических узлах выявлены синусовый гистиоцитоз, фолликулярная гиперплазия. Вне опухоли в стенке кишки — хроническое воспаление. Вне опухоли поджелудочной железы — эктазированные ацинусы с расширенным просветом. Линия резекции без признаков опухолевого роста (рис. 1).

Установлен диагноз: рак двенадцатиперстной кишки с прорастанием в поджелудочную железу pT4bN0M0 st. IIb, клиническая группа 2.

Согласно консультации химиотерапевта от 15.09.2020, при удовлетворительном состоянии больной, показателях общего и биохимического анализов крови в пределах

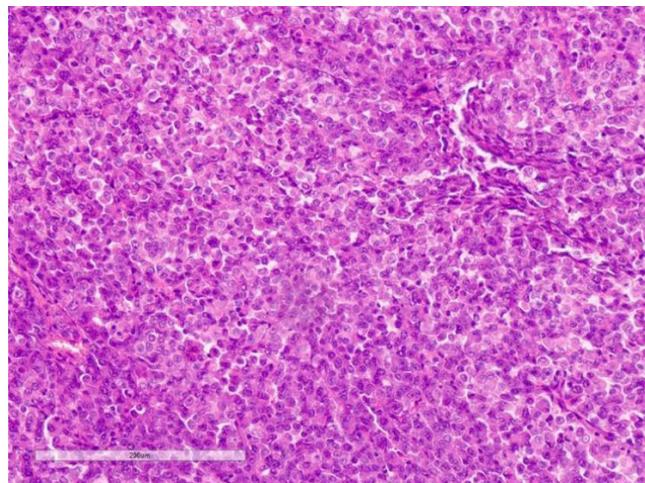


Рис. 1. Операционный материал: низкодифференцированная аденокарцинома двенадцатиперстной кишки, G3

нормы, после консультации терапевта и кардиолога (при отсутствии противопоказаний) пациентке рекомендуется проведение в течение 6 месяцев после оперативного вмешательства адьювантной полихимиотерапии (ПХТ) по схеме FOLFOX-6: оксалиплатин 85 мг/м² двухчасовая инфузия в 1-й день, лейковарин 400 мг/м² внутривенно в течение 2 ч с последующим болюсом 5-фторурацила 400 мг/м² внутривенно струйно и 46-часовой инфузией 5-фторурацила 2400 мг/м². Интервал 14 дней. С октября по март 2021 г. было проведено 12 курсов адьювантной ПХТ по схеме FOLFOX-6.

Практически сразу после завершения многокурсовой ПХТ появились жалобы на запоры, тенезмы, выделения слизи из прямой кишки при дефекации, слабость. По данным фиброколоноскопии (ФКС) 29.04.2021, были выявлены две опухоли: ректосигмоидного соединения и восходящей ободочной кишки. Заключение после гистологического исследования от 17.05.2021: G2 аденокарцинома (восходящая ободочная кишки), G2 аденокарцинома (ректосигмоидное соединение). Результаты УЗИ органов брюшной полости (ОБП) от 29.04.2021: структурные изменения лимфатических узлов по брюшине слева. Результаты спиральной компьютерной томографии (СРКТ) ОБП от 18.05.2021: диффузные изменения печени, состояние после панкреатодуоденальной резекции.

Выполнено оперативное вмешательство 31.05.2021 в следующем объеме: правосторонняя гемиколэктомия, передне-верхняя резекция прямой кишки. Послеоперационный период протекал без осложнений. Заключение по результатам гистологического исследования операционного материала от 07.06.2021: в слепой кишке G2 аденокарцинома с инвазией до субсерозного слоя; при исследовании региональных лимфоузлов в шести из них выявлено метастатическое поражение, в ректосигмоидном соединении обнаружена G2 аденокарцинома с инвазией мышечного слоя, в 8 региональных лимфатических узлах метастазов не выявлено. Линии резекции без признаков опухолевого роста. Пациентка выписана в удовлетворительном состоянии (ECOG-1).

Установлен диагноз «первично-множественный метакхронный рак»: рак слепой кишки pT2N1M0 st. III, клиническая группа 2, рак ректосигмоидного соединения pT2N0M0 st. I, клиническая группа 2, рак двенадцатиперстной кишки с прорастанием в поджелудочную железу pT4bN0M0 st. IIb; 12 курсов АПХТ.

