



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

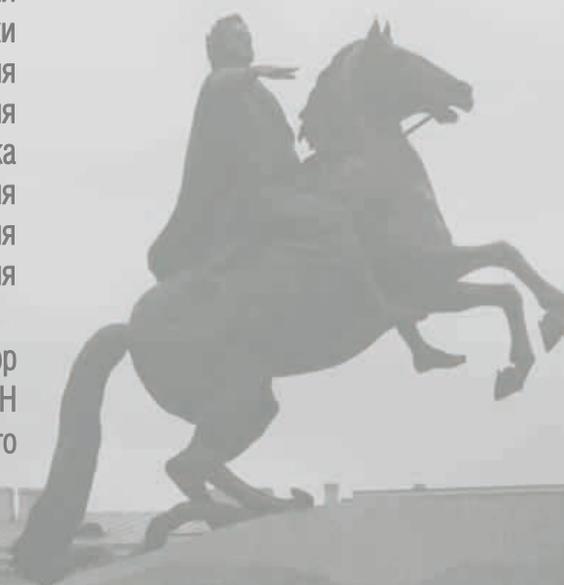
Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 5 №2 / 2018

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

Главный редактор
Академик РАН
Е.В. Шляхто





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

Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 5 №2 / 2018

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

Главный редактор
Академик РАН
Е.В. Шляхто

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



ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Е. В. Шляхто

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

А. О. Конради

М. М. Галагудза

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР

Н. А. Смолина

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ

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

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

**ЧЛЕНЫ МЕЖДУНАРОДНОГО
РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА**

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

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

Периодичность — 6 выпусков в год
Тираж — 1100 экземпляров

Тематическая рассылка по специалистам.

Верстка — Л. П. Попова

18+

Издательство «ФОНД АЛМАЗОВА»

Адрес: 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2
Телефон издательства: +7(812)702-37-16

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

Подписка по каталогу агентства «Роспечать»: подписной индекс 57996

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

Все права защищены. © 2018.

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

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов

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

**EDITOR-IN-CHIEF**

E. Shlyakhto

VICE -EDITORS

A. Konradi

M. Galagudza

TECHNICAL EDITOR

N. Smolina

EDITORIAL BOARD

S. Anisimov (Saint-Petersburg)
E. Baranova (Saint-Petersburg)
E. Barancevich (Saint-Petersburg)
T. Vavilova (Saint-Petersburg)
A. Vasiliev (Moscow)
M. Gordeev (Saint-Petersburg)
E. Grineva (Saint-Petersburg)
A. Zhloba (Saint-Petersburg)
A. Zaritskiy (Saint-Petersburg)
E. Zvartau (Saint-Petersburg)
D. Ivanov (Saint-Petersburg)

M. Karpenko (Saint-Petersburg)
E. Komlichenko (Saint-Petersburg)
A. Kostareva (Saint-Petersburg)
D. Lebedev (Saint-Petersburg)
Yu. Lishmanov (Tomsk)
O. Moiseeva (St. Petersburg)
A. Nedoshivin (Saint-Petersburg)
I. Nikitina (Saint-Petersburg)
E. Parmon (Saint-Petersburg)
D. Ryzhkova (Saint-Petersburg)

**MEM BERS
OF THE INTERNATIONAL
EDITORIAL BOARD**

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

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

Periodicity — 6 issues per year
Edition 1100 copies

Distribution to specialists.

Make-up — L. P. Popova

18+

Publisher «ALMAZOV FOUNDATION »

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

Tel.: +7(812)702–37–16

Manuscript submission and correspondence with authors,
advertising and subscription —

e-mail: bulletin@almazovcentre.ru

Subscription on catalogue of Rospechat agency: index 57996

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

All rights reserved. © 2018.

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

Editors accept no responsibility for the content of advertising materials.

СОДЕРЖАНИЕ

СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

5 Иванова С.В., Титов В.А., Митрофанова Л.Б.,
Моисеева О.М.
**АНАЛИЗ ПРИЧИН ПОЗДНЕЙ ДИАГНОСТИКИ
МИОКАРДИТА**

15 Кириллова В.В.
**РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ МИОКАРДА
У ПАЦИЕНТОВ С ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ
ПРЕДСЕРДИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ
СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

22 Яшков М.В.
**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ
СИСТЕМ НЕИНВАЗИВНОГО И
ИНВАЗИВНОГО КАРТИРОВАНИЯ
ДЛЯ ИНТЕРВЕНЦИОННОГО ЛЕЧЕНИЯ
ЖЕЛУДОЧКОВЫХ АРИТМИЙ**

НЕВРОЛОГИЯ И НЕЙРОХИРУРГИЯ

30 Одинцова Г.В., Александров М.В.,
Улитин А.Ю., Колотева А.В.
**КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ЭПИЛЕПСИИ У ПАЦИЕНТОВ
НЕЙРОХИРУРГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ**

ОНКОЛОГИЯ

38 Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М.,
Каплиева И.В., Трепитакки Л.К., Бандовкина В.А.,
Козлова Л.С., Погорелова Ю.А., Розенко Л.Я.,
Черярина Н.Д.
**ДИНАМИКА ТКАНЕВОЙ СИСТЕМЫ
РЕГУЛЯТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА
ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ НА ФОНЕ
ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛИ У САМОК МЫШЕЙ**

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

47 Игнаьева Е.В., Смирнов Д.Д.,
Костарева А.А., Дмитриева Р.И.
**ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ
В ПРОТОКОЛАХ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ
ХРОМАТИНА (МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК
И МОДИФИКАЦИЙ ГИСТОНОВ)
В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ**

CONTENT

CARDIOVASCULAR MEDICINE

5 Ivanova S.V., Titov V.A., Mitrofanova L.B.,
Moiseeva O.M.
**ANALYSIS OF THE REASONS OF LATER
DIAGNOSTICS OF MYOCARDITIS**

15 Kirillova V.V.
**MYOCARDIAL REMODELING IN PATIENTS
WITH ATRIAL FIBRILLATION IN CHRONIC
HEART FAILURE**

22 Yashkov M.V.
**USE OF RUSSIAN NON-INVASIVE AND
INVASIVE MAPPING SYSTEMS FOR
INTERVENTIONAL TREATMENT OF
VENTRICULAR ARRHYTHMIAS**

NEUROLOGY AND NEUROSURGERY

30 Odintsova G.V., Aleksandrov M.V., Uilitin A.U.,
Koloteva A.V.
**CLINICAL FEATURES OF NEUROSURGICAL
EPILEPSY PATIENTS**

ONCOLOGY

38 Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kotieva I.M.,
Kapljeva I.V., Trepitaki L.K., Bandovkina V.A., Kozlova
L.S., Pogorelova Yu.A., Rozenko L.Ya., Cheryarina N.D.
**DYNAMICS OF THE TISSUE SYSTEM OF
PLASMINOGEN REGULATORS IN CUTANEOUS
MELANOMA WITH CHRONIC PAIN IN
FEMALE MICE**

EXPERIMENTAL STUDIES

47 Ignatieva E.V., Smirnov D.D., Kostareva A.A.,
Dmitrieva R.I.
**ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ
SAMPLE PREPARATION FOR DOWNSTREAM
ANALYSIS OF EPIGENETIC MODIFICATIONS
(DNA METHYLATION AND HISTONE
MODIFICATIONS) IN THE REGULATION OF
GENE EXPRESSION.**

АНАЛИЗ ПРИЧИН ПОЗДНЕЙ ДИАГНОСТИКИ МИОКАРДИТА

Иванова С.В., Титов В.А., Митрофанова Л.Б., Моисеева О.М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация

Иванова Софья Вадимовна
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: sonya.spbgmu16@gmail.com
Статья поступила в редакцию 16.05.2018
и принята к печати 13.06.2018.

Резюме

Верификация диагноза «миокардит», несмотря на активное внедрение современных методов обследования, по-прежнему сложна, что приводит не только к поздней постановке заболевания, но и ухудшению прогноза пациентов.

Цель настоящего исследования – выявить причины поздней диагностики воспалительных заболеваний миокарда, оценить факторы, влияющие на течение заболевания, и эффективность проводимой терапии у пациентов с морфологически документированным миокардитом.

В исследовании приняли участие 50 пациентов с морфологически документированным миокардитом. Длительность наблюдения составила $3,5 \pm 1,6$ года. В 59% случаев диагноз «миокардит» верифицирован в сроки, превышающие 6 месяцев от первых клинико-инструментальных проявлений. Отдаленный прогноз пациентов в отношении глобальной сократительной способности левого желудочка зависел от сроков верификации диагноза ($\chi^2 = 6,9$; $p < 0,05$) и клинического варианта дебюта миокардита ($\chi^2 = 13,7$; $p < 0,01$). Отмечено достоверное ухудшение прогноза пациентов, имеющих в дебюте заболевания клинику сердечной недостаточности и нарушения ритма, а также пациентов с поздней диагностикой заболевания вследствие ошибочной его трактовки. Сделан вывод о том, что наличие идиопатических нарушений ритма должно рассматриваться как повод для исключения миокардита у пациентов с уже диагностированными болезнями сердца. Доказано улучшение прогноза на фоне комбинированной терапии сердечной недостаточности (иАПФ, бета-адреноблокаторы и диуретики) ($\chi^2 = 9,28$; $p < 0,01$) и приема статинов ($\chi^2 = 6,04$; $p < 0,05$).

Ключевые слова: миокардит, диагностика, прогноз, терапия

Для цитирования: Иванова С.В., Титов В.А., Митрофанова Л.Б., Моисеева О.М. Анализ причин поздней диагностики миокардита. Трансляционная медицина. 2018; 5 (2): 5–14.

ANALYSIS OF THE REASONS OF LATER DIAGNOSTICS OF MYOCARDITIS

Ivanova S.V., Titov V.A., Mitrofanova L.B., Moiseeva O.M.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Sofya. V. Ivanova
Almazov National Medical Research Centre
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341
E-mail: sonya.spbgmu16@gmail.com

Received 16 May 2018; accepted 13 June 2018

Abstract

The verification of the diagnosis of “myocarditis”, despite the active introduction of modern survey methods, is still complicated, which leads not only to late diagnosis, but also to worsening the prognosis of patients. The purpose of this study was to identify the causes of late diagnosis of inflammatory diseases of the myocardium, evaluate the factors influencing the course of the disease, and the effectiveness of the therapy in patients with morphologically documented myocarditis. The study involved 50 patients with morphologically documented myocarditis. The duration of follow-up was 3.5 ± 1.6 years. In 59% of cases, myocarditis was diagnosed within a period exceeding 6 months of the first clinical and instrumental manifestations. Long-term prognosis of patients with regard to global contractility of the left ventricle depended on the timing of verification of the diagnosis ($c^2 = 6.9$, $p < 0.05$) and the clinical variant of the debut of the myocarditis ($c^2 = 13.7$, $p < 0.01$). There was a significant deterioration in the prognosis in patients who have a heart failure clinic and rhythm disorders in the onset of the disease, as well as in patients with late diagnosis of the disease due to erroneous treatment. It was concluded that the presence of idiopathic rhythm disturbances should be considered as an excuse for excluding myocarditis in patients with already diagnosed heart diseases. The study proved an improvement in the prognosis on the background of combined therapy for heart failure (ACE inhibitors, beta-blockers and diuretics) ($c^2 = 9.28$, $p < 0.01$), and statin therapy ($c^2 = 6.04$, $p < 0.05$).

Key words: myocarditis, diagnosis, prognosis, therapy

For citation:

Ivanova S.V., Titov V.A., Mitrofanova L.B., Moiseeva O.M. Analysis of the reasons of later diagnostics of myocarditis. *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*. 2018; 5 (2): 5–14 pages. (In Russ.)

ДКМП – дилатационная кардиомиопатия, СН – сердечная недостаточность, ЭМБ – эндокардиальная биопсия, ЭХО-КГ – эхокардиография

Введение

Миокардит – это поражение сердечной мышцы воспалительного характера, обусловленное непосредственным или опосредованным через иммунные механизмы воздействием инфекции, паразитарной или протозойной инвазии, химических или физиологических факторов, а также поражение, возникшее при аллергических и аутоиммунных

заболеваниях [1]. Наряду с этиопатогенетическим определением миокардита, все чаще классификация миокардита строится преимущественно по морфологическим критериям, что подтверждает значимость эндокардиальной биопсии (ЭМБ) в его диагностике. Применение иммуногистохимического анализа существенно повысило чувствительность морфологических методов диагностики воспалительных заболеваний миокарда. Однако существует явное несоответствие между количеством больных с предполагаемым миокардитом и возможностью проведения ЭМБ, особенно когда речь идет

Таблица 1. Клиническая характеристика больных миокардитом

	Пациенты с миокардитом n = 50	
Возраст, лет	44,6 ± 13,9	
Пол, м : ж	29 : 21	
Индекс массы тела, кг/м ²	26,7 ± 5,2	
Сахарный диабет, % (n)	2% (1)	
Курение, % (n)	46% (23)	
Артериальная гипертензия, % (n)	50% (25)	
Гистологическое и иммуногистохимическое подтверждение диагноза		
Фиброз, % (n)	80% (40)	
Некроз кардиомиоцитов, % (n)	22,5 % (9)	
CD3+ Т-лимфоциты	18,0 ± 13,7	
CD8+ Т-лимфоциты	8,8 ± 1,0	
CD68+ лейкоциты	13,9 ± 6,3	
CD45+ лейкоциты	22,2 ± 17,1	
HLA-DR, баллы от 0 до 4	3 (2;3)	
Липоматоз, % (n)	34% (17)	
Вирусный геном, % (n)	34% (17)	
Эхокардиография	исходно	в динамики
Левое предсердие, мм	42 ± 8	50 ± 16
КДО ЛЖ, мл	172 ± 96	147 ± 76
КСО ЛЖ, мл	109 ± 88	82 ± 67
ФВ по Симпсону, %	44 ± 19	50 ± 16
МЖП, мм	9 ± 2	10 ± 3
ЗС ЛЖ, мм	9 ± 2	9 ± 2
Правый желудочек, мм	37 ± 8	35 ± 6
РСДЛА, мм	34 ± 11	31 ± 7

ЗС – задняя стенка левого желудочка, КДО – конечный диастолический объём, КДР – конечный диастолический размер, КСО – конечный систолический объём, КСР – конечный систолический размер, ЛЖ – левый желудочек, МЖП – межжелудочковая перегородка, РСДЛА – расчетное систолическое давление в легочной артерии, ФВ – фракция выброса.

о пациентах с легким течением заболевания. Кроме того, чувствительность ЭМБ ограничена объемом получаемого материала, локальным характером воспаления миокарда и трудностями интерпретации данных у пациентов с сопутствующей патологией. Традиционные неинвазивные методы диагностики воспалительных заболеваний миокарда, такие как электрокардиография, эхокардиография (ЭХО-КГ),

радионуклидные и лабораторные методы, к сожалению, имеют достаточно низкую специфичность [2]. В связи с этим актуальной задачей является разработка комплексного подхода к оценке неинвазивных клинических, лабораторных и инструментальных признаков, позволяющих верифицировать диагноза «миокардит», на основе клинико-морфологических сопоставлений с данными ЭМБ.

Рисунок 1. Распределение пациентов в исследуемой выборке по основным морфологическим вариантам миокардита



Сложности возникают не только в поиске доказательств воспалительного повреждения миокарда, но и в оценке вероятности наличия такого заболевания, что служит причиной задержки в проведении необходимых диагностических мероприятий и, соответственно, позднего назначения адекватной терапии. В связи с этим цель настоящего исследования – выявить причины поздней диагностики воспалительных заболеваний миокарда, факторы, влияющие на течение заболевания, и оценить эффективность проводимой терапии у пациентов с морфологически документированным миокардитом в процессе динамического наблюдения.

Материалы и методы

В основную группу включены 50 пациентов с морфологически документированным миокардитом, проходивших обследование в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России в период с 2010 по 2017гг. Для включения в исследование мы использовали критерии диагностики воспалительных заболеваний миокарда, предложенные экспертной группой Европейского общества кардиологов [3], а именно наличие ≥ 14 лейкоцитов/ мм^2 биоптатов миокарда, в том числе CD3 положительных Т-лимфоцитов ≥ 7 клеток/ мм^2 и до 4 моноцитов/ мм^2 по данным иммуногистохимического анализа [3]. При наличии воспалительного инфильтрата и признаков некроза кардиомиоцитов без явных ишемических изменений диагностировали активный миокардит. Наличие воспалительной инфильтрации без гистологических признаков некро-

за кардиомиоцитов расценивалась как пограничный миокардит [4]. Морфологическим признаком хронизации воспалительного процесса служило наличие фиброзной ткани в биоптатах миокарда.

Всем пациентам выполнялось ЭХО-КГ на аппарате Vivid 7 (GE, США) по стандартному протоколу. В зависимости от времени постановки предполагаемого диагноза «миокардит» пациенты разделены на 2 подгруппы: первая подгруппа – менее 6 месяцев от дебюта заболевания, вторая подгруппа – более 6 месяцев.

Статистический анализ данных, полученных в ходе исследования, проведен с использованием прикладных статистических программ SPSS Statistica for Windows ver. 23.0. Для показателей, имеющих приблизительно нормальное распределение, результаты представлены в виде среднего арифметического значения (M), среднеквадратичного отклонения (σ) и количества признаков в группе (n). Критерий значимости устанавливался на уровне $p < 0,05$. Корреляционные связи между парами количественных переменных оценивали, используя непараметрический критерий Спирмена. Для выявления независимого влияния на количественные показатели качественных факторов была использована процедура однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

Результаты

Среди включенных в исследование пациентов в возрасте от 19 до 70 лет с морфологически документированным лимфоцитарным миокардитом преобладали мужчины (1,4:1) (Табл. 1).

Таблица 2. Клинико-инструментальная характеристика пациентов в зависимости от времени верификации диагноза

	Постановка диагноза до 6 месяцев	Постановка диагноза более 6 месяцев
Кол-во пациентов, n (%)	20 (40)	30 (60)
Возраст, лет	45,5 ± 12,7	44,0 ± 14,9
Одышка, % (n)	95% (19)	67% (20)*
Болевой синдром, % (n)	35 % (7)	43% (13)
Отеки ног, % (n)	30% (6)	7% (2)*
Сердцебиение, % (n)	50% (10)	57% (17)
Перебои, % (n)	45% (9)	83% (25)**
Синкопальные состояния, % (n)	30% (6)	50% (15)
Желудочковая экстрасистолия, % (n)	40% (8)	70% (21)*
Фибрилляция предсердий, % (n)	30% (6)	50% (15)
Желудочковая тахикардия, % (n)	40% (8)	54% (16)
Левое предсердие, мм	42,8 ± 9,4	40,9 ± 9,1
КДО ЛЖ, мл	211,9 ± 106,7	172,4 ± 95,6*
КСО ЛЖ, мл	155,2 ± 89,7	108,61 ± 87,6**
ФВ по Симпсону, %	30,8 ± 15,5	53,5 ± 14,6**
МЖП, мм	9,4 ± 1,9	9,2 ± 2,0
ЗС ЛЖ, мм	9,7 ± 1,9	9,0 ± 1,7
Правый желудочек, мм	39,5 ± 7,7	34,6 ± 7,5
РСДЛА, мм	40,3 ± 12,3	30,1 ± 8,4

ЗС – задняя стенка левого желудочка, КДО – конечный диастолический объём, КДР – конечный диастолический размер, КСО – конечный систолический объём, КСР – конечный систолический размер, ЛЖ – левый желудочек, МЖП – межжелудочковая перегородка, РСДЛА – расчетное систолическое давление в легочной артерии, ФВ – фракция выброса.

Данные представлены в виде среднего арифметического значения (М), среднеквадратичного отклонения (σ) и количества признаков в группе (n). Корреляция значима на уровне *- p<0,05, ** – p<0,01.

Распределение пациентов в исследуемой выборке по основным морфологическим вариантам миокардита представлено на рисунке 1. Большинство обследованных имели признаки хронического миокардита, на что указывало наличие фиброзных изменений в биоптатах. Активный миокардит диагностирован у 22,5% (n = 9) пациентов. Вирусный генотип, представленный в 34% случаев (n = 17), в основном в виде комбинации парвовируса В19 с энтеровирусом (n = 8), вирусом герпеса человека типа 6 и вирусом Эпштейн-Барр (n = 3) (Табл. 1).

В исследовании в качестве основных первичных симптомов миокардита представлены: одышка – 78% (n = 39), сердцебиение – 54% (n = 27),

кардиалгия – 40% (n = 20), перебои в работе сердца – 68% (n = 34), синкопальные состояния – 42% (n = 21).

При анализе первоначальных предполагаемых диагнозов мы сгруппировали пациентов для оценки диагностических масок миокардита: аритмия – 45% случаев, синдром дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) (кардиомегалия, клиника сердечной недостаточности) – 12% случаев, совокупность аритмического варианта с явлениями сердечной недостаточности (СН) – 23%, ишемическая болезнь сердца – 10%, миоперикардит – 2% и другие заболевания (бронхиальная астма, тиреотоксикоз, эпилепсия) – 8% случаев. Однако стоит заметить,

Таблица 3. Медикаментозное и интервенционное лечение пациентов с миокардитом

Медикаментозная терапия	
Бета-адреноблокаторы, % (n)	84% (42)
иАПФ или АРА, % (n)	62% (31)
Диуретики, % (n)	40% (20)
Антагонисты альдостерона, % (n)	36% (18)
Бета-адреноблокаторы + иАПФ, % (n)	58% (29)
Бета-адреноблокаторы + иАПФ + Диуретики, % (n)	36% (18)
Статины, % (n)	34% (17)
Глюкокортикостероиды, % (n)	16% (8)
Цитостатические средства, % (n)	12% (6)
Интервенционные методы лечения	
Радиочастотная абляция, % (n)	60% (30)
Электрокардиостимулятор, % (n)	12% (6)
Кардиовертер-дефибриллятор, % (n)	6% (3)
Ресинхронизирующая терапия, % (n)	12% (6)
Трансплантация сердца, % (n)	4% (2)

АРА – антагонисты рецепторов альдостерона II типа, иАПФ – ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента. что более чем в 40% случаев, данные подгруппы имели смешанные клинические проявления.

В подгруппе отмечалось преобладание пациентов, у которых диагноз «миокардит» верифицирован в сроки, превышающие 6 месяцев от первых клинико-инструментальных проявлений (Рис. 2). Среди большинства пациентов с ранней диагностикой миокардита преобладали больные с клиникой СН (одышка, отечный синдром) и патологическими отклонениями по данным ЭХО-КГ (сниженная фракция выброса, дилатация камер). У пациентов с поздней верификацией заболевания в большинстве случаев структурных изменений по данным ЭХО-КГ не зарегистрировано. Однако с большей частотой встречались различные нарушения ритма и проводимости (Табл. 2). Указания в анамнезе на инфекцию, перенесенную в течение последних 6 месяцев, выявлена в более чем половине случаев (56%, n = 28), однако в 41% случаев данные анамнеза не учитывались врачами при поставке диагноза.

Средняя длительность наблюдения в исследовании составила $3,5 \pm 1,6$ года. Установлено, что изменения глобальной сократительной способности левого желудочка в процессе наблюдения зависели от сроков верификации диагноза ($c^2 = 6,9$; $p < 0,05$)

и клинического варианта дебюта заболевания ($c^2 = 13,7$; $p < 0,01$) (Рис. 3). В подгруппе пациентов со смешанным вариантом дебюта миокардита (аритмия и синдром ДКМП) у каждого четвертого пациента при динамическом наблюдении регистрировалось снижение глобальной сократительной способности миокарда.

Данные о характере медикаментозной терапии и интервенционных вмешательствах отражены в таблице 4. По клиническим показаниям у 60% (n = 30) пациентов выполнена радиочастотная абляция зон нарушений ритма. В 18% (n = 9) случаев проведена имплантация внутрисердечных вспомогательных устройств (электрокардиостимуляторы, кардиовертердефибриллятор, ресинхронизирующая терапия). Трансплантация сердца выполнена у 2 пациентов. Интервенционные методы лечения лишь в 45% случаев привели к увеличению фракции выброса, тогда как у 27% она осталась без изменений, а у 27% больных снизилась. Выявлена взаимосвязь между динамикой фракции выброса и приемом статинов ($c^2 = 6,04$; $p < 0,05$), а также комплексной терапией с применением трех препаратов: ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, бета-адреноблокаторы и диуретики ($c^2 = 9,28$; $p < 0,01$).

Рисунок 2. Периоды постановки диагноза в исследуемой выборке



Обсуждение

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в последнее десятилетие в диагностике миокардита, верификация диагноза по-прежнему остается достаточно сложной проблемой, что приводит к длительному отсутствию клинического диагноза. Большинство экспертов подтверждают, что своевременная диагностика миокардита чрезвычайно важна для принятия решения в отношении лечебной тактики и позитивно влияет на отдаленные результаты, так как на фоне неконтролируемого воспалительного процесса в миокарде быстро формируются фиброзные изменения со стойкими нарушениями ритма, патологическим ремоделированием камер сердца и снижением систолической функции [1].

Полиморфизм клинических проявлений миокардита, “размытость” его клинической картины и нечеткость основных симптомов у большинства пациентов служат основной причиной поздней верификации диагноза. В отечественной классификации миокардита наиболее полно отражается разнообразие клинических вариантов: малосимптомный, псевдокоронарный, декомпенсационный, аритмический, псевдоклапанный, тромбоемболический, смешанный [5]. Зарубежные исследователи выделяют только три основных варианта дебюта заболевания: инфарктоподобный (27–31%), вариант с развитием жизнеопасных нарушений ритма и проводимости (18%), и с клиникой СН (31–69%). Два последних варианта, как правило,

ассоциированы с неблагоприятным для больного прогнозом [6]. По данным отечественных публикаций первым проявлением миокардита может быть одышка – 68,6%, сердцебиение 32,8%, повышение температуры 29,8%, кардиалгия 22,3%, перебои в работе сердца 16,4 %, головокружение 2,9%, синкопальные состояния 1,5% [7]. Следует отметить, что патогномоничных симптомов для данного диагноза не существует. Миокардит следует подозревать во всех случаях необъяснимой СН, тахикардии и аритмии, особенно, когда рутинные методы кардиологического обследования не выявляют причину. Так выявляемый по данным ЭМБ у лиц с нарушениями ритма эндомиокардиальный или интерстициальный фиброз, трактуемый как постмиокардитический, ставит под сомнение существование так называемых идиопатических аритмий [8]. Кроме того, миокардит может сопровождать и такие широко распространенные заболевания, как ИБС и пороки сердца, утяжеляя их течение [9]. По результатам исследований аритмического варианта миокардита О.В. Благовой с соавторами сделаны выводы, что у подавляющего большинства пациентов нет четких анамнестических оснований подозревать миокардит, что, возможно, связано с отсутствием патогномоничных симптомов заболевания [10]. Если учесть, что при эхокардиографических исследованиях бессимптомная дисфункция левого желудочка встречается в популяции в 0,9–12,9% в зависимости от пороговых значений фракции выброса (от 30 до 54%, соответственно),

Рисунок 3. Распределение пациентов в исследуемой выборке по характеру изменения фракции выброса (ФВ) и клинического течения миокардита. ДКМП – дилатационная кардиомиопатия



то очевидна актуальность своевременной диагностики заболеваний, ведущих к развитию сердечной недостаточности [11, 12]. Однако в большинстве случаев диагноз миокардит по-прежнему верифицируется только ретроспективно.

Гендерные и возрастные характеристики пациентов, включенных в нашу работу, существенно не отличались от данных ранее опубликованных исследований [13]. В отличие от данных отечественных публикаций в нашей выборке больные чаще предъявляли жалобы на перебои в работе сердца, а также синкопальные состояния [7]. Вероятно, это обусловлено более частым выполнением ЭМБ пациентам, направляемым на интервенционные вмешательства по поводу тахиаритмий. В ходе работы выделено несколько основных вариантов дебюта миокардита: «идиопатические» аритмии, синдром ДКМП, а также их сочетание, что соответствует данным, представленным О.В. Благовой с соавторами [10]. Также следует отметить, что у 44% пациентов с подтвержденным диагнозом «миокардит» отсутствовала связь дебюта клинических проявлений заболевания с перенесенной в течение предшествующих 6 месяцев инфекцией. Возможно, для углубленного поиска связи с инфекцией следует расширить рассматриваемый промежуток до 1 года.

Для оценки причин поздней верификации диагноза в этом исследовании проводилось сравнение между пациентами с ранней и поздней постановкой диагноза (менее 6 месяцев и более). По данным

статистического анализа среди лиц с более поздней верификацией диагноза было достоверно больше пациентов с сохранной фракцией выброса и «идиопатическими» аритмиями. Наличие упорного и необъяснимого аритмического синдрома должно рассматриваться как повод для исключения миокардита у пациентов с уже диагностированными болезнями сердца.

По данным ЭМБ у каждого четвертого обнаружены фиброзные изменения в миокарде. Однако при сравнении пациентов по морфологическим группам (активный/пограничный и острый/хронический миокардит) не выявлено связи структурных изменений миокарда с временным интервалом от появления первых симптомов до постановки диагноза. Частота выделения вирусного генома в миокарде по данным настоящего исследования составляла 34%, что в пределах процентных интервалов в ранее опубликованным исследованиям [14].

Сроки постановки диагноза существенно влияют на отдаленный прогноз заболевания. Так в подгруппе пациентов у которых диагноз «миокардит» выставлен по прошествии не менее пяти лет отмечался наибольший процент снижения фракции выброса за период наблюдения. Динамика фракции выброса зависит и от клинического варианта дебюта заболевания. Поэтому с учетом неблагоприятного прогноза при смешанном варианте дебюта миокардита (аритмия и синдром ДКМП) пациент должен находиться под наблюдением в специализированном центре.

В отличие от ожидаемого положительного влияния бета-адреноблокаторов и ингибиторов АПФ на отдаленные результаты глобальной сократительной способности левого желудочка у больных с миокардитом, неожиданным для нас оказался эффект статинов. Однако в ранее опубликованных исследованиях показано, что эффект статинов может быть связан с подавлением продукции Th1-клетками провоспалительных цитокинов, негативно влияющих на процессы апоптоза кардиомиоцитов, структурно-функциональное и электрофизиологическое ремоделирование миокарда как основу сердечной недостаточности и нарушений ритма [15, 16]. Напротив, в работе не выявлено влияния интервенционной терапии на отдаленный прогноз больных с миокардитом, что, вероятно, связано с присутствием в исследуемой выборке больных с активным миокардитом, при котором эффективность радиочастотной абляции зон аритмогенеза значительно ниже [17].

Заключение

Таким образом, в качестве основных причин поздней диагностики миокардита следует назвать плохой сбор анамнеза, отсутствие настороженности врачей в отношении данного диагноза, ошибочная трактовка идиопатических аритмий. Поздняя диагностика смешанного варианта дебюта миокардита (аритмия и синдром ДКМП), как правило, ассоциирована с неблагоприятным прогнозом. Комбинированная терапия бета-адреноблокаторами и ингибиторами АПФ подтвердила свою эффективность в отношении прогноза больных с миокардитом. Дополнительно нуждается в проведении клинических исследований целесообразность назначения статинов у больных с воспалительными заболеваниями миокарда.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

- Moiseeva OM. Myocarditis: the basic principles of diagnosis and treatment. *Kardiologiya: novosti, mneniya, obucheniye*= Cardiology: news, opinions, training. 2016; 1(8): 50–64. In Russian. [Моисеева О.М. Миокардит: основные принципы диагностики и лечения. *Кардиология: новости, мнения, обучение*. 2016; 1(8): 50–64].
- Runov A, Kurchakova E, Khaschevskaya D, et al. Viral reseptor gene expression and myocarditis development. *Medical Virology*. 2016; 30(1): 39–47. In Russian. [Рунов А., Курчакова Е., Хашевская Д. и др. Экспрессия вирусных рецепторов и развитие миокардита. *Медицинская вирусология*. 2016; 30(1): 39–47].
- Caforio AL, Pankuweit S, Arbustini E, et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart J*. 2013; 34(33): 2636–2648.
- Leone O, Veinot JP, Angelini A, et al. 2011 consensus statement on endomyocardial biopsy from the Association for European Cardiovascular Pathology and the Society for Cardiovascular Pathology. *Cardiovascular Pathology*. 2012; 21(4): 245–274.
- Paleyev NR, Paleyev FN. Non-coronary myocardial disease and its classification. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*=Russian journal of cardiology. 2009; 3: 5–9. In Russian. [Палеев Н. Р., Палеев Ф. Н. Некоронарогенные заболевания миокарда и их классификация. *Российский кардиологический журнал*. 2009; 3: 5–9].
- Anzini M, Merlo M, Sabbadini G, et al. Long-term evolution and prognostic stratification of biopsy-proven active myocarditis. *Circulation*. 2013; 128(22): 2384–2394.
- Tereshchenko SN, Arutyunov GP, Gilyarevsky SR. Clinical guidelines. Diagnosis and treatment of myocarditis. *Evraziyskiy kardiologicheskiy zhurnal*=Eurasian heart journal. 2015; 3: 3–17. In Russian. [Терещенко С. Н., Арутюнов Г. П., Гиляревский С. Р. Диагностика и лечение миокардитов. *Клинические рекомендации. Евразийский кардиологический журнал*. 2015; 3: 3–17].
- Antonova TV, Zhevnerova NS. Viral myocarditis: etiology and pathogenesis, problems of diagnostics. *Zhurnal Infektologii*=Journal of infections. 2013; 5(2): 13–21. In Russian. [Антонова Т. В., Жевнерова Н. С. Вирусные миокардиты: этиология и патогенез, проблемы диагностики. *Журнал Инфектологии*. 2013; 5(2): 13–21].
- Mitrofanova LB, Kovalskiy GB. Myocardial morphological changes in atrial fibrillation. *Arkhiv patologii*=Archives of parhologies. 2011; 6: 10–14. In Russian. [Митрофанова Л. Б., Ковальский Г. Б. Морфологические изменения миокарда при фибрилляции предсердий. *Архив патологии*. 2011; 6: 10–14].
- Blagova OV, Nedostup AV. Contemporary masks of the myocarditis (from clinical signs to diagnosis). *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*=Russian journal of cardiology. 2014; 5: 13–22. In Russian. [Благова О. В., Недоступ А. В. Современные маски миокардита (от клинических синдромов к диагнозу). *Российский кардиологический журнал*. 2014; 5: 13–22].
- Birnie DH, Kandolin R, Nery PB, et al. Cardiac manifestations of sarcoidosis: diagnosis and management. *European Heart J*. 2017; 38(35): 2663–2670.
- Kouranos V, Tzelepis GE, Rapti A, et al. Complementary Role of CMR to Conventional Screening in the Diagnosis and Prognosis of Cardiac Sarcoidosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2017; 10(12): 1437–1447.
- Kytö V, Sipilä J, Rautava P. The effects of gender and age on occurrence of clinically suspected myocarditis in adulthood. *Heart*. 2013; 99(22): 1681–1684.
- Dennert R, Crijns HJ, Heymans S. Acute viral myocarditis. *European Heart J*. 2008; 29(17): 2073–2082.
- Liu W, Li WM, Gao C, et al. Effects of atorvastatin on the Th1/Th2 polarization of ongoing experimental autoimmune myocarditis in Lewis rats. *J. of autoimmunity*. 2005; 25(4): 258–263.
- Lizzerini PE, Capecchi PL, Laghi-Pasini F. Statins

as a New Therapeutic Perspective in Myocarditis and Post-myocarditis Dilated Cardiomyopathy. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2013; 27(5): 365-369.

17. Syrovnev VA, Lebedev DS, Mitrofanova LB, et al. Interventional treatment in patients with myocarditis: Pro and Contra. *Kardiologiya=Cardiology*. 2017; 57(3): 49-56. In Russian [Сыровнев В. А., Лебедев Д. С., Митрофанова Л. Б., и др. Инвазивная тактика лечения желудочковых нарушений ритма у больных с миокардитом: за и против. *Кардиология* 2017; 57(3): 49-56.]

Информация об авторах:

Иванова Софья Вадимовна, ординатор, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Титов Владислав Андреевич, врач-кардиолог, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Митрофанова Любовь Борисовна, д.м.н., зав НИЛ патоморфологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Моисеева Ольга Михайловна, д.м.н., заведующая научно-исследовательским отделом некоронарогенных заболеваний сердца, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»;

Author information:

Sofya V. Ivanova, medical resident, Almazov National Medical Research Centre;

Vladislav A. Titov, MD, Almazov National Medical Research Centre;

Lubov` B. Mitrofanova, PhD, prof., Head of the laboratory of pathomorphology, Almazov National Medical Research Centre;

Olga M. Moiseeva, MD, PhD, prof., Head of the Department of Noncoronary Diseases, Almazov National Medical Research Centre.