Согласно консультации химиотерапевта от 12.06.2021 пациентке рекомендовано проведение курсов химиотерапии капецитабином. С июля 2021 г. по январь 2022 г. было проведено 8 курсов химиотерапии капецитабином. На момент проведения лечения состояние пациентки оценивали как 0–1 балла по шкале ECOG, курсы лечения сопровождалась гастроэнтероколитом 1-й степени. Проводили плановое диспансерное наблюдение согласно предусмотренному регламенту.

В мае 2022 г., спустя 1 год после оперативного лечения по поводу колоректальных злокачественных новообразований, при очередном диспансерном наблюдении и выполнении СРКТ ОБП наблюдались увеличение парааортальных лимфатических узлов размером до 16 мм с нечеткими контурами, «мутная» брыжейка, отсутствие свободной жидкости в брюшной полости, что было расценено как метастатическое поражение забрюшинных лимфатических узлов.

Консилиум врачей принял решение о проведении лекарственной противоопухолевой терапии по схеме FOLFIRI. С июня по август 2022 г. проведено 5 курсов ПХТ по схеме FOLFIRI: иринотекан 180 мг/м² 300 мг в 1 день,

кальция фолинат 680 мг в 1 день (400 мг/м²), 5 фторурацил 680 мг в 1 день, 5 фторурацил 4100 мг внутривенно капельно через микроинфузионную помпу за 46 ч (2400 мг/м²).

Были выполнены СРКТ ОБП и ОМТ от 20.09.2022, выявлено метастатическое поражение. С 03.10.2022 по 14.12.2022 пациентке провели 6 курсов ПХТ по схеме FOLFIRI.

По результатам СРКТ ОГК, ОБП, ОМТ от 23.01.2023 сделано заключение о прогрессировании процесса в связи с метастатическим поражением забрюшинных и брыжеечных лимфатических узлов.

В феврале 2023 г. назначен таргетный препарат Афлиберцепт (ингибитор опухолевого ангиогенеза), с февраля по июль 2023 г. проведено 5 курсов ПХТ по схеме FOLFIRI + таргетная терапия (афлиберцепт 4 мг/кг 260 мг в/в капельно в один день).

На фоне проведения химиотерапии пациентка отмечала ухудшение самочувствия (тошнота, зуд, слабость). В сентябре 2023 г. при выполнении плановой ФКС был обнаружен полип поперечной ободочной кишки и произведено его эндоскопическое удаление. В феврале 2024 г. у пациентки вновь появились боли в животе, а также выделения крови и слизи при дефекации. В апреле 2024 г. при выполнении ФКС по месту жительства выявлена четвертая по счету злокачественная опухоль с локализацией в прямой кишке на расстоянии 8 см от ануса, проксимальнее которой на 13 см от ануса был расположен ранее сформированный кишечный анастомоз без признаков опухолевой инфильтрации. При гистологическом исследовании была выявлена умеренно-дифференцированная аденокарцинома G2. При выполнении СРКТ ОБП от 24.04.2024 обнаружены утолщение стенок ректосигмоидного соединения, забрюшинная лимфаденопатия.

С учетом того что ранее проведено более 30 курсов химиотерапии, принято решение о хирургическом лечении. 14.05.2024 было выполнено оперативное вмешательство в объеме передней резекции прямой кишки. При гистологическом исследовании операционного материала от 28.05.2024 в стенке прямой кишки диагностирована аденокарцинома G2 с воспалением, изъязвлением, кровоизлияниями. Опухоль инфильтрирует слизистый слой, подслизистый слой, мышечный слой, прорастает в параректальную жировую клетчатку, с перинеуральной инвазией, инвазией в кровеносные сосуды. Признаков инвазии в лимфатические сосуды не обнаружено. Линии резекции (дистальная и проксимальная) без признаков опухолевого роста. В 12 лимфатических узлах, выделенных из региональной жировой клетчатки, элементов опухоли не обнаружено (рис. 2).