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ МИОКАРДА У ПАЦИЕНТОВ С ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Кириллова В.В.^{1,2}

¹ ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий,
Екатеринбург, Россия

² ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет
Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Контактная информация:

Кириллова Венера Вячеславовна
ГАУЗ СО Институт медицинских
клеточных технологий
ул. Карла Маркса, д. 22 а, Екатеринбург,
Россия, 620026
E-mail: venova@list.ru

*Статья поступила в редакцию 20.05.2018
и принята к печати 12.06.2018*

Резюме

Неудовлетворенность результатами медикаментозной и немедикаментозной терапии фибрилляции предсердий заставляет клиницистов и ученых искать новые методы лечения этой аритмии. Цель исследования: изучить особенности ремоделирования сердца и характер морфологических изменений миокарда у пациентов с хронической сердечной недостаточностью при фибрилляции предсердий. Материалы и методы. У пациентов с фибрилляцией предсердий при хронической сердечной недостаточности, имеющих и не имеющих фибрилляцию предсердий изучались эхокардиографические особенности ремоделирования миокарда и микроскопически морфология миокарда сегмента ушка правого предсердия. Результаты. У пациентов с хронической сердечной недостаточностью, имеющих фибрилляцию предсердий, по сравнению с пациентами, не имеющими нарушения ритма, выявлены более выраженные гипертрофия стенок миокарда левого и правого желудочков, дилатация обоих предсердий и левого желудочка, повышенное давление в легочной артерии и венах. При постоянной форме в отличие от пароксизмальной формы фибрилляции предсердий структурные нарушения стенок и камер сердца более выражены. Выявлен интерстициальный отек миокарда ушка правого предсердия у пациентов с фибрилляцией предсердий по сравнению с пациентами без нарушений ритма. Выводы. Более выраженная дилатация предсердий у пациентов с фибрилляцией предсердий при хронической сердечной недостаточности сопровождается интерстициальным отеком миокарда, который, возможно, и является одной из причин возникновения и поддержания фибрилляции предсердий.

Ключевые слова: фибрилляция предсердий, пароксизмальная форма, постоянная форма, дилатация предсердий, интерстициальный отек миокарда.

Для цитирования: Кириллова В.В. Ремоделирование миокарда у пациентов с фибрилляцией предсердий при хронической сердечной недостаточности. Трансляционная медицина. 2018; 5 (2): 15–21.

MYOCARDIAL REMODELING IN PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION IN CHRONIC HEART FAILURE

Kirillova V.V.^{1,2}

¹Institute for medical cell technologies, Ekaterinburg, Russia

²Ural state medical University, Ekaterinburg, Russia

Corresponding author:

Venera V. Kirillova
Institute for medical cell technologies
Karla Marksa str., 22 a, Ekaterinburg, Russia,
620026
E-mail: venova@list.ru

Received 20 May 2018; accepted 12 June 2018.

Abstract

Background. Dissatisfaction with the results of drug and non-drug therapy of atrial fibrillation causes clinicians and scientists to seek new methods for treatment of this arrhythmia. **Objective.** The paper aims at studying the features of cardiac remodeling and morphological changes of myocardium in chronic heart failure patients with atrial fibrillation. **Materials and methods.** The features myocardial remodeling and the morphology of the myocardium of a right atrial auricle segment were studied, respectively, by echocardiography and by microscopy in chronic heart failure patients with and without atrial fibrillation. **Results.** Compared to patients without cardiac arrhythmia, patients with chronic heart failure, with atrial fibrillation, revealed more pronounced hypertrophy of the walls of the myocardium of the left and right ventricles, increased myocardial mass index, dilatation of both right and left atria, increased pressure in the pulmonary artery and veins. With a constant form, unlike paroxysmal atrial fibrillation, structural disorders of the walls and chambers of the heart were more pronounced. The interstitial edema of the myocardium of the auricle of the right atrium was detected in patients with atrial fibrillation compared to patients without arrhythmias. **Conclusion.** More pronounced atrial dilatation in heart failure patients with atrial fibrillation is accompanied by interstitial myocardial edema, which, perhaps, is one of the reasons for the emergence and maintenance of atrial fibrillation.

Key words: atrial fibrillation, paroxysmal form, constant form, atrial dilatation, interstitial myocardial edema.

*For citation: Kirillova V.V. Myocardial remodeling in patients with atrial fibrillation in chronic heart failure. *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*. 2018; 5 (2): 15–21 pages. (In Russ.)*

Введение

Фибрилляция предсердий (ФП), как одна из наиболее частых аритмий, встречающаяся в клинической практике, увеличивает в пять раз риск инсульта. При этом ишемический инсульт на фоне фибрилляции предсердий часто рецидивирует и приводит к более выраженной инвалидизации [1]. Фибрилляция предсердий ассоциируется с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями, наиболее частой первичной причиной возникновения данной аритмии является артериальная гипертензия [2-4].

Для снижения частоты возникновения фибрилляции предсердий или восстановления синусового ритма в настоящее время применяется медикаментозная и немедикаментозная тактика ведения

пациентов [1]. Однако существует мнение, что видимая польза от сохранения синусового ритма при назначении антиаритмиков полностью нивелируется неблагоприятными, зачастую фатальными событиями (увеличение риска смертности на 49%) на фоне их приема [5]. На протяжении последнего десятилетия активно разрабатывались немедикаментозные вмешательства – радиочастотная абляция (РЧА). Удержание синусового ритма после процедуры РЧА в течение года удается достичь у 20-80% [6, 7]. Несмотря на совершенствование техники проведения РЧА наличие рецидивов срывов ритма и возможности осложнений в течение самой процедуры [8,9] заставляет клиницистов и ученых искать новые методы лечения этой аритмии.

Цель исследования: изучить особенности ремоделирования сердца и характер морфологических изменений миокарда у пациентов с фибрилляцией предсердий при хронической сердечной недостаточности.

Материалы и методы. В исследование включен 71 пациент с хронической сердечной недостаточностью II-III функционального класса по Нью-Йоркской классификации (NYHA). Пациенты с ХСН разделены на две группы: 1 группа (n=35) – пациенты с хронической сердечной недостаточностью, не имеющие фибрилляцию предсердий; 2 группа (n=36) – пациенты с хронической сердечной недостаточностью с фибрилляцией предсердий. Хроническая сердечная недостаточность выставлена в соответствии с последними рекомендациями по диагностике ХСН [10,11]. Трансторакальная эхокардиография проводилась на аппарате Philips HD-15 (США) по стандартному протоколу с дополнительным определением максимального и минимального диаметров визуализируемой легочной вены с целью диагностики венозной легочной гипертензии [12]. У пациентов с хронической сердечной недостаточностью, имеющих (n=6) и не имеющих (n=7) фибрилляцию предсердий, оценивалась морфология миокарда сегмента ушка правого предсердия, который забирался интраоперационно во время планового аортокоронарного шунтирования. Сегмент ушка правого предсердия сразу же после забора помещался в 10% нейтральный формалин на 24-48 часов. Затем ткань заливалась в парафин с использованием автоматической системы пропитывания ткани фирмы Micron. На стекла, покрытые поли-L-лизинном (Menzel GmbH, Germany) фиксировали парафиновые срезы толщиной 5 мкм, приготовленные на микротоме (Microm HM 340E, Germany) из парафиновых блоков. Срезы подвергались депарафинированию и обезвоживанию посредством последовательной инкубации в толуоле и абсолютном этаноле – 2 смены по 5 минут, этаноле 95% – 2 смены по 3 минуты. Далее микропрепараты со срезами окрашивались гематоксилином и подвергались микроскопии при увеличении 40 и 100 (объектив) x 16 (окуляр). Фотографии были сделаны при помощи цифровой камеры Axio Cam HRC zeiss. У всех пациентов получено письменное согласие на участие в исследовании, которое проведено с разрешения Этического комитета Института медицинских клеточных технологий.

Статистическую обработку результатов исследования проводили по критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее значение измеряемой величины, m – ошибка измерения.

Результаты

Пациенты в группах были сопоставимы по количеству, возрасту, сопутствующей патологии, степени тяжести хронической сердечной недостаточности, оцененной по стадиям и функциональному классу по NYHA. В группе пациентов с фибрилляцией предсердий мужчин было больше по сравнению с группой пациентов, не имеющих фибрилляцию предсердий. Общая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Пациенты с хронической сердечной недостаточностью вне зависимости от отсутствия или наличия фибрилляции предсердий по сравнению с контрольной группой имеют структурные изменения сердца, выявляемые эхокардиографически ($P < 0,05$): гипертрофию миокарда стенок обоих желудочков (толщина задней стенки левого желудочка – $11,21 \pm 0,15$; $11,88 \pm 0,20$ и $8,26 \pm 0,14$ мм соответственно; толщина межжелудочковой перегородки – $11,41 \pm 0,24$; $12,38 \pm 0,20$ и $8,26 \pm 0,12$ мм; толщина стенки правого желудочка – $6,39 \pm 0,17$; $7,29 \pm 0,18$ и $3,75 \pm 0,31$ мм соответственно), повышенный индекс массы миокарда ($97,15 \pm 1,7$; $125,09 \pm 5,74$ и $75,94 \pm 2,30$ г/м²), дилатацию правого и левого предсердия (площадь правого предсердия – $18,36 \pm 0,36$; $20,72 \pm 0,50$ и $13,73 \pm 0,24$ см², площадь левого предсердия – $23,27 \pm 0,34$; $27,09 \pm 0,58$ и $15,27 \pm 0,21$ см²), повышенное систолическое давление в легочной артерии ($27,79 \pm 0,94$; $34,11 \pm 1,81$ и $34,11 \pm 1,81$ мм. рт. ст.), увеличение максимального и минимального диаметров легочных вен (максимальный диаметр – $21,62 \pm 0,28$; $21,67 \pm 0,30$ и $14,7 \pm 0,2$ мм; минимальный диаметр – $10,41 \pm 0,22$; $11,98 \pm 0,65$ и $6,4 \pm 0,3$ мм), свидетельствующих о наличии застоя в малом круге кровообращения. Пациенты с хронической сердечной недостаточностью, имеющие фибрилляцию предсердий, по сравнению с пациентами без нее, имеют достоверно более выраженные структурные изменения сердца: более выражена гипертрофия миокарда стенок обоих желудочков с индексом массы миокарда, на фоне более выраженной дилатации левого предсердия выявляется дилатация и правого предсердия, дилатация конечно-диастолического и конечно-систолического объема левого желудочка, повышено систолическое давление в легочной артерии, отмечается более низкая фракция выброса левого желудочка и расширение минимального диаметра легочной вены (таблица 1).

В структуру пациентов с фибрилляцией предсердий входили пациенты с пароксизмальной и постоянной формой фибрилляции предсердий. Выявлены отличия в ремоделировании миокарда у пациентов разных форм фибрилляции предсердий (таблица 2).

Таблица 1. Характеристика пациентов с фибрилляцией предсердий и без фибрилляции предсердий

Показатель	Контроль (n=50)	Пациенты без ФП (n=35)	Пациенты с ФП (n=36)
Пол, муж	19 (38%)	12 (34%)	18 (50%)*
Возраст, лет	36±1,42	69±1,17 ^	71±0,81^
Гипертоническая болезнь	-	35 (100%)	36 (100%)
Ишемическая болезнь сердца	-	9 (25,7%)	10 (27,7%)
ХСН 2А стадия	-	9 (25,7%)	12 (33,3%)
ХСН 2Б стадия	-	26 (74,3%)	24 (66,6%)
ХСН ФК II	-	26 (74,3%)	25 (69,4%)
ХСН ФК III	-	9 (25,7%)	11 (30,6%)
САД, мм рт ст	126±1,08	134,81±2,65	126,67±1,91
ДАД, мм рт ст	72±2,02	86,69±1,35	73,83±0,99
ЧСС, уд/мин	70±1,01	70,38±1,10	75,36±1,75
Терапия: β-адреноблокаторы	-	16 (45%)	14 (38%)
иАПФ/БРА	-	24 (68%)	13 (36%)
Верошпирон/ГХТ	-	5 (14%)	5 (13%)
Петлевые диуретики	-	4 (11%)	3 (8%)
Варфарин/НОАК	-	-	5 (13%)
Толщина задней стенки левого желудочка, мм	8,26±0,14	11,21±0,15 ^	11,88±0,20^*
Толщина межжелудочковой перегородки, мм	8,26±0,12	11,41±0,24^	12,38±0,20^*
Толщина стенки правого желудочка, мм	3,75±0,31	6,39±0,17^	7,29±0,18^*
Индекс массы миокарда, г/м ²	75,94±2,30	97,15±1,7^	125,09±5,74^
Правое предсердие (площадь), см ²	13,73±0,24	18,36±0,36^	20,72±0,50^*
Левое предсердие на левом боку, мм	32,04±0,33	40,06±0,71^	45,36±0,61^*
Левое предсердие (площадь), см ²	15,27±0,21	23,27±0,34^	27,09±0,58^*
Конечно-диастолический объем левого желудочка, мл	116,68±3,82	127,29±5,55	155,56±7,95^*
Конечно-систолический объем левого желудочка, мл	41,48±2,66	42,27±2,76	72,44±6,09^*
Фракция выброса по Симпсону, %	64,65±1,03	68,14±0,96	59,63±1,60*
Давление в легочной артерии, мм. рт. ст.	14,74±0,51	27,79±0,94^	34,11±1,81^*
Максимальный диаметр легочной вены, мм	14,7±0,2	21,62±0,28^	21,67±0,30^
Минимальный диаметр легочной вены, мм	6,4±0,3	10,41±0,22^	11,98±0,65^*

Примечание: САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление, ЧСС – частота сердечных сокращений, иАПФ/БРА – ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента/блокаторы к рецептору ангиотензина II, ГХТ – гидрохлоротиазид, НОАК – новые оральные антикоагулянты. ^ – достоверность различий показателей между группами пациентов без ФП, с ФП и контролем, P<0,05; * – достоверность различий показателей между группами пациентов без ФП и с ФП, P<0,05.

Таблица 2. Характеристика пациентов с пароксизмальной и постоянной формами фибрилляции предсердий

Показатель	Пароксизмальная ФП (n=17)	Постоянная ФП (n=19)
Возраст, лет	72±0,81	71±1,05
Толщина задней стенки левого желудочка, мм	11,55±0,25	12,54±0,30*
Толщина межжелудочковой перегородки, мм	11,83±0,32	13,18±0,24*
Толщина стенки правого желудочка, мм	6,99±0,30	7,56±0,21
Левое предсердие на левом боку, см	43,24±0,81	48,09±0,80*
Левое предсердие (площадь), см ²	25,48±0,67	29,41±0,86*
Правое предсердие (площадь), см ²	16,98±0,33	24,19±0,50*
Давление в легочной артерии, мм. рт. ст.	29,00±1,59	40,13±3,05*
Конечно-диастолический объем левого желудочка, мл	151,60±14,14	162,89±10,80
Конечно-систолический объем левого желудочка, мл	60,24±8,67	85,43±9,41
Фракция выброса по Симпсону, %	66,67±0,98	49,62±2,66*

Примечание: * – достоверность различий показателей между группами пациентов с пароксизмальной и постоянной формами фибрилляции предсердий, P<0,05

У пациентов с постоянной формой фибрилляции предсердий отмечается более выраженная гипертрофия миокарда стенок левого желудочка (толщина задней стенки левого желудочка – 12,54±0,30 к 11,55±0,25 мм; толщина межжелудочковой перегородки – 13,18±0,24 к 11,83±0,32 мм); дилатация левого предсердия (площадь левого предсердия – 48,09±0,80 к 43,24±0,81 см²), выявлена дилатация правого предсердия (площадь правого предсердия – 24,19±0,50 к 16,98±0,33 см²) на фоне повышенного систолического давления в легочной артерии (40,13±3,05 к 40,13±3,05 мм. рт. ст.) при переходной фракции выброса (49,62±2,66 к 66,67±0,98 %). Конечно-диастолический и конечно-систолический объем левого желудочка у пациентов с разными формами фибрилляции предсердий не отличался.

При микроскопическом исследовании миокарда ушек правого предсердия пациентов с хронической сердечной недостаточностью, имеющих фибрилляцию предсердий, выявлен интерстициальный отек (рис. 1) по сравнению с пациентами, не имеющими нарушений ритма.

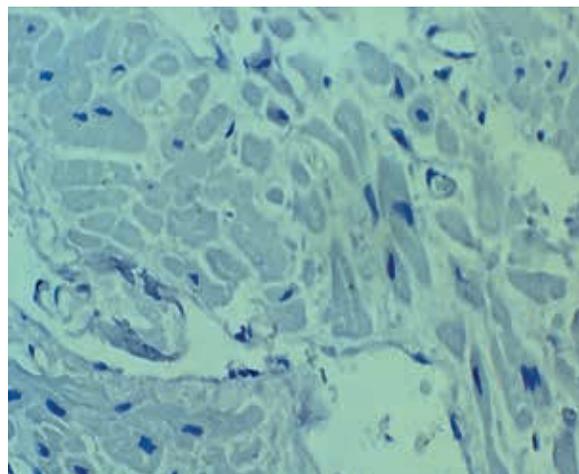
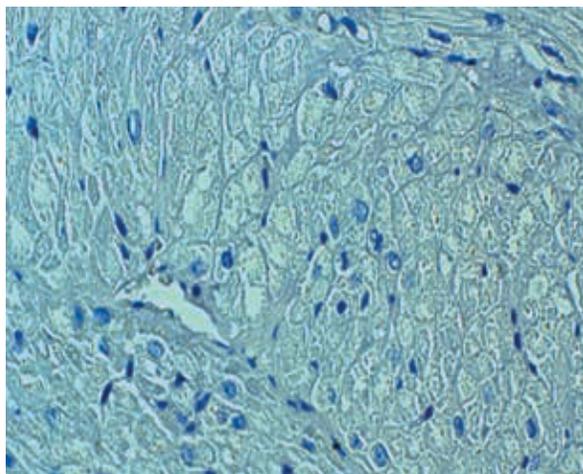
Обсуждение

Изучение ремоделирования миокарда у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, имеющих фибрилляцию предсердий, по сравнению с пациентами, не имеющими нарушения ритма, по-

казало более выраженные структурные нарушения стенок и камер сердца у первых с P<0,05, что выразилось в более выраженной гипертрофии стенок миокарда левого (толщина задней стенки левого желудочка – 11,21±0,15 и 11,88±0,20 мм соответственно; толщина межжелудочковой перегородки – 11,41±0,24 и 12,38±0,20 мм) и правого желудочков (6,39±0,17 и 7,29±0,18 мм соответственно), дилатации обоих предсердий (площадь правого предсердия – 18,36±0,36 и 20,72±0,50 см², площадь левого предсердия – 23,27±0,34 и 27,09±0,58 см²) и левого желудочка (конечно-диастолический объем левого желудочка – 127,29±5,55 и 155,56±7,95 мл; конечно-систолический объем левого желудочка – 42,27±2,76 и 72,44±6,09 мл), повышенного давления в легочной артерии (27,79±0,94 и 34,11±1,81 мм. рт. ст.) и венах (минимальный диаметр – 10,41±0,22 и 11,98±0,65 мм).

Изучение ремоделирования миокарда у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, имеющих постоянную форму фибрилляции предсердий, по сравнению с пациентами, имеющими пароксизмальную форму фибрилляции предсердий, выявило наличие более выраженных структурных нарушений стенок и камер сердца у первых, что выразилось в более выраженной гипертрофии стенок миокарда левого желудочка, дилатации полостей обоих предсердий, повышенном систолическом давлении в легочной артерии, сниженной

Рисунок 1. Миокард ушка правого предсердия пациентов с ХСН, не имеющих (слева) и имеющих фибрилляцию предсердий (справа). Стрелки указывают на интерстициальный отек. Окраска: гематоксилин, увеличение 40(об.) x 16(ок.)



фракции выброса левого желудочка (таблица 2). Выраженная дилатация предсердий у пациентов с фибрилляцией предсердий отмечается и в более масштабных исследованиях [2-5]. Микроскопическое исследование ушка правого предсердия у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, имеющих фибрилляцию предсердий, показало наличие интерстициального отека более выраженного по сравнению с пациентами с хронической сердечной недостаточностью без нарушений ритма. Акаемовой О.Н. и др. (2010) убедительно показано, что при хронической сердечной недостаточности венозная система сердца претерпевает существенные морфо-функциональные изменения, которые зависят от ее тяжести и играют важную роль в развитии и прогрессировании данного синдрома. При хронической сердечной недостаточности формируется «застойное сердце», аналогично застойной печени, легких, почек [13]. Вероятно, межклеточный отек играет важную роль в пространственном разъединении кардиомиоцитов друг с другом, что проявляется в нарушении межклеточной проводимости с развитием и/или поддержанием фибрилляции предсердий.

В настоящее время выделяют следующие патофизиологические изменения в предсердном миокарде, связанные с фибрилляцией предсердий: изменения внеклеточного матрикса, функции фибробластов и жировых клеток (интерстициальный и заместительный фиброз, воспалительная инфильтрация, жировая инфильтрация, отложение амилоида), изменения ионных каналов (ремоделирование ионных каналов, нестабильность захвата Ca, перераспределение межклеточных каналов), повреждение миоцитов (апоптоз и некроз, гипертрофия ми-

оцитов), эндотелиальные и сосудистые нарушения (микрососудистые нарушения, эндокардиальное ремоделирование), изменения в автономной нервной системе (симпатическая гипериннервация) [1].

Учитывая результаты настоящего исследования – более значимая дилатация обоих предсердий с наличием интерстициального отека миокарда у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, имеющих фибрилляцию предсердий, с нарастанием дилатации левого предсердия и левого желудочка, присоединением дилатации и правого предсердия при переходе пароксизмальной формы в постоянную форму фибрилляции предсердий, вероятно, интерстициальный отек и является одним из механизмов развития и/или поддержания фибрилляции предсердий. Таким образом, вероятно, интерстициальный отек миокарда, возникающий при прогрессировании хронической сердечной недостаточности, неадекватном ее лечении, является пусковым моментом электрической нестабильности кардиомиоцитов и их межклеточного взаимодействия. Данная теория нуждается в дальнейшем изучении.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

1. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J.* 2016;37(38):2893-2962.
2. Kannel WB, Abbott RD, Savage DD, McNamara PM. Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation: the Framingham study. *N Engl J Med.* 1982;306(17):1018-1022.

3. Steinberg BA, Holmes DN, Ezekowitz MD, et al. Rate versus rhythm control for management of atrial fibrillation in clinical practice: results from the Outcomes Registry for Better Informed Treatment of Atrial Fibrillation (ORBIT-AF) registry. *Am Heart J.* 2013;165:622–629.
4. Choi YJ, Kang KW, Kim TH, et al. Comparison of Rhythm and Rate Control Strategies for Stroke Occurrence in a Prospective Cohort of Atrial Fibrillation Patients. *Yonsei Med J.* 2018; 59(2): 258–264.
5. AFFIRM Investigators. Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm Management. Baseline characteristics of patients with atrial fibrillation: the AFFIRM Study. *Am Heart J.* 2002;143(6):991-1001.
6. Perez FJ, Lung TH, Ellenbogen KA, et al. Is time to first recurrence of atrial fibrillation correlated with atrial fibrillation burden? *Am J Cardiol* 2006; 97(9): 1343-1345.
7. Ganesan AN, Shipp NJ, Brooks AG, et al. Long-term outcomes of catheter ablation of atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc.* 2013; 2(2): e004549.
8. Spragg DD, Dalal D, Cheema A, et al. Complications of catheter ablation for atrial fibrillation: incidence and predictors. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2008; 19(6): 627-631.
9. Baman TS, Jongnarangsin K, Chugh, A et al. Prevalence and predictors of complications of radiofrequency catheter ablation for atrial fibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2011; 22: 626-631.
10. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal.* 2016; 37(27): 2129–2200.
11. Mareev VYu, Fomin IV, Ageev FT, et al. Clinical guidelines. Chronic heart failure (CHF). *Russian Heart Failure Journal.* 2017;18(1):3–40. In Russian. [Мареев В.Ю., Фомин И.В., Агеев Ф.Т. и др. Клинические рекомендации. Хроническая сердечная недостаточность (ХСН). *Журнал Сердечная Недостаточность.* 2017;18 (1):3–40].
12. Kirillova VV. Early ultrasound detection of venous congestion in pulmonary circulation in patients with chronic heart failure. *Russian Heart Failure Journal.* 2017;18(3):208-212. (In Russian) [Кириллова В.В. Ранняя ультразвуковая диагностика венозного застоя в малом круге кровообращения у пациентов с хронической сердечной недостаточностью. *Журнал Сердечная недостаточность.* 2017;18(3):208-212.]
13. Акаемова ON, Kots YaI, Zheleznov LM, et al. Clinical and morphological changes in the venous system of the heart, depending on the stage of chronic heart failure. *Cardiology.* 2010; 3:51—55. In Russian. [Акаемова О.Н., Коц Я.И., Железнов Л.М. и др. Клинико-морфологические изменения венозной системы сердца в зависимости от стадии хронической сердечной недостаточности. *Кардиология.* 2010; 3:51—55.]

ной недостаточности, ООО Клиника «Уральская»;

Author information:

Venera V. Kirillova, MD, PhD, senior researcher, Institute for medical cell technologies.

Информация об авторах:

Кириллова Венера Вячеславовна, к.м.н., старший научный сотрудник, лаб. антивозрастных технологий, Институт медицинских клеточных технологий; ассистент каф. биохимии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава РФ; зав. отд. ранней диагностики и лечения хронической сердеч-

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ СИСТЕМ НЕИНВАЗИВНОГО И ИНВАЗИВНОГО КАРТИРОВАНИЯ ДЛЯ ИНТЕРВЕНЦИОННОГО ЛЕЧЕНИЯ ЖЕЛУДОЧКОВЫХ АРИТМИЙ

Яшков М.В

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр хирургии
им. А.В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия

Контактная информация

Яшков Максим Валерьевич
ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В.
Вишневского» Минздрава России
ул. Большая Серпуховская, д. 27, Москва,
Россия, 117997
E-mail: maks541@email.ru

*Статья поступила в редакцию 05.06.2018
и принята к печати 12.06.2018.*

Резюме

Актуальность: навигационные системы позволяют выполнить анатомическую реконструкцию сердца, построить активационные карты и выполнить прицельные радиочастотные воздействия. Но такая тактика бывает, неэффективна из-за анатомического расположения аритмогенного очага. Представляется актуальным метод поверхностного неинвазивного картирования, который позволяет определить прогноз, оценить объем оперативного вмешательства и выбрать необходимую технологию для устранения аритмии. Цель: оценить точность и эффективность устранения желудочковых аритмий с использованием неинвазивного поверхностного и инвазивного эндокардиального картирования с использованием отечественных систем «Амикард» (Россия) и «Астрокард» (Россия). Материал и методы – В исследование включены 23 пациента (м – 16, ж – 7) с желудочковыми нарушениями ритма неишемического генеза, которым выполнено неинвазивное дооперационное картирование с использованием системы «Амикард» (Россия) и инвазивное интраоперационное электроанатомическое картирование с использованием комплекса «Астрокард» (Россия) и последующая радиочастотная абляция. Результаты – У 22 пациентов зона ранней активности верифицирована с эндокардиальной поверхности желудочков, с эпикардиальной – в 1 случае. Общая эффективность РЧА составила 82,6%(19). При этом точность совпадения неинвазивного и эндокардиального инвазивного картирования составила 98%. Заключение: применение неинвазивного дооперационного картирования целесообразно у пациентов со сложными нетипичными локализациями желудочковых аритмий. Это позволяет с достаточно высокой точностью верифицировать аритмогенный очаг в желудочках сердца, что подтверждается результатами инвазивного картирования и, безусловно, повысить эффективность РЧА, уменьшить длительность процедуры и лучевой нагрузки, а также определить тактику лечения.

Ключевые слова: радиочастотная абляция, навигационные системы, электроанатомическое инвазивное картирование, неинвазивное картирование

Для цитирования: Яшков М.В. Использование отечественных систем неинвазивного и инвазивного картирования для интервенционного лечения желудочковых аритмий. Трансляционная медицина. 2018; 5 (2): 22–29 .

////////////////////////////////////

USE OF RUSSIAN NON-INVASIVE AND INVASIVE MAPPING SYSTEMS FOR INTERVENTIONAL TREATMENT OF VENTRICULAR ARRHYTHMIAS

Yashkov M.V.

Vishnevsky National Medical Research Centre of Surgery,
Moscow, Russia

Corresponding author:

Maxim V. Yashkov
Vishnevsky National Medical Research Centre of Surgery,
Bolshaya Serpukhovskaya str. 27,
Moscow, Russia, 117997
E-mail: maks541@email.ru

Received 05 June 2018; accepted 12 June 2018.

////////////////////////////////////

Abstract

Background. Navigation systems can perform anatomical reconstruction of the heart, build activation maps and perform accurate radiofrequency ablation (RFA). But they are ineffective because of the anatomical location of the arrhythmogenic focus. The method of surface non-invasive mapping, allows you to determine the prognosis, evaluate the scope and treatment tactics.

The goal is to assess the accuracy and effectiveness of eliminating surface and invasive endocardial mapping using the Russian systems «Amycard» and «Astrocard». **Material and methods.** The study included 23 patients (m – 16, f – 7) with ventricular rhythm disturbances of non-ischemic origin. Patients underwent non-invasive pre-operative mapping using the «Amycard» system and invasive mapping using the «Astrocard» complex and subsequent RFA. **Results.** In 22 patients, the early activity zone was verified from the endocardial ventricular surface, with the epicardial surface in 1 case. Efficiency RFA was 82,6% (19). The accuracy of the coincidence of noninvasive and endocardial invasive mapping was 98%. **Conclusion.** Use of non-invasive preoperative mapping makes possible to accurately verify the arrhythmogenic focus in the heart, as evidenced by the results of invasive mapping. It increases the effectiveness of RFA, reduces the duration of the procedure and fluoroscopy, and determines the tactics of treatment.

Key words: radiofrequency ablation, navigation systems, electroanatomical invasive mapping, non-invasive mapping

For citation: Yashkov M.V. Use of Russian non-invasive and invasive mapping systems for interventional treatment of ventricular arrhythmias. Translyatsionnaya meditsina= Translational Medicine. 2018; 5 (2):pages. (In Russ.) Translyatsionnaya meditsina= Translational Medicine. 2018; 5 (1): 22–29. (In Russ.)

Введение

В современной аритмологии, использование современных новых систем навигационного электроанатомического картирования, кажется не оставило проблем с верификацией аритмогенного субстрата любой локализации. Использование навигационных систем позволяет быстро выполнить анатомическую реконструкцию любой камеры

сердца, построить изохронные, изопотенциальные и активационные карты распространения возбуждения для верификации аритмогенного очага и выполнить прицельные радиочастотные воздействия в зоне интереса. При этом важную роль играет уменьшение времени процедуры, уменьшение используемых катетеров в сердце и минимизация времени флюороскопии для пациента и хирурга.

Несмотря на это, в настоящее время разработаны, внедрены в клиническую практику, с успехом используются и продолжают совершенствоваться системы поверхностного неинвазивного картирования сердца. Одна из них, это система CardioInsite (Medtronic, США), которая широко используется при картировании роторной активности фибрилляции предсердий. Однако она верифицирует очаги только на эпикардиальной поверхности сердца. В России была разработана система «Амикард» (Россия), идея которой предложена и разработана академиком Ревиншвили А.Ш. и группой ученых из МГУ. Система позволяет еще в дооперационном периоде верифицировать зону ранней активации аритмогенного очага, как на эпикардиальной поверхности сердца, что позволяет определить прогноз, оценить объем оперативного вмешательства и выбрать необходимую технологию для устранения аритмии.

Поэтому целью нашего исследования стало – оценить точность и эффективность устранения желудочковых аритмий с использованием неинвазивного поверхностного и инвазивного эндокардиального картирования с использованием отечественных систем «Амикард» (Россия) и «Астрокард» (Россия).

Материал и методы

В исследование включены 23 пациента (м – 16, ж – 7) с желудочковыми нарушениями ритма неинвазивного генеза, которым выполнено неинвазивное дооперационное картирование с использованием системы «Амикард» (Россия) и инвазивное интраоперационное электроанатомическое картирование с использованием комплекса «Астрокард» (Россия) и последующей радиочастотой абляции.

Показаниями для предоперационного поверхностного картирования было: наличие стабильной мономорфной аллоритмии у пациента, нетипичная локализация очага, верифицированная по ЭКГ а также предшествующие неэффективные РЧА.

Пациентам в дооперационном периоде выполнялось неинвазивное картирование с использованием комплекса «Амикард» (Россия). Для этого, применялись одноразовые наклеивающиеся электроды на поверхность грудной клетки и с них синхронно регистрировали ЭКГ в 224 однополюсных отведениях и 6 стандартных отведений от конечностей. Далее, не снимая электродов с поверхности грудной клетки, пациенту выполнялась компьютерная томография сердца в режиме ЭКГ-синхронизации с внутривенным контрастированием сердца.

Полученные данные обрабатывались при помощи программного обеспечения комплекса «Ами-

кард» (Россия). Обработка включала спектральную фильтрацию сигнала от мышечных и сетевых наводок и дрейфа изолинии. Из всей записи выделялись интересные желудочковые комплексы. Далее, в автоматическом режиме, по данным компьютерной томографии проводилось определение координат регистрирующих электродов на поверхности грудной клетки. Воспроизводились полигональные модели желудочков сердца. На основе анализа полученных данных определялись зоны ранней активации миокарда, соответствующее проекциям на эндокард и эпикард эктопических очагов в желудочках сердца.

После получения результатов картирования пациенту в условиях рентгенооперационной выполнялось электрофизиологическое исследование (ЭФИ), электроанатомическое инвазивное картирование с использованием импедансной навигационной системы «Астрокард» (Россия) и радиочастотная абляция (РЧА) аритмогенного очага. При этом во всех случаях выполнялась анатомическая реконструкция и построение активационной карты правого, а при расположении очага в левых отделах – левого желудочка.

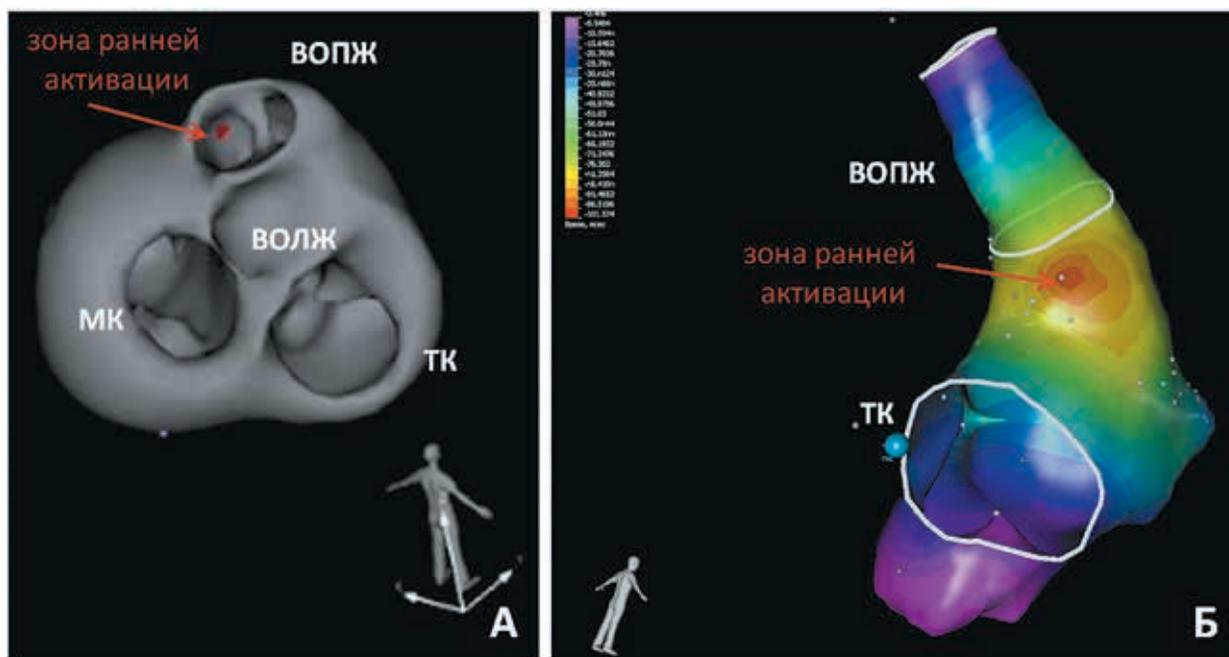
Для выполнения электрофизиологического картирования использовали алгоритм «расе тар», системы «Астрокард» (Россия), позволяющий с точностью до 99%, верифицировать совпадение стимуляционной экстрасистолии со спонтанной.

12 отведений ЭКГ (в диапазоне 0,05-160 Гц) и интракардиальные электрограммы (с фильтром 30-700 Гц) регистрировались и записывались на 128-ти канальном комплексе для проведения внутрисердечных электрофизиологических исследований («Астрокард», Россия) и хранились на жестком диске для последующего анализа.

Для диагностики использовались 10-ти и 20-ти полюсные катетеры, проведенные через подключичную вену и бедренные вены и установленные в дистальные отделы коронарного синуса и по ходу выводного отдела правого желудочка (ВОПЖ) или в верхушку правого желудочка (ПЖ) соответственно.

Если ранняя активация, по установленным в коронарном синусе (КС) и правом желудочке (ПЖ) катетерах, регистрировалась в правых отделах, проводилась пункция правой бедренной вены, управляемый абляционный четырехполюсный электрод ThermoCool, 7Fr (Biosense Webster, США) устанавливался в ПЖ, где выполнялась анатомическая реконструкция ПЖ с поиском зоны ранней активации и построением активационной карты. Если ранних зон в правом желудочке не определялось, проводилась пункция правой бедренной артерии, картирующий электрод трансаортально позиционировался в левых отделах и проводилась реконструкция левого

Рисунок 1. Картирование эктопической желудочковой активности из ВОПЖ



А – карта распространения возбуждения, реконструированная системой неинвазивного картирования Амикард (Россия).