Первично-множественный синхронно-метакхронный рак средне-ампулярного отдела прямой кишки pT3N0M0, st. IIa, резекция прямой кишки, рак двенадцатиперстной кишки pT4bN0M0, st. IIb, панкреатодуоденальная резекция, интраоперационная фотодинамическая терапия (ФДТ) в 2020 г., 12 курсов адьювантной полихимиотерапии (АПХТ), рак слепой кишки pT2N1M0 st. III, рак ректосигмоидного соединения pT2N0M0 st. I. Проведены правосторонняя гемиколэктомия и передняя резекция прямой кишки в 2021 г., 8 курсов монотерапии капецитабином и 16 курсов ПХТ.

Согласно консультации химиотерапевта от 26.05.2024 показано проведение лекарственной противоопухолевой терапии по схеме FOLFIRI + таргетная терапия афлиберцептом. Начало очередного курса на 15-й день.

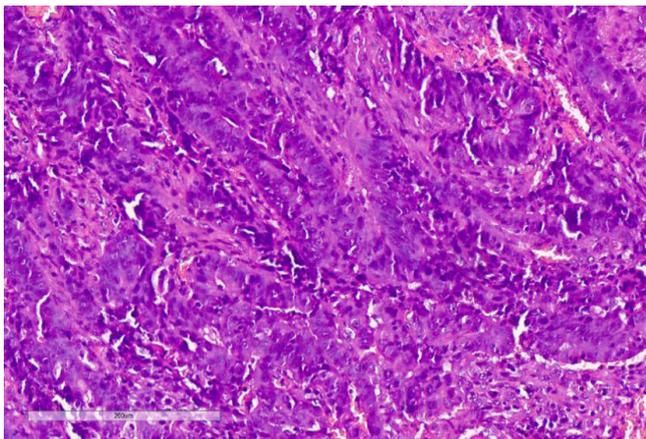


Рис. 2. Операционный материал. Умеренно-дифференцированная аденокарцинома, G2

С июня по август 2024 г. было проведено 4 курса лекарственной противоопухолевой терапии по схеме FOLFIRI + таргетная терапия афлиберцептом.

Во время проведения курсов химиотерапии пациентка оценивала свое состояние как удовлетворительное, отмечала повышенную утомляемость, периодически возникающую тошноту.

Обсуждение клинического случая

Причины возникновения ПМЗО на сегодняшний день до конца не изучены. Предполагается, что на них влияет несколько факторов, таких как: прогресс в ранней диагностике и лечении злокачественных новообразований, скрининг, а также плановые диагностические исследования после выявления первой опухоли, за счет чего происходят выявляемость второй и последующих опухолей и увеличение жизни онкологических пациентов. Важно подчеркнуть и раннее применение специфического противоопухолевого лечения, в особенности тех методов, которые оказывают повреждающее действие на ДНК (лучевая и химиотерапия) и используемые при лечении первого злокачественного новообразования, — снижение иммунного статуса на фоне данного лечения может стать «почвой» для развития последующих опухолей [9], кроме

того, существенную роль могут играть генетическая предрасположенность, а также воздействие факторов окружающей среды.

В рамках ретроспективного исследования на базе корейского онкологического центра были проанализированы данные 96 174 взрослых пациентов, у которых в период с 2003 по 2022 г. был выявлен первый случай рака. У 87 338 из них диагностирован один первичный случай злокачественной опухоли, а у 8836 пациентов (9% от общего числа) было выявлено два или более новообразования. Анализ медианы без возникновения новой опухоли показал, что у 44% пациентов с множественными первичными опухолями вторая злокачественная опухоль была выявлена в течение 1–5 лет после первой. Аналогичная тенденция наблюдалась и для последующих случаев: 40% третьих и 42% четвертых первичных опухолей были диагностированы в течение 1–5 лет после предыдущего диагноза. При этом для последующих случаев рака отмечалось сокращение времени появления новых опухолей: медиана интервала между появлением первой и второй злокачественными опухолями составила 4,1 года, между второй и третьей — 2,1 года, а между третьей и четвертой — 1,6 года [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данный клинический случай акцентирует внимание на важности продолжительного наблюдения и регулярных обследований для раннего выявления новых злокачественных опухолей после завершения лечения по поводу первого злокачественного новообразования. Своевременная диагностика и активное хирургическое лечение могут значительно улучшить прогноз у данных пациентов. В связи с этим, для выявления новых злокачественных образований у данных пациентов крайне важно организовать систематическое и долгосрочное медицинское наблюдение. Требуются дополнительные исследования, особенно в области терапии пациентов с синхронными или метакронными множественными первичными опухолями. Кроме того, необходимо более детально изучить влияние предшествующего лечения на прогноз, эффективность противоопухолевой терапии и потенциальные токсические эффекты.