Б – изопотенциальная карта инвазивного электроанатомического картирования системой Астрокард (Россия).

МК – митральный клапан, ТК – трикуспидальный клапан, ВОПЖ – выводной отдел правого желудочка, ВОЛЖ – выводной отдел левого желудочка.

желудочка (ЛЖ) с построением активационной карты.

Во всех случаях использовался алгоритм «расе тар» системы «Астрокард» (Россия). Для этого исходный эктопический желудочковый комплекс отмечался и запоминался в системе как шаблон. Картирующий электрод без прерывания стимуляции последовательно смещался в зоне интереса желудочков в пределах 2-3 мм. Стимуляция проводилась с дистальных полюсов аблационного электрода при 7 – 12 мА и 0,5-1,0 мс, в зависимости от зоны стимуляции. Стимуляционный комплекс автоматически регистрировался, а алгоритм системы проводил идентификацию стимуляционного комплекса со спонтанной экстрасистолией (ЭС), взятой изначально за шаблон и выдавал процент совпадения в режиме реального времени. Удовлетворительным считалось совпадение более 95%.

Результаты неинвазивного и инвазивного картирования и РЧА

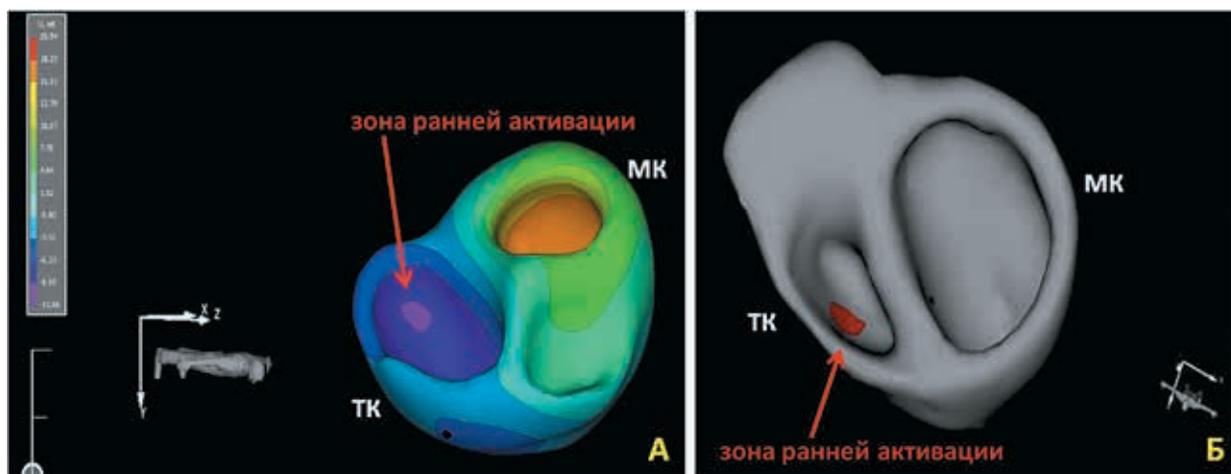
При неинвазивном картировании были реконструированы 3D модели правого и левого желудочков, построены изопотенциальные и изохронные карты на эпикарде и эндокарде желудочков, вы-

водных отделах и межжелудочковой перегородке. Также визуализирована карта распространения возбуждения с верификацией прорыва возбуждения на эндокардиальную или эпикардиальную поверхность сердца.

Были выявлены следующие локализации аритмогенного очага: выводной отдел правого желудочка (ВОПЖ) – у 10 пациентов, приточный отдел правого желудочка (ПОПЖ) – 3, верхушка правого желудочка (ПЖ) – 1, папиллярные мышцы левого желудочка (ЛЖ) – 3, приточный отдел ЛЖ – 1, выводной отдел ЛЖ (ВОЛЖ) – 2. При этом в 22 случаях прорыв возбуждения отмечался на эндокардиальную поверхность сердца, в 1 случае – на эпикардиальную, в проекции коронарной артерии (КА).

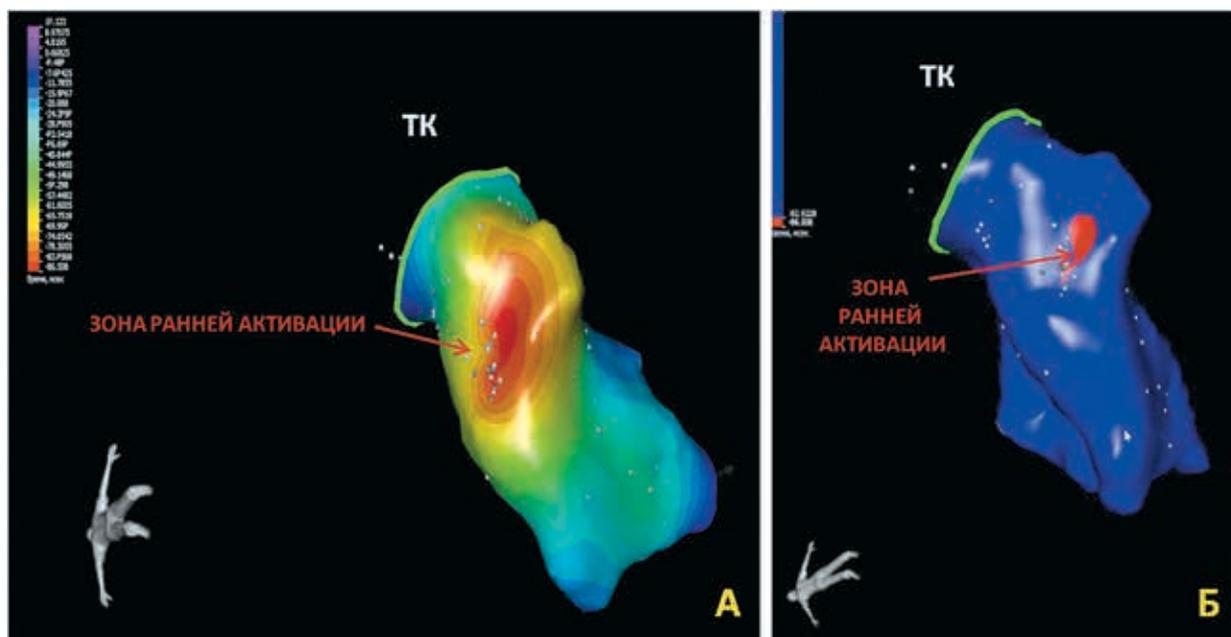
После эндокардиальной электроанатомической реконструкции желудочков сердца во всех случаях расположение очага совпало с неинвазивным картированием. После построения анатомии желудочков в режиме «fast map», картирующий электрод позиционировался в зону ранней активации, полученной при неинвазивном картировании и проводилось прицельное картирование ранней зоны с набором точек от 50 до 100, с использованием алгоритма «расе тар».

Рисунок 2. Картирование эктопической желудочковой активности в верхушке ПЖ



А – карта распространения возбуждения из верхушки ПЖ верифицированная системой неинвазивного картирования Амикард (Россия).
 Б – изопотенциальная карта с зоной ранней активации в верхушке ПЖ построенная с помощью электроанатомического картирования с использованием системы инвазивного картирования Астрокард (Россия).
 ПЖ – правый желудочек, ЛЖ – левый желудочек.

Рисунок 3. Картирование эктопической желудочковой активности из приточного отдела ПЖ неинвазивной системой картирования Амикард (Россия)

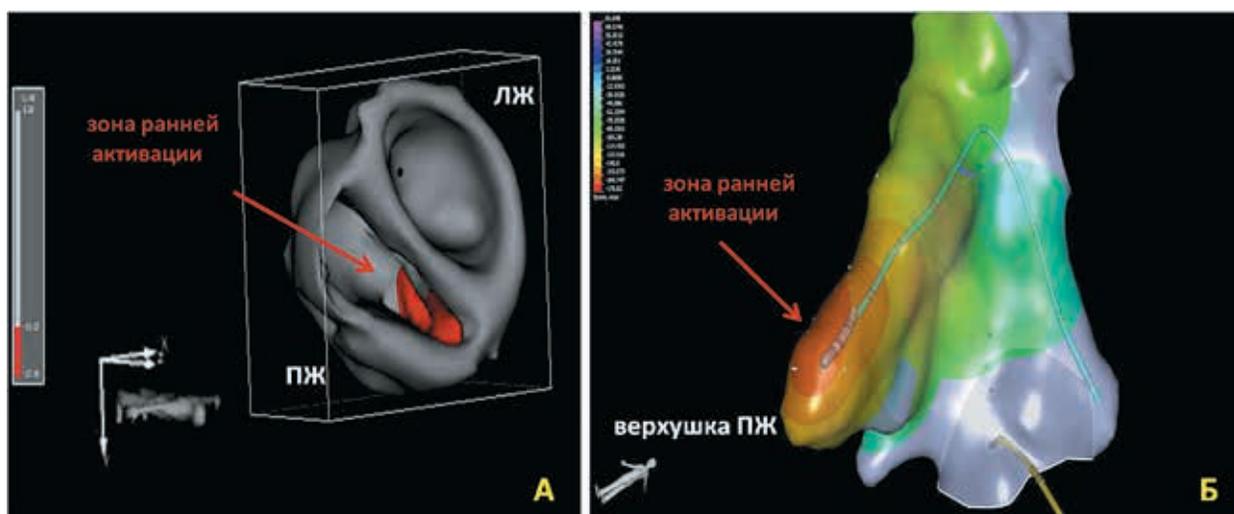


А – изопотенциальная карта с зоной ранней активации под ТК.
 Б – карта распространения возбуждения.
 МК – митральный клапан, ТК – трикуспидальный клапан

При локализации очага в ВОПЖ, у 8 из 10 пациентов при неинвазивном картировании верифицирована септальная локализация в подклапанной области легочной артерии, где достигнут 100 % эффект РЧА. В одном случае положительных критериев достичь не удалось. Несмотря на опережение

в ранней зоне более 55 мс, а процент совпадения при стимуляционном картировании в септальной и переднесептальной области ВОПЖ не превышал 85%. Пробные РЧА были без эффекта. Еще у одного пациента при положительных критериях стимуляционного картирования, опережения в ранней

Рисунок 4. Анатомическая реконструкция ПЖ с использованием системы инвазивного картирования Астрокард (Россия)



А – изопотенциальная карта с зоной ранней активации под ТК.

Б – карта распространения возбуждения в приточном отделе ПЖ.

ТК – трикуспидальный клапан

зоне более 40 мс и совпадения изопотенциальной карты множественные РЧА не привели к эффекту. В этих случаях также решено считать очаг интрамуральным (Рис.1).

У пациентов с локализацией очага в приточном отделе, как правого, так и левого желудочков, несмотря на сложность локализации, было получено положительное стимуляционное картирование, при совпадении более 95%, с зоной ранней активации более 40 мс. (Рис 2, 3).

У пациента с верхушечной эндокардиальной локализацией активности, имеющего в анамнезе две неуспешные РЧА в других клиниках, так же отмечалось совпадение локализации, положительное стимуляционное картирование при совпадении более 95 %, а при РЧА отмечалось исчезновение спонтанной ЭС и пробежек ЖТ во время воздействия. Однако полной элиминации очага достичь не удалось. При последующем суточном мониторинге по Холтеру отмечалось снижение количества ЭС от 22 тыс. до 5 т тыс. в сутки и исчезновение пробежек ЖТ. Эффект расценен как относительный в связи с глубоким расположением очага (Рис.4).

У пациентов с локализацией очага в эпикардиальной области ВОЛЖ, у одного пациента верифицирована зона активации в левом синусе Вальсальвы, с положительным эффектом РЧА. В одном случае ранняя зона находилась внутри коронарной артерии (ПМЖВ), где РЧА не проводилась. При этом, по неинвазивному было четко верифицирована принципиальные различия ранней зоны и активационных карт.

При локализации аритмогенного очага в области папиллярных мышц ЛЖ (у 2 пациентов), благодаря неинвазивному картированию, и построению анатомической модели ЛЖ, прорыв возбуждения определялся в области передней папиллярной мышцы. Это значительно облегчило эндокардиальный поиск ранней зоны.

Параметры РЧА с использованием орошаемого электрода составили 45-48°C, 35-40 Вт. Длительность процедуры составила 75±20 мин, время флюороскопии 35±17 мин. Общая эффективность РЧА составила 82,6%(19). При этом точность совпадения неинвазивного и эндокардиального инвазивного картирования составила 98%.

Обсуждение результатов

В настоящее время в мире существует две системы неинвазивного поверхностного картирования – система CardioInsite (Medtronic) и система Амикард (Россия), позволяющие еще в дооперационном периоде верифицировать зону ранней активации при предсердных и желудочковых аритмиях или область роторной активности при фибрилляции предсердий. Система позволяет определить не только анатомическую локализацию субстрата, но и расположение относительно поверхности сердца – эндокардиально или эпикардиально.

Система работает по принципу обратной задачи ЭКГ. Для этого требуется реконструировать потенциал электрического поля сердца на эпикардиальной поверхности сердца на основе поверхностной записи ЭКГ[1,2]. Решение этой задачи позволяет неинвазив-

ным путем восстановить электрограмму на эпикардиальной поверхности сердца и провести построение эпикардиальных активационных карт. Важное преимущество этого подхода – неинвазивность, а недостаток – проведение только эпикардиального картирования, в то время как эндокардиальное картирование несет более ценную информацию [3,4].

Если раньше топическая диагностика достигалась только путем прямых измерений с поверхности миокарда в условиях хирургического или интервенционного вмешательства, то неинвазивное картирование позволяет с аналогичной точностью достичь результата без интервенции.

Одновременное эпикардиальное и эндокардиальное картирование должно определять глубину источника патологического возбуждения в миокарде по отношению к эпикарду и эндокарду. Такая точность очень важна для выбора тактики лечения хирургического или интервенционного при эктопических аритмиях. По предшествующим Российским исследованиям 2012-2015 года, процент совпадения неинвазивного и инвазивного картирования желудочковых аритмий составил 89% [5,6].

Немаловажную роль для подтверждения точности неинвазивного картирования интраоперационно имеют электрофизиологические критерии нахождения электрода в ранней зоне. Это достигается использованием описанного нами ранее алгоритма «pace map», что, безусловно, позволяет проводить РЧА при максимальных критериях эффективности [7].

Так же, широко используется в настоящее время неинвазивное картирование для верификации областей ранней активации и роторной активности при персистентных формах фибрилляции предсердий с использованием фазовых карт. В настоящее время ведется поиск возможностей проведения прицельной РЧА в областях верифицированных роторов для повышения эффективности катетерного лечения фибрилляции предсердий [8,9]. Аналогичный поиск ведется в мультицентровых исследованиях с использованием системы CardioIsite [10].

Заключение

Использование неинвазивного дооперационного картирования целесообразно использовать у пациентов со сложными нетипичными локализациями желудочковых аритмий. Это позволяет с достаточно высокой точностью верифицировать аритмогенный очаг в желудочках сердца, что подтверждается результатами инвазивного картирования и безусловно повысить эффективность РЧА и уменьшить длительность процедуры и лучевой нагрузки, а также определить на дооперационном этапе тактику лечения.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

1. MacLeod RS, Brooks DH. Recent progress in inverse problems in electrocardiology. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 1998;17(1):73-83.
2. Ramanathan C, Ghanem RN, Jia P, et al. Noninvasive electrocardiographic imaging for cardiac electrophysiology and arrhythmia. *Nat Med.* 2004;10(4):422-428.
3. Bokeriya LA, Revishvili AS, Kalinin VV. Non-invasive endocardial mapping of ventricles on the basis of solution of reverse problem of electrocardiography. *Journal Of Arrhythmology.* 2009; 57: 24-28. In Russian. [Бокерия Л.А., Ревешвили А.Ш., Калинин В.В., Ляджина О.С., Фетисова Е.А., Симонян Г.Ю. Неинвазивное эндокардиальное картирование желудочков сердца на основе решения обратной задачи электрокардиографии. *Вестник аритмологии.* 2009; 57: 24-28].
4. Bokeriya LA, Revishvili AS, Kalinin VV. Hardware-software system for noninvasive electrocardiographic heart examination based on inverse problem of electrocardiography, *Biomedical Engineering,* 2008; 42(6): 273-279. In Russian. [Бокерия Л.А., Ревешвили А.Ш., Калинин А.В. и др. Программно-аппаратный комплекс для неинвазивного электрофизиологического исследования сердца на основе решения обратной задачи электрокардиографии. *Медицинская техника.* 2008; 6: 1-7].
5. Revishvili AS, Kalinin VV, Kalinin AV, et al. Non-Invasive Diagnostics and Results of Interventive Treatment of Cardiac Arrhythmia Using the New System of Non-Invasive Surface Mapping “Amycard OIK”. *Annals of Arrhythmology.* 2012; 3: 39-47. In Russian. [Ревешвили А.Ш., Калинин В.В., Калинин А.В., и др. Неинвазивная диагностика и результаты интервенционного лечения аритмий сердца с использованием новой системы неинвазивного поверхностного картирования «АМИКАРД OIK» *Анналы аритмологии.* 2012; 3: 39-47].
6. Revishvili AS, Wissner E, Lebedev DS, et al. Validation of the mapping accuracy of a novel non-invasive epicardial and endocardial electrophysiology system. *Europace.* 2015;17(8):1282-1288.
7. Revishvili AS, Artyukhina EA, Popov AY, et al. Management of ventricular arrhythmias using the pace map algorithm of the astro-cardio efi 2 electrophysiological system. *Journal Of Arrhythmology.* 2016; 86: 15-19. In Russian. [Ревешвили А.Ш., Артюхина Е.А., Попов А.Ю., и др. Устранение желудочковых нарушений ритма с использованием алгоритма «pace map» электрофизиологической системы «АСТРОКАРД – КАРДИО ЭФИ 2». *Вестник аритмологии.* Санкт-Петербург. 2016; 86: 15-19].
8. Revishvili AS, Artjuhina EA, Labazanova AL, et al. Use of the AMICARD diagnostic complex to eliminate atrial extrasystole from the right upper pulmonary vein. *Journal Of Arrhythmology.* 2011; 66: 59-61. In Russian. [Ревешвили А.Ш., Артюхина Е.А., Лабазанова А.Л., и др. Использование диагностического комплекса АМИКАРД для устранения предсердной экстрасистолы из правой верхней легочной вены. *Вестник аритмологии.* 2011; 66: 59-61].

9. Revishvili ASh, Fetisova EA, Kalinin VV. Electrophysiological mechanisms underlying termination of atrial fibrillation: insights gained from non-invasive phase mapping. *Journal Of Arrhythmology*. 2017; 88: 8-12. In Russian. [Ревишвили А.Ш., Фетисова Е.А., Калинин В.В., и др. Электрофизиологические механизмы прекращения фибрилляции предсердий: новое понимание, полученное на основе неинвазивного фазового картирования. *Вестник аритмологии*. 2017; 88: 8-12].