Литература

- Vogt A, Schmid S, Heinimann K, et al. Multiple primary tumours: challenges and approaches, a review. *ESMO*. 2017; 2; 2 (2): e000172. DOI: 10.1136/esmoopen-2017-000172.
- Owen LJ. Multiple malignant neoplasms. *JAMA*; 1921; 76: 1329–33.
- Ганов А. М. Эпидемиология, факторы риска и оптимизация диагностики множественных первичных опухолей. М., 1994.
- Li, Tao MDa; Wang, et al. Metachronous primary colon and periampullary duodenal cancer: A case report. *Medicine*. 2021; 100 (3): e24378. DOI: 10.1097/MD.00000000000024378.
- Li L, Jiang D, Liu H, et al. Comprehensive proteogenomic characterization of early duodenal cancer reveals the carcinogenesis tracks of different subtypes. *Nat Commun*. 2023; 29; 14 (1): 1751. DOI: 10.1038/s41467-023-37221-5.
- Reynolds I, Healy P, Mcnamara DA. Malignant tumours of the small intestine. *Surgeon*. 2014; 12 (5): 263–70. DOI: 10.1016/j.surge.2014.02.003.
- Li T, Wang X, Chen C, et al. Metachronous primary colon and periampullary duodenal cancer: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2021; 22; 100 (3): e24378. DOI: 10.1097/MD.00000000000024378.
- Li Q, Zhang B, Niu FN, et al. Clinicopathological characteristics, MSI and K-ras gene mutations of double primary malignancies associated with colorectal cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2020; 4; 100 (4): 301–6. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2020.04.012.
- Kwon JH, Kim H, Lee JK, et al. Incidence and Characteristics of Multiple Primary Cancers: A 20-Year Retrospective Study of a Single Cancer Center in Korea. *Cancers (Basel)*. 2024. 26; 16 (13): 2346. DOI: 10.3390/cancers16132346.

References

1. Vogt A, Schmid S, Heinemann K, et al. Multiple primary tumours: challenges and approaches, a review. *ESMO*. 2017; 2; 2 (2): e000172. DOI: 10.1136/esmoopen-2017-000172.
2. Owen LJ. Multiple malignant neoplasms. *JAMA*; 1921; 76: 1329–33.
3. Ganov AM. Jеpidеmиологija, факторы риска и оптимизация диагностики множественных первичных опухолей. М., 1994. Russian.
4. Li, Tao MDa; Wang, et al. Metachronous primary colon and periampullary duodenal cancer: A case report. *Medicine*. 2021; 100 (3): e24378. DOI: 10.1097/MD.00000000000024378.
5. Li L, Jiang D, Liu H, et al. Comprehensive proteogenomic characterization of early duodenal cancer reveals the carcinogenesis tracks of different subtypes. *Nat Commun*. 2023; 29; 14 (1): 1751. DOI: 10.1038/s41467-023-37221-5.
6. Reynolds I, Healy P, Monamara DA. Malignant tumours of the small intestine. *Surgeon*. 2014; 12 (5): 263–70. DOI: 10.1016/j.surge.2014.02.003.
7. Li T, Wang X, Chen C, et al. Metachronous primary colon and periampullary duodenal cancer: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2021; 22; 100 (3): e24378. DOI: 10.1097/MD.00000000000024378.
8. Li Q, Zhang B, Niu FN, et al. Clinicopathological characteristics, MSI and K-ras gene mutations of double primary malignancies associated with colorectal cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2020; 4; 100 (4): 301–6. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2020.04.012.
9. Kwon JH, Kim H, Lee JK, et al. Incidence and Characteristics of Multiple Primary Cancers: A 20-Year Retrospective Study of a Single Cancer Center in Korea. *Cancers (Basel)*. 2024. 26; 16 (13): 2346. DOI: 10.3390/cancers16132346.