10. Knecht S, Sohal M, Deisenhofer I, et al. Multicentre evaluation of non-invasive biatrial mapping for persistent atrial fibrillation ablation: the AFACART study. *Europace*. 2017;19(8):1302-1309.

Информация об авторах:

Яшков Максим Валерьевич, врач ординатор, сердечно-сосудистый хирург, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России;

Author information:

Maxim V. Yashkov, resident, cardiovascular surgeon, Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery.

КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭПИЛЕПСИИ У ПАЦИЕНТОВ НЕЙРОХИРУРГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

Одинцова Г.В., Александров М.В., Улитин А.Ю., Колотева А.В.¹

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

Контактная информация
Одинцова Галина Вячеславовна
«РНХИ им. проф. А.Л. Поленова» филиал
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России
ул. Маяковского, д. 12,
Санкт-Петербург, Россия, 191014
E-mail: ajo@mail.ru

Статья поступила в редакцию 23.05.2018
и принята к печати 12.06.2018

Резюме

Цель работы. Проанализировать клинические особенности эпилепсии у пациентов нейрохирургического профиля.

Материалы и методы. Исследование является ретроспективным, когортным, аналитическим наблюдательным. Проанализирована первичная документация базы данных больных эпилепсией, прооперированных в РНХИ им. А.Л. Поленова в период 2012 по 2017 год. Когорта состояла из 91 истории болезни пациентов с фармакорезистентной эпилепсией, проанализированы демографические показатели, клинические особенности заболевания при поступлении в стационар, результаты нейровизуализационных и нейрофизиологических обследований. Сравнение полученных данных проводилось со среднестатистическими данными по эпилепсии.

Результаты. Средний возраст госпитализированных пациентов составил 32г. Средняя длительность эпилепсии – 19лет. 77% пациентов страдали эпилепсией более 10 лет, 41% – более 20 лет. У всех пациентов диагностирована фокальная эпилепсия (100%). Доминировала височная локализация над экстра-темпоральной, соответственно 71 и 29%. Склонность к серийному течению была в когорте у 37,4%(34) больных. У 37,4% как минимум раз в жизни возникал эпилептический статус. В группе пациентов с длительностью более 10 лет наблюдалась тенденция к билатеральному расположению очагов эпилептической активности.

Выводы. Эпилепсия у пациентов нейрохирургического стационара представлена фокальными формами, характеризующимися фармакорезистентностью, неконтролируемыми частыми приступами и поздним обращением к нейрохирургу.

В настоящее время РНХИ им. проф. А.Л.Поленова стал центром по хирургическому лечению сложных форм эпилепсии. Высокая длительность заболевания до поступления требует поиска путей решения проблемы.

Ключевые слова: эпилепсия, нейрохирургия, клинические особенности, фармакорезистентность, прогрессивное течение

Для цитирования: Одинцова Г.В., Александров М.В., Улитин А.Ю., Колотева А.В. Клинические особенности эпилепсии у пациентов нейрохирургического профиля. Трансляционная медицина. 2018; 5 (2): 30–37.

CLINICAL FEATURES OF NEUROSURGICAL EPILEPSY PATIENTS

Odintsova G.V., Aleksandrov M.V., Uitiin A.U., Koloteva A.V.

Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery,
Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Galina V. Odintsova
Polenov Neurosurgical Institute
Mayakovskaya str. 12, Saint Petersburg, Russia, 191014
E-mail: ajo@mail.ru

Received 23 May 2018; accepted 12 June 2018.

Abstract

The purpose was to analyze clinical features of epilepsy in a neurosurgical department. Materials and methods. The study was retrospective. Primary documentation from epilepsy database since 2012 for 2017 was analyzed. The cohort consisted of 91 case histories of patients with drug-resistant epilepsy. Demographic indicators, clinical features of epilepsy, results of neurovisualisation and neurophysiologic dates were analyzed. Comparison of the obtained data was carried out with average data for epilepsy. Results: Average age of the hospitalized patients was 32 y.o. The average duration of an epilepsy – 19 y. 77% of the patients suffered from epilepsy for more than 10 years, 41% – more than 20 y. Focal epilepsy was diagnosed in all cases (100%): temporal localization -71%. extra temporal – 29%. 37,4% patients had clustered seizures. Epileptic status had 3.4%. In the group of patients with epilepsy duration more than 10 years bilateral epileptic activity was observed. Conclusions: The epilepsy in patients in neurosurgical hospital was presented by focal drug-resistant forms, frequent seizures and late administration to a neurosurgeon. Now Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery became a center of surgical treatment of drug-resistant epilepsy. The high duration of a disease in a neurosurgical department demands search for a solution.

Key words: Epilepsy, neurosurgery, clinical features, drug resistant, progressive course

For citation: Odintsova GV, Aleksandrov MV, Uitiin AU, Koloteva AV. Clinical features of neurosurgical epilepsy patients. Translyatsionnaya meditsina= Translational Medicine. 2018; 5 (2): 30–37 pages. (In Russ.)

Актуальность

По данным ВОЗ в мире около 65 миллионов человек страдают эпилепсией. В глобальных масштабах заболевание ежегодно диагностируется у 2,4 миллиона человек. Эпилепсия – это хроническое заболевание головного мозга, характеризующееся повторными, спонтанными (непровоцируемыми) приступами в виде нарушения двигательных, чувствительных, вегетативных, мыслительных или психических функций, возникающими вследствие чрезмерных разрядов нервных клеток в коре большого мозга [1]. Данная нозологическая форма по МКБ-10 включена в группу болезней нервной системы. Однако эпилепсия привлекает внимание многих специалистов и остается мультидисципли-

нарной проблемой [2]. Медикаментозное лечение позволяет достичь регресса клинических и электроэнцефалографических (ЭЭГ) проявлений эпилепсии в 60–70% случаев. В остальных 20–30% случаев врачи сталкиваются с фармакорезистентной формой эпилепсии, при которой тяжесть, частота приступов, неврологических и психических симптомов, а также побочные действия лекарств не поддаются удовлетворительной коррекции и неприемлемы для больного и (или) его близких [3]. Показатели, отражающие эффективность антиэпилептической терапии в течение последних 25–30 лет, существенно не изменились. В настоящее время появились новые антиэпилептические препараты (АЭП). Однако, на современном этапе

развития фармакотерапии позитивные сдвиги в области применения антиконвульсантов не так существенны, новые препараты в большинстве случаев менее токсичны [4]. Таким образом, у 1/3 больных эпилепсией на фоне медикаментозного лечения патологический процесс носит прогрессивный характер и приводит к усугублению клинических проявлений заболевания, а также к дальнейшей социально – трудовой и семейной дезадаптации [5]. Поэтому поиск современных методов лечения лиц с фармакорезистентной эпилепсией остается актуальной проблемой. В этих случаях методом выбора может стать оперативное лечение эпилепсии. Разработкой методов лечения эпилепсии специалисты РНХИ им. А.Л. Поленова занимаются на протяжении многих лет. Сотрудниками института накоплен колоссальный опыт хирургии эпилепсии. В результате разработки современной концепции хирургии эпилепсии больные с фармакорезистентной эпилепсией являются потенциальными кандидатами для проведения хирургического лечения. Выбор тактики и объема хирургического лечения – это сложный вопрос, который решается на консилиуме совместно нейрохирургами, неврологами, нейрофизиологами и нейропсихологами с использованием результатов современных исследований. Клиническая характеристика эпилепсии является не только фактором, определяющим тактику ведения пациента, но и предиктором исхода хирургического лечения. Однако особенности клинической картины заболевания в нейрохирургической эпилептологии исследованы недостаточно.

Цель работы: проанализировать клинические особенности эпилепсии у пациентов нейрохирургического профиля.

Материалы и методы

Исследование является ретроспективным, когортным, аналитическим наблюдательным. Проанализирована первичная документация базы данных больных эпилепсией, прооперированных в РНХИ им. А.Л. Поленова в период 2012 по 2017 год. Проведен анализ 125 историй болезни пациентов, поступивших в РНХИ им. А.Л. Поленова с диагнозом эпилепсия в качестве основного или сопутствующих диагнозов. Критерии включения в исследование:

- Лезиональные и нелезиональные формы эпилепсии длительностью более 2 лет;
- Подтвержденная фармакорезистентность;
- Проведенное в РНХИ им. А.Л. Поленова оперативное вмешательство.

Критерии исключения:

- Структурная эпилепсия, обусловленная объемным образованием головного мозга (опухоль, сосудистые мальформации) при доминировании симптоматики объемного процесса.

Итоговая выборка составила 91 историю болезни пациентов с фармакорезистентной эпилепсией, причем двое из них были прооперированы дважды в период с 2012 по 2017 год. Анализ истории болезни проводился по следующим параметрам: демографические данные (фамилия, имя, отчество, возраст, адрес), анамнез заболевания (возраст де-

Рисунок 1. Длительность заболевания

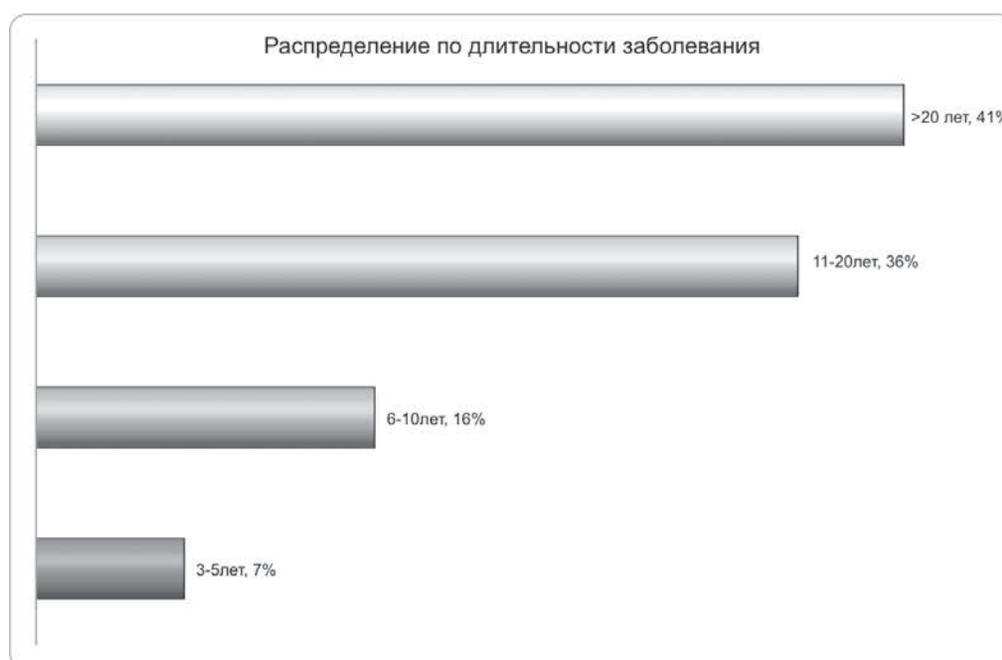


Рисунок 2. Распределение по типу эпилепсии.

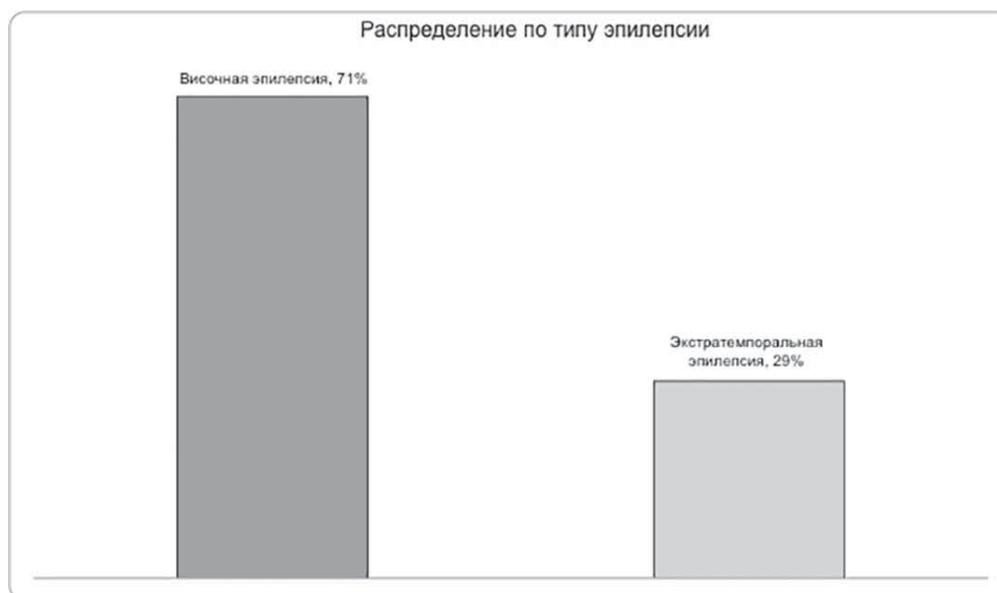


Таблица 1. Типы эпилептических приступов среди пациентов отобранной группы (*по наиболее частому типу приступа)

Типы эпилептических приступов, возникавшие у пациентов	Количество пациентов (абс. число)	Количество пациентов (%)
Парциальные приступы: простые парциальные и сложные парциальные	38	41,8%
Парциальные приступы со вторичной генерализацией *	53	58,2 %
Всего:	91	100%

бюта и длительность заболевания, типирование эпилептических приступов, все использованные схемы медикаментозного лечения в анамнезе); информация об этиологии эпилепсии (перинатальное поражение, инфекционные заболевания ЦНС, травмы и прочее); окончательный диагноз, включающий в себя информацию об оперативных вмешательствах; клиника заболевания на момент поступления в стационар, оценка тяжести течения (типирование эпилептических приступов, их частота, склонность к серийному и статусному течению), схема противосудорожной терапии, нейровизуализационные и нейрофизиологические исследования (электроэнцефалография, видео-электроэнцефалография, МРТ и ПЭТ головного мозга, инвазивные методы исследования биоэлектрической активности мозга). Сравнение полученных данных проводилось со среднестатистическими данными по эпилепсии.

Результаты и обсуждение

В РНХИ им. А.Л. Поленова за период с 2012 года по 2017 год прооперированы 125 пациентов с диагнозом эпилепсия в качестве основного или сопутствующего. Из исследования исключены 34 человека с диагнозом эпилепсия в качестве сопутствующего, с доминированием в клинике симптоматики объемного образования при опухолях и сосудистых образованиях. Итоговая выборка составила 91 историю болезни пациентов с верифицированной фармакорезистентной эпилепсией. Соотношение женщин и мужчин: 40,7% (37 женщины) и 59,3% (54 мужчины). Возрастной диапазон – от 19 до 65 лет, в среднем возраст обращения за нейрохирургической помощью приходился на 32г. Средняя длительность эпилепсии составляла 19лет. Минимальный срок заболевания – 3 года, самый длительный анамнез эпилепсии – 50 лет. Рас-

Таблица 2. Локализация эпилептиформной активности на ЭЭГ (*по результатам нейрофизиологических исследований)

Локализация эпилептиформной активности	Количество пациентов (абс. число)	Количество пациентов (%)
Латерализованный очаг	40	43,9%
Латерализованный очаг с вовлечением срединных структур	12	13,2%
Бипатеральная активность	39	42,9%
Всего	91	100%

Таблица 3. Результаты МРТ

Без очаговых изменений	Единичные изменения на МРТ		Несколько изменённых участков головного мозга на МРТ		
	В головном мозге (исключая гиппокампы)	Изолированно в гиппокампе	В обоих полушариях (исключая гиппокампы)	Сочетание изменений в полушарии и гиппокампе	Изменения в гиппокампах обоих полушарий
19	16	13	5	22	5

пределение по продолжительности заболевания: 3 – 5 лет -6 пациентов (7%), 6 – 10 лет -15 пациентов (16%), 11-20 лет- 33 пациента(36%) и более 20 лет течения тяжелой формы фармакорезистентной эпилепсии.- 37 пациентов(41%) (рис.1)

Таким образом, 77% пациентов страдали эпилепсией до поступления в нейрохирургический стационар более 10 лет, при этом у 41% длительность заболевания составляла более 20 лет. Отмечается увеличение обращаемости при нарастании длительности заболевания, что характеризует отношение к хирургическому лечению как к терапии отчаяния, а не равноценному способу лечения эпилепсии.

Дебют эпилепсии доминировал в детском возрасте, преимущественно в пубертатном, в среднем приходился на 12 лет. У всех пациентов отмечалась фокальная эпилепсия (100%). Доминировала височная локализация над экстратемпоральной, соответственно 71 и 29% (рис.2).

Так же у всех пациентов отмечалась активная, неконтролируемая эпилепсия (100%). Оценка тяжести приступов проведена по шкале по международной шкале частоты приступов – «Seizure frequency scores»(SFS): 1- отсутствие, 2-спорадические (один приступ в месяц или реже), 3- частые (четыре приступа в месяц или реже) и 4- очень частые (от одного

приступа в неделю до одного и более приступов в день). У 100 % пациентов частота приступов была более 1 раза в месяц, таким образом, все пациенты были с 3 и 4 степенью тяжести по шкале SFS. Преобладали еженедельные приступы, на втором месте – ежедневные, значительно реже встречались ежемесячные приступы. Все приступы были с фокальным началом. Однако доминировали вторично-генерализованные приступы. Тенденция к возникновению приступов с вторичной генерализацией наблюдалась у 58% пациентов, На втором месте по частоте были сложные парциальные с нарушением сознания и автоматизмами. Редко отмечались простые парциальные приступы, во всех случаях в структуре полиморфных приступов.

Склонность к серийному течению была в когорте у 37,4%(34) больных. У 37,4% как минимум раз в жизни возникал эпилептический статус.

Оценка количества и качества ранее проводимой противоэпилептической терапии была затруднена в связи с недостатком достоверно документированной информации. Анамнез антиэпилептической терапии у большинства пациентов включал 3 и более препаратов. Каждый из пациентов применял несколько схем терапии. В среднем в анамнезе отмечен прием 4 АЭП (от 3 до 10 различных препаратов). Таким

Таблица 4. Этиология эпилепсии

Этиология эпилепсии	Количество пациентов (абс. число)	Количество пациентов (%)
Криптогенная эпилепсия	34	37,4%
Фокальная кортикальная дисплазия	11	12,1%
Постинфекционная	8	8,8%
Перинатальное поражение	9	9,9%
Посттравматическая	29	31,8%
Всего	91	100%

образом, в соответствии с критериями Международной противоэпилептической лиги все пациенты страдали фармакорезистентной эпилепсией.

Нейрофизиологическое обследование включало электроэнцефалографию (ЭЭГ), видео – ЭЭГ, по показаниям – установку инвазивных электродов. В 44% случаев по данным нейрофизиологических исследований очаг эпилептической активности был латерализован, в 13,2% имелась тенденция к вовлечению в эпилептическую активность стволовых структур и в 42,9% случаев эпилептическая активность обнаруживалась билатерально. В группе пациентов с длительностью 10 и более лет наблюдалась тенденция к билатеральному расположению очагов эпилептической активности (соотношение латерализованного эпилептического очага к билатеральному расположению очагов 1: 1,3). Таким образом, структура выборки по распространению патологической активности в головном мозге показала практически равную представленность очаговой латерализованной эпилептиформной активности и билатеральной.

При магнитно-резонансная томографии преобладали двусторонние изменения (32 случая) над односторонними (29 случаев). При проведении МРТ в веществе головного мозга были обнаружены единичные изменения в 36,2%, множественные изменения в 40 % случаев и 23,8% исследований дали МРТ-негативный результат. МР – негативная эпилепсия отмечена в 19 случаях (таб.3).

При позитронно-эмиссионной томографии с ¹⁸F-фтордезоксиглюкозой преобладали односторонние изменения (36/56; 64,3%) над двусторонними (16/56; 35,7%).

Определение этиологии эпилепсии базировалось на комплексном обследовании, включающем анамнестические данные, нейровизуализационные и патоморфологические.

Этиология эпилепсии была известна в 62,6%, в 37,4% случаев заболевание расценивалось как неясной этиологии согласно новой классификации эпилепсий 2017 года (криптогенной, условно симптоматической согласно ранее применяемой терминологии).

Обсуждение.

Работа выполнена на основании ретроспективного анализа историй болезни с целью выделить особенности эпилепсии у пациентов нейрохирургического профиля. Проанализированы 91 история болезни.

Анализ полученных данных установил, что для данной категории пациентов характерен длительный анамнез заболевания и позднее обращение к хирургическим методам лечения. Преобладал дебют в детском возрасте, что в целом характерно для эпилепсии [6]. Дебют эпилепсии в этом возрасте обусловлен срывом компенсаторных механизмов центральной нервной системы при гормональной перестройке организма [7]. При оценке тяжести течения приступов обращает на себя внимание факт, что чем длиннее анамнез заболевания, тем больше выражена тенденция к возникновению тяжелых эпилептических приступов, как вторично-генерализованных, так и серийных, часто сопровождающихся травматизацией пациентов. Тяжелое прогрессивное течение заболевания, неэффективность медикаментозного лечения характерны для пациентов нейрохирургического стационара. В эпилептологии фармакорезистентные эпилепсии составляют от 30 до 40%, в нейрохирургическом стационаре – 100%, так же характеризуются более тяжелым течением.

Расширение возможностей нейровизуализации, увеличение хирургической активности вывели на новый уровень вопросы этиологии эпилепсии. Осо-

бенностью нейрохирургического стационара является возможность применения патоморфологических исследований для верификации МР – негативных структурных изменений головного мозга [8]. Высокий процент криптогенных форм в исследовании частично обусловлен отсутствием патоморфологических исследований при паллиативных операциях.

Хирургическое лечение фармакорезистентной эпилепсии — это этап комплексной терапии заболевания, предполагающий с современных позиций прием противоэпилептической терапии не менее 5 лет после операции. В среде эпилептологов 20 века результаты хирургического лечения эпилепсии оценивались только по снижению частоты и/или прекращению эпилептических приступов [9]. На сегодняшний день считается, что целью хирургического вмешательства при эпилепсии являются: полное прекращение приступов или существенное снижение их частоты и тяжести, улучшение социально-трудовой и педагогической адаптации, улучшение качества жизни при минимальных негативных последствиях [10]. Для женщин не менее важно полноценное семейное функционирование после хирургического лечения эпилепсии, возможность планирования беременности [11]. Исследования этой проблемы показали, что пациенты с резистентной эпилепсией после оперативного лечения имеют качество жизни выше, чем пациенты, которые получали только медикаментозную терапию. [12]. Таким образом, исследование клинических особенностей эпилепсии у пациентов нейрохирургического профиля важно для характеристики проблемы и определения путей оптимизации лечения.

Заключение. Эпилепсия у пациентов нейрохирургического стационара представлена фокальными формами, характеризующимися фармакорезистентностью, неконтролируемыми частыми приступами. Течение заболевания прогрессивное, у трети больных с эпилептическим статусом в анамнезе.

В настоящее время РНХИ им. проф. А.Л.Поленова стал центром по хирургическому лечению сложных форм эпилепсии, что в первую очередь отразилось в преобладании больных с большим стажем заболевания. В то же время длительность заболевания до поступления в нейрохирургический стационар является управляемым показателем и требует поиска путей решения проблемы.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

1. Karlov VA. Epilepsy, M.:Meditsina, 1990. p. 336. In Russian. [Карлов В.А. Эпилепсия. М.: Медицина, 1990. с. 336].
2. Neznanov NG, Gromov SA, Mikhailov VA. Epilepsy. Quality of life. Treatment. SPb.: Medical publishing, 2005. p. 294. In Russian. [Незнанов Н.Г., Громов С.А., Михайлов В.А. Эпилепсия. Качество жизни. Лечение. СПб.: Медицинское издательство, 2005. с.294].
3. Zenkov LR. Clinical epileptology, Guidelines, 2nd ed. M.: Moscow information agency, 2010. p. 408. In Russian. [Зенков Л.Р. Клиническая эпилептология (с элементами нейрофизиологии): Руководство для врачей. 2-е изд. М.: Медицинское информационное агентство, 2010. с. 408].
4. Karlov VA. Pharmacoresistance and tolerability in epilepsy. Journal of neurology and psychiatry. 2008; 10: 10-12. In Russian. [Карлов В.А. Фармакорезистентность и толерантность при эпилепсии. Журнал неврологии и психиатрии. 2008; 10: 10–12].
5. Bersnev VP, Shershever AS, Lebedev K, et al. Diagnostics and treatment of progradiental epilepsy. SPb.: Desyatka, 2008. p.264. In Russian. [Берснев В.П., Шершевер А.С., Лебедев К. и др. Диагностика и лечение прогрессирующих форм эпилепсии. СПб.: Десятка, 2008. с. 264].
6. Odintsova GV, Koroleva NY, Chugunova AA, Saykova LA. Epidemiology of onset age of female epilepsy. Epilepsia and paroxysmal conditions. 2011;3(3):29-32. In Russian. [Одинцова Г.В., Королева Н.Ю., Чугунова А.А., Сайкова Л.А. Эпидемиология возраста дебюта женской эпилепсии. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2011; 3 (3): 29-32].
7. Khachatryan RG, Odintsova GV, Don OA, Insular epilepsy etiology: clinical manifestation and management tactics for cerebral cavernous angiomas. Kazan medical journal. 2018; 99(1): 96-99. In Russian. [Хачатрян Р.Г., Одинцова Г.В., Дон О.А., и др. Этиология инсультной эпилепсии: клиническая картина и тактика ведения при церебральных кавернозных ангиомах. Казанский медицинский журнал. 2018; 99(1): 96-99].
8. Malyshev SM, Nezdorovina VG, Zabrodskaya YM. Mild malformation of cortical development as a substrate for mri-negative temporal epilepsy. Epilepsia. 2017; 58 (Suppl. 5):S118.
9. Quality of life of epilepsy patients after epilepsy surgery. In Russian. [Меликян Э.Г., Лебедева А.В., Мильчакова Л.Е., Гехт А.Б. Качество жизни у пациентов с эпилепсией при хирургических методах лечения. Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. 2009; 4(1): 96-99]. In Russian. [Броун Т., Холмс Г. Эпилепсия. Клиническое руководство: Пер. с англ. Под ред. проф. К.Ю. Мухина. М.: БИНОМ, 2014. с. 280].
10. Odintsova GV, Kuralbaev AK, Nezdorovina VG, et al. Surgical treatment of temporal epilepsy: problems and effectiveness (A clinical case). Epilepsia and paroxysmal conditions. 2017;9(2):41-49. In Russian. [Одинцова Г.В., Куралбаев А.К., Нездоровина В.Г., и др. Хирургическое лечение височной эпилепсии: проблемы и эффективность (на примере клинического случая). Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2017;9(2):41-49].
11. Melikyan EG, Lebedeva AV. Pharmacoresistant epilepsies. Physician. 2011; 2: 25-29. In Russian. [Меликян Э.Г., Лебедева А.В. Фармакорезистентные эпилепсии. Врач. 2011; 2: 25-29].

Благодарности/Acknowledgment

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-013-00222.

Информация об авторах:

Одинцова Галина Вячеславовна, к.м.н., старший научный сотрудник, отделение клинической нейрофизиологии, РНХИ им. профессора А.Л. Поленова;

Александров Михаил Всеволодович, д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической нейрофизиологии, РНХИ им. профессора А.Л. Поленова;

Улитин Алексей Юрьевич, д.м.н., директор, РНХИ им. профессора А.Л. Поленова;

Колотева Анна Валерьевна, ординатор ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова;

Author information:

Galina V. Odintsova, MD, senior research fellow, Department of Clinical Neurophysiology, Polenov Neurosurgical Institute;

Mikhail V. Aleksandrov, MD, professor, head of the Department of Clinical Neurophysiology, Polenov Neurosurgical Institute;

Aleksej Yu. Ulitin, MD, director, Polenov Neurosurgical Institute;

Anna V. Koloteva, resident Almazov National Medical Research Centre;

ДИНАМИКА ТКАНЕВОЙ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА ПРИ МЕЛАНОМЕ КОЖИ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛИ У САМОК МЫШЕЙ

Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М., Каплиева И.В.,
Трепитаки Л.К., Бандовкина В.А., Козлова Л.С.,
Погорелова Ю.А., Розенко Л.Я., Черярина Н.Д.

Контактная информация:
Козлова Лариса Степановна
ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России
14-я линия, д.63,
Ростов-на-Дону, Россия, 344037
E-mail: super.gormon@yandex.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Ростов-на-Дону, Россия

Статья поступила в редакцию 10.04.2018
и принята к печати 10.05.2018.

Резюме

Хроническая боль – патологический процесс, изменяющий метаболизм всего организма. Цель: определение регуляторов плазминогена в ткани меланомы кожи и участков кожи, не связанных с опухолью, мышей-самок в динамике роста экспериментальной меланомы, воспроизведенной на фоне хронической нейрогенной боли. Материалы и методы. Меланома В16/F10 воспроизведена на фоне модели хронической нейрогенной боли на самках мышей C57BL/6. Определяли содержание плазмина, связанного с α -2-антиплазмином (РАР), урокиназного (pro-uPA и uPA) и тканевого (pro-tPA и tPA) активаторов плазминогена, рецептор uPA (uPAR), серпин-1 (PAI-1) методами ИФА на стандартных тест-системах. Статистика: программа Statistica 10. Результаты. При хронизации нейрогенного болевого синдрома установлены значимые изменения компонентов фибринолиза в коже самок мышей C57BL/6. После перевивки меланомы В16/F10 (1-3 недели), в коже и опухоли найдены: достоверно более высокое содержание РАР, рецептора uPAR ($p < 0,05$), достоверно пониженное содержание pro-uPA и uPA, pro-tPA и tPA, PAI-1 ($p < 0,05$), относительно данных группы сравнения (стандартная модель меланомы). Заключение. Результаты определения состояния тканевого фибринолиза в коже и опухоли самок мышей C57BL/6 свидетельствуют о том, что, при формировании опухоли на фоне хронической нейрогенной боли, плазмин, tPA, uPA, uPAR и PAI-1 играют ведущую роль в быстром росте и повышении злокачественности меланомы. Изучение предлагаемой модели позволит прояснить многие вопросы канцерогенеза и генерализации злокачественного процесса.

Ключевые слова: боль, меланома кожи, метастазирование, активаторы плазминогена, PAI-1

Для цитирования: Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Бандовкина В.А., Козлова Л.С., Погорелова Ю.А., Розенко Л.Я., Черярина Н.Д. Динамика тканевой системы регуляторов плазминогена при меланоме кожи на фоне хронической боли у самок мышей. Трансляционная медицина. 2018; 5 (2): 38–46.

////////////////////////////////////

DYNAMICS OF THE TISSUE SYSTEM OF PLASMINOGEN REGULATORS IN CUTANEOUS MELANOMA WITH CHRONIC PAIN IN FEMALE MICE

Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kotieva I.M., Kaplieva I.V.,
Trepitaki L.K., Bandovkina V.A., Kozlova L.S., Pogorelova Yu.A.,
Rozenko L.Ya., Cheryarina N.D.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Corresponding author:

Larisa S. Kozlova
Rostov Research Institute of Oncology
14 line, 63,
Rostov-on-Don, Russia, 344037
E-mail: super.gormon@yandex.ru

Received 10 April 2018; accepted 10 May
2018.

////////////////////////////////////

Abstract

Background. Chronic pain is a pathologic process changing the whole body metabolism. **Objective:** determination of plasminogen regulators in tissues of cutaneous melanoma and in the skin tissues not associated with the tumor in female mice in the dynamics of the growth of experimental melanoma with chronic neurogenic pain. **Design and methods.** B16/F10 melanoma with chronic pain was reproduced in female C57BL/6 mice. Plasmin-alpha2-antiplasmin complex (PAP), urokinase (pro-uPA and uPA) and tissue (pro-tPA and tPA) plasminogen activators, the uPA (uPAR) receptor and serpin-1 (PAI-1) were determined by ELISA using standard test systems. Results were analyzed using the Statistica 10 program. **Results.** Chronic neurogenic pain was accompanied by significant changes in the fibrinolysis components in the skin of female C57BL/6 mice. After the B16/F10 melanoma transplantation (1-3 weeks), skin and tumor tissues showed higher levels of PAP and the uPAR receptor ($p < 0.05$), decreased levels of pro-uPA and uPA, pro-tPA and tPA, and PAI-1 ($p < 0.05$), compared to the comparison group (standard melanoma model). **Conclusion.** Analysis of the state of the tissue fibrinolysis in the skin and tumors of female C57BL/6 mice demonstrated that during the tumor formation with chronic neurogenic pain, plasmin, tPA, uPA, uPAR and PAI-1 play a leading role in the rapid growth and increased malignancy of melanoma. The study of the proposed model will make it possible to clarify many questions of carcinogenesis and the generalization of the malignant process. Studying the model can clarify many issues of the carcinogenesis and progression of the malignant process.

Key words: pain, cutaneous melanoma, metastasis, plasminogen activators, PAI-1

For citation: Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kotieva I.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Bandovkina V.A., Kozlova L.S., Pogorelova Yu.A., Rozenko L.Ya., Cheryarina N.D. Dynamics of the tissue system of plasminogen regulators in cutaneous melanoma with chronic pain in female mice. Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2018; 5 (2): 38–46pages. (In Russ.)

Список сокращений:

mPHK – матричная PHK
PAI-1 – активность серпина-1 (ингибитора-1 активаторов плазминогена)
про-PAI-1 – антигенная форма серпина-1
про-tPA – профермент активатора плазминогена тканевого типа

pro-uPA – профермент урокиназы
tPA – активатор плазминогена тканевого типа
uPA – активатор плазминогена урокиназного типа
uPAR – рецептор урокиназы
PAP – плазмин, связанный с α -2-антиплазмином

Введение

Хроническая боль перестраивает деятельность всех отделов центральной нервной системы, ухудшая работу афферентных путей и их корковых центров, поскольку является длительно существующим доминантным очагом возбуждения [1-5]. В основе болевого синдрома и деструктивных процессов лежит активация аутолиза, обусловленная накоплением в цитоплазме клеток лизосомальных ферментов [1,6]. Известно, что внеклеточный ферментативный каскад активаторов плазминогена регулирует пластичность нейронов и модификацию внеклеточного матрикса, а также является важным фактором долгосрочной регуляции метаболизма ЦНС [7]. Ферменты и ингибиторы каскада регуляции плазминогена, регулирующие реципрокно, непосредственно участвуют как в санации, так и разрушении межклеточного матрикса, базальной и клеточных мембран, в том числе при онкологических заболеваниях [8-10]. Образование плазмина происходит под действием активаторов плазминогена урокиназного (uPA) и тканевого (tPA) типов, с участием рецептора урокиназы uPAR, активность последних подавляется серпинами PAI-1 и PAI-2 [9,10]. Регуляторы плазминогена могут действовать аутокринно, модулируя внеклеточную протеолитическую активность после повреждения нерва [3,7], что имеет решающее значение в развитии злокачественной трансформации и миграции клеток. Пока нет ответа на вопрос: участвует ли хроническая боль в прогрессии экспериментальных опухолей. Идеальной моделью для решения этой задачи является меланома B16/F10, спонтанно возникающая у основания уха мышей линии C57BL/6. Некоторые механизмы повышения злокачественности этой меланомы, динамика ряда ферментов, задействованных в злокачественном росте, под влиянием хронической нейрогенной боли, уже были описаны [11,12], однако состояние каскада регуляции плазминогена в сравнительном аспекте с традиционной моделью еще не исследовалось.

Цель исследования: определение компонентов каскада регуляции плазминогена в ткани меланомы кожи и участков кожи, не связанных с опухолью, мышцей-самок в динамике роста экспериментальной меланомы B16/F10, воспроизведенной на фоне хронической нейрогенной боли.

Материалы и методы

Работа выполнена на самках мышей линии C57BL/6 (n=64), 8-недельного возраста с начальной массой 24-26 г. Животные получены из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область)». В работе использовали клеточную линию мышины,

метастазирующей в легкие, меланомы B16/F10, полученную из РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва). Все исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Распределение животных: основная группа – 28 мышей, которым меланому B16/F10 воспроизводили после создания модели хронической боли, и контрольная группа – 7 мышей с воспроизведенной моделью хронической нейрогенной боли без перевивки опухоли (контроль). В группу сравнения (стандартная модель меланомы) вошли 22 мыши с перевивкой меланомы B16/F10 в тех же дозе и объеме, что и в основной группе, но без воспроизведения хронической боли. Результаты сравнивали с данными исследования кожи 7 самок интактных мышей (нормой). Постановка эксперимента по перевивке меланомы на фоне хронической нейрогенной боли подробно описана ранее [11,12]. При стандартной перевивке опухоль появляется в 100% случаев, достаточно быстро растёт и на 12-16 сутки роста метастазирует, преимущественно гематогенно, в легкие (60-90%), реже – в печень и селезенку [13].

В цитозольной фракции кожи и опухоли определяли содержание PAR, pro-uPA и uPA, pro-tPA и tPA, uPAR, PAI-1 методами ИФА на стандартных тест-системах. Статистика: программа Statistica 10 с определением среднего и стандартного отклонения ($M \pm m$). Различия между средними оценивались с помощью критерия суммы рангов Вилкоксона и при $p < 0,05$ считали значимыми.

Результаты

При исследовании цитозольной фракции интактной кожи (норма) у всех самок мышей установлено наличие PAR, uPAR, tPA, uPA, PAI-1 (табл. 1,2). Под влиянием нейрогенной хронической боли количество PAR увеличилось в 2,5 раза, относительно нормы; pro-uPA и uPA снизились практически до полного истощения. Количество uPAR в коже увеличилось в 1,5 раза, сравнительно с интактными животными. Уровень pro-tPA увеличился в 3,8 раза, а tPA снизился в 2,0 раза. Одновременно возрастало количество pro-PAI-1 в 1,3 раза и уменьшалось PAI-1 в 2,7 раза.

ТАБЛ. 1

К окончанию 1 недели после перевивки меланомы на фоне хронической нейрогенной боли в коже мышцей основной группы возрастал уровень PAR – в 1,6 раза, pro-uPA – в 3,5 раза, uPA – в 2,0 раза (табл.

Таблица 1. Активность и содержание компонентов фибринолитической системы в коже у самок мышей с меланомой B16/F10 на фоне нейрогенной хронической боли (M±m)

Показатели	Интактные животные, кожа		1 неделя, кожа		2 недели, кожа		3 недели, кожа	
	Без боли, норма	С болью*	Группа сравнения	Основная группа*	Группа сравнения	Основная группа*	Группа сравнения	Основная группа*
РАР (нг/г тк)	10,71±0,7	27,13±2,2¹	13,91±0,8 ¹	42,87±3,5¹	19,03±1,07 ^{1,2}	21,78±1,71¹	19,91±1,4 ¹	21,97±1,72¹
uPAR (пг/г тк)	56,06±4,5	84,10±7,2¹	56,03±4,7	77,10±6,5	43,75±3,7 ¹	63,08±4,9	65,36±5,6	57,20±4,8
uPA (ед/г тк)	1,611±0,10	0,013±0,007¹	1,202±0,07 ¹	0,020±0,0017^{1,2}	1,814±0,11	0,021±0,0016¹	2,504±0,15 ^{1,2}	0,020±0,0015¹
pro-uPA (нг/г тк)	31,72±2,1	1,147±0,09¹	164,3±9,8 ¹	4,010±0,3¹	185,4±13,9 ¹	6,961±0,58^{1,2}	187,5±13,1 ¹	6,301±0,51¹
tPA (ед/г тк)	0,603±0,05	0,337±0,02¹	1,021±0,06 ¹	0,378±0,030	0,711±0,07	0,320±0,026	0,709±0,06	0,289±0,021
pro-tPA (нг/г тк)	0,404±0,02	1,457±0,1¹	4,106±0,3	1,401±0,11	2,622±0,18 ^{1,2}	1,722±0,1^{1,2}	2,014±0,13 ^{1,2}	2,214±0,15^{1,2}
РАI-1 (ед/г тк)	24,01±0,16	8,803±0,6¹	98,51±7,4 ¹	4,460±0,35¹	83,12±5,3 ¹	5,856±0,47^{1,2}	24,06±1,4 ²	10,61±0,8^{1,2}
pro-РАI-1 (нг/г тк)	9,911±0,4	12,67±0,9¹	68,52±5,2 ¹	12,70±0,98	150,1±7,6 ^{1,2}	12,16±0,96	24,51±1,8 ^{1,2}	12,39±0,94

Примечание: ¹ – различия достоверны, относительно данных соответствующих интактных животных (p<0,05); ² – различия достоверны, относительно предыдущего срока исследования (p<0,05). * Жирным шрифтом выделены данные групп мышей с нейрогенной болью.

1), относительно контрольной группы с хронической нейрогенной болью. Содержание обеих форм tPA и уровень pro-РАI-1 не изменились, а РАI-1 уменьшился в 2,0 раза. В коже мышей группы сравнения через 1 неделю после стандартной перевивки меланомы увеличились, относительно показателей кожи интактных мышей без боли (нормы): РАР – в 1,3 раза, что было ниже, чем в основной группе в 3,1 раза; pro-uPA и РАI-1 – в 5,2 и 4,1 раза, что на порядок выше, чем в основной группе; pro-РАI-1 – в 6,9 раза, т.е. в 5,4 раза выше, чем в коже мышей основной группы. Уровень tPA возрос в 1,7 раза и оказался в 2,7 раза выше, чем у мышей основной группы, а pro-tPA увеличился на порядок, относительно нормы и был в 2,9 раза выше, чем в основной группе. Уровень uPA снизился, сравнительно с нормой в 1,3 раза, но был на два порядка выше, чем в основной группе. Количество uPAR не отличалось от значений, найденных в коже интактных мышей.

Через 2 и 3 недели после перевивки только в коже мышей группы сравнения уровень обеих форм uPA оставался высоким (табл. 1). Содержание РАР стабилизировалось примерно на одном уровне в коже всех животных; uPAR, после снижения в двухнедельный срок в группе сравнения, достиг нормы у всех животных; обе формы uPA ста-

билизировались у всех животных. tPA снизился до нормы в группе сравнения и оставался стабильно пониженным в основной группе. Содержание pro-РАI-1 еще повышалось через 2 недели в 2,2 раза и обе формы снижались в конце 3 недели: РАI-1 – до нормы, а pro-РАI-1 – в 6,1 раза, не достигая нормы.

В ткани опухоли меланомы B16/F10 мышей основной группы через 1 неделю после перевивки найдено достоверное увеличение уровня всех показателей, относительно кожи контрольных животных с хронической нейрогенной болью, только уровень растворимого uPAR снижался в 1,3 раза (табл. 2). В группе сравнения в этот срок исследования опухоли еще не регистрировались.

ТАБЛ. 2

Через 2 недели наблюдения содержание РАР в опухоли мышей основной группы превышало таковое во все сроки исследования у мышей обеих групп. Количество растворимого uPAR через 2 недели соответствовало норме в обеих группах, а через 3 недели оказалось самым высоким в опухоли, сформировавшейся на фоне хронической боли. Проурокиназа накапливалась в опухолях обеих групп, но у мышей группы сравнения содержание pro-uPA было на порядок выше и через 2, и через 3 недели эксперимента. Активация pro-uPA в uPA в опухолях

мышей группы сравнения происходила интенсивнее, чем основной, более чем в 100 раз во все сроки исследования (табл. 2). Содержание обеих форм tPA было максимальным через 2 недели после перевивки опухоли в обеих группах мышей; через 3 недели наблюдали его снижение, и оно было более выражено при развитии меланомы на фоне хронической боли. Если активация pro-PAI-1 была заторможена при формировании нейрогенной боли, то после перевивки меланомы через 1 и 2 недели наблюдалось резкое увеличение количества обеих форм этого серпина у всех мышей и достоверное снижение через 3 недели, также у всех животных. Однако в опухолях мышей группы сравнения через 2 и 3 недели его количество достоверно превышало таковое в опухолях мышей основной группы.

Анализ наблюдений, полученных в ходе эксперимента, показал, что на фоне хронической боли перевивная меланома B16/F10 развивалась быстрее: опухоли появлялись раньше (через 1 неделю после перевивки), имели двухфазный рост, 100% синхронное метастазирование (на 1 неделе), помимо традиционных мишеней (легких, печени, режы – селезенки), в нетрадиционные органы – сердце и матку. У мышей группы сравнения опухоли появлялись через 2 недели, метастазы регистрировались только через 4 недели (96,3% в легкое, позже – еще 14,8% в печень и селезенку). Сроки жизни животных с меланомой на фоне хронической нейрогенной боли сокращались: средняя продолжительность жизни для мышей основной группы составляла $19,17 \pm 1,35$ дней, мышей группы сравнения – $30,25 \pm 1,67$ дня.

Обсуждение

Метаболические изменения, связанные с хроническими болевыми состояниями изучены мало. Согласно исследованиям Ru-Rong Ji et al. [14], боль стимулирует синтез и освобождение цитокинов, хемокинов, факторов роста и многих других протеиназ из глиальных клеток во внеклеточное пространство. Ранее Yamanaka H. et al. [2] обнаружили увеличение индукции mPNC для tPA и uPA в ганглиях дорзального корешка крысы после перерезки седалищного нерва. После этой манипуляции авторы фиксировали отсутствие иммунореактивности для uPA и отсутствие uPA-опосредованного протеолиза. Иммунореактивность для tPA была увеличена и, что важно, наблюдалось возрастание tPA-зависимой протеолитической активности. Kozai T et al. [4] и Yamanaka H et al. [7] сообщали об экспрессии tPA в астроцитах дорзальных рогов спинного мозга и увеличение в них протеолитической активности после повреждения периферического нерва.

Хроническая нейрогенная боль в нашем экспе-

рименте вызывала существенную перестройку метаболизма фибринолитической системы кожи самок здоровых мышей. После достижения хронизации болевого синдрома (2 недели) наблюдалось истощение обеих форм uPA, повышение содержания uPAR, накопление pro-tPA и pro-PAI-1, сопровождающиеся мощным выбросом плазмина и, как следствие, его специфического ингибитора α -2-антиплазмина с образованием прочного комплекса PAR.

Литературные сведения [2-5,7,9,10,15] и наши результаты свидетельствуют о важной роли плазмина, uPA, uPAR, tPA и PAI-1 в формировании нейропатической боли. Истощение pro-uPA и uPA в коже мышей на болевом фоне, можно объяснить их быстрой активацией с последующим гиперметилированием ее ДНК [15,16]. Wu F et al. [15] сообщали, что после повреждения нерва экспрессия uPA велика, но непродолжительна, а взаимодействие uPA с uPAR способствует не только ремоделированию тканей, но и воспалению, хемотаксису, пролиферации клеток, адгезии и миграции. Авторы доказали, что нейроны высвобождают uPA в самой ранней фазе восстановления после травмы, причем этот uPA не влияет на выживаемость нейронов, а вместе со своим рецептором способствует развитию структурных изменений в окружающей ткани.

Увеличение содержания pro-uPA и активация в uPA на болевом фоне в нашем эксперименте, скорее всего, происходили в ранние сроки после перевязки седалищного нерва, в связи с чем, через 2 недели после моделирования болевого синдрома (перед перевивкой меланомы B16/F10) мы наблюдали их истощение в коже мышей. Тем не менее, даже на фоне истощения pro-uPA и uPA, через 1 неделю после перевивки меланомы B16/F10 наблюдался достоверный прирост pro-uPA и uPA и в коже, и в опухоли (зафиксирован выход опухолей и метастазов), и сохранение его через 2 и 3 недели. Через 1 неделю после стандартной перевивки меланомы B16/F10 наблюдалось значительное накопление pro-uPA в коже мышей, относительно данных интактных животных, и отсутствие его активации в uPA, но наличие опухолей еще не регистрировалось.

Paola Merino et al. [17] проверяя гипотезу о том, что связывание uPA с uPAR способствует регенерации аксонов, установили, что экспрессия uPAR возрастает сразу после травмы аксона, а активация механизмов опосредуемой им сигнализации способствует ремоделированию ткани. В проведенном эксперименте мы также фиксировали повышенное содержание uPAR в коже после хронизации нейрогенной боли, сравнительно с кожей интактных мышей.

Таблица 2. Активность и содержание компонентов фибринолитической системы в опухоли у самок мышей с меланомой B16/F10 на фоне нейрогенной хронической боли (M±m)

Показатели	Интактные животные, кожа		1 неделя, опухоль		2 недели, опухоль		3 недели, опухоль	
	Без боли, норма	С болью*	Группа сравнения	Основная группа*	Группа сравнения	Основная группа*	Группа сравнения	Основная группа*
РАР (нг/г тк)	10,71±0,7	27,13±2,2¹	Появление опухоли еще не регистрировалось	60,77±5,02^{1,2}	36,51±1,2 ¹	75,84±6,1^{1,2}	36,43±1,8 ¹	50,93±4,01^{1,2}
uPAR (пг/г тк)	56,06±4,5	84,10±7,2¹		63,08±5,17^{1,2}	59,50±5,04	53,24±4,3²	141,8±11,7 ^{1,2}	86,09±7,2^{1,2}
uPA (ед/г тк)	1,611±0,1	0,013±0,001¹		0,033±0,002^{1,2}	2,913±0,16 ¹	0,028±0,002¹	2,822±0,16 ¹	0,027±0,002¹
Pro-uPA (нг/г тк)	31,72±2,1	1,147±0,09¹		39,35±3,17^{1,2}	354,9±20,6 ¹	54,18±4,2^{1,2}	335,5±23,2 ¹	52,49±4,1¹
tPA (ед/г тк)	0,603±0,04	0,337±0,02¹		1,083±0,09^{1,2}	2,718±0,16 ¹	0,750±0,06^{1,2}	2,234±0,13 ¹	0,867±0,06¹
Pro-tPA (нг/г тк)	0,404±0,02	1,457±0,1¹		9,90±0,08^{1,2}	14,42±1,05 ¹	10,72±0,85¹	12,33±0,9 ¹	4,789±0,13^{1,2}
PAI-1 (ед/г тк)	24,01±0,16	8,803±0,7¹		22,67±1,8²	129,1±7,7 ¹	24,23±1,9¹	71,12±4,2 ^{1,2}	10,05±0,8²
Pro-PAI-1 (нг/г тк)	9,911±0,4	12,67±0,9¹		27,78±2,2^{1,2}	161,1±9,6 ¹	23,97±1,9¹	79,53±6,3 ^{1,2}	18,01±1,5^{1,2}

Примечание: ¹ – различия достоверны, относительно данных соответствующих интактных животных (p<0,05); ² – различия достоверны, относительно предыдущего срока исследования (p<0,05). * Жирным шрифтом выделены данные групп мышей с нейрогенной хронической болью.

Roberta Mazzieri et al. [18] показали, что дефицит uPAR у мышей значительно снижает восприимчивость к классическому воспроизведению канцерогенеза в коже, т.к. uPAR способствует пролиферации клеток и образованию опухолей. У мышей группы сравнения содержание uPAR в 1 неделю не отличалось от нормы, а на 2 неделе было достоверно ниже. Небольшое повышение uPAR регистрировалось только через 3 недели после перевивки меланомы. У контрольных мышей с нейрогенной болью уровень uPAR в коже был достоверно повышен и в 1 неделю после перевивки меланомы у мышей основной группы оставался таким же, постепенно снижаясь до нормы к концу 3 недели развития опухоли. Есть данные, свидетельствующие о том, что сигнальные пути, активируемые uPAR, способствуют уходу раковых клеток от опухоли в неповрежденную ткань [19], что повышает возможности метастазирования. Мембранный uPAR, регулируя превращение плазминогена в плазмин, активирует клеточные сигнальные пути, опосредующие миграцию, адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток, причем в нейронах и их отростках uPAR диффундирует постоянно [15]. Усиление миграции и инвазии опухолевых клеток осуществляется путем реализации сигнальных пу-

тей uPAR, независимо от ингибирования uPA [19] и PAI-1 [20]. У мышей дефицит uPA может означать его антиапоптозную роль [21], что препятствует гибели клеток, в том числе опухолевых.

Основываясь на литературных данных и наших результатах, правомерно предположение о том, что при хронической нейрогенной боли и uPA, и pro-uPA, оба активно связывающиеся с uPAR на клеточной мембране, теряют свойства растворимых ферментов и не попадают в зону определения их содержания (цитозольную фракцию), сохраняя при этом биологические свойства. Мы также допускаем, что может иметь место направленный расход pro-uPA и uPA в модели хронической боли на восстановительные процессы после повреждения седалищного нерва. Уровень растворимого uPAR в жидкостях здорового организма стабилен, но при раке повышается, т.к. uPAR конкурирует с uPA за участие во многих непротеолитических биологических процессах, таких как миграция, адгезия, ангиогенез и пролиферация клеток [21]. Нельзя исключить, что при моделировании меланомы на фоне хронической нейрогенной боли повреждающие функции uPA выполняются посредством растворимого рецептора uPAR, тем более что его содержание в коже мышей возрастает в модели нейроген-

ной боли, а после перевивки сохраняется в коже и опухоли на достоверно более высоком уровне, чем в группе сравнения, где содержание uPAR возросло только через 3 недели. В эксперименте Miguel Angel Pavón et al. [20] показано, что ингибирование uPAR замедляет рост опухоли и снижает экспрессию генов, ассоциированных с метастазами, таких как MMP-2, MMP-9, VEGF-C, VEGF-D и VEGFR-3, а сам uPAR накапливается и усиливает преобразование плазминогена в плазмин.

В проведенном эксперименте содержание плазмина в меланоме, растущей на фоне хронической боли, во все сроки исследования достоверно выше, чем при традиционной перевивке, а в коже оно выше только на 1 неделе, которая, тем не менее, оказалась решающей для формирования опухоли и ее метастазов.

Увеличение tPA играет важную роль в развитии нейропатической боли после повреждения периферического нерва [3]. Этот вывод позже подтвержден тем же коллективом [7], причем подчеркивалось, что tPA участвует в процессах изменения пластичности нейронов и метаболических нарушениях в дорсальных рогах спинного мозга в нескольких моделях боли.

В модели нейрогенной хронической боли и далее, после перевивки меланомы, pro-tPA накапливался в коже и опухоли, но его активация в tPA замедлялась. При росте меланомы на фоне нейрогенной хронической боли количество tPA в коже сохранялось на прежнем уровне, соответствуя данным контрольной группы, а pro-tPA постепенно накапливался от 1 к 3 неделе эксперимента. В опухоли активация pro-tPA в tPA осуществлялась, но менее интенсивно, чем в группе сравнения. У мышей группы сравнения в 1-2 недели исследования количество pro-tPA в коже было достоверно выше, и его активация в tPA происходила вдвое активнее. Через 3 недели количество pro-tPA в коже обеих групп мышей было практически одинаковым, а содержание tPA в коже и опухоли стабилизировалось у всех животных.

Yamanaka H. et al., [3,7], изучая динамику uPA, tPA и PAI-1 в развитии нейрогенной боли, выявили, что совместная экспрессия PAI-1 и PAI-2 с tPA и uPA в нейронах достигает пика в 1-3 день после травмы периферического нерва, а затем снижается. Авторы считают, что оба PAI могут действовать аутокринно, модулируя внеклеточную протеолитическую активность после повреждения нерва. Miguel Angel Pavón et al. [20] сообщают, что PAI-1 может действовать как «переключатель» между пролиферацией и миграцией опухолевых клеток. Авторы указывают, что PAI-1 ингибирует апоптоз, одновременно уменьшая пролиферацию опухолевых

клеток, что является необходимым условием их миграции и приобретения свойств стволовых клеток рака. Подтверждена непосредственная связь PAI-1 с эпителиально-мезенхимальным переходом и ключевая роль PAI-1 в индукции инвазивного и мигрирующего фенотипа злокачественных клеток.

Хроническая нейрогенная боль достоверно увеличивала содержание pro-PAI-1 в коже, относительно нормы, и этот уровень стабильно сохранялся в коже после перевивки меланомы с умеренной активацией в PAI-1 и увеличивался в опухоли с усилением активации. Традиционная перевивка меланомы показывала достоверно более высокое содержание pro-PAI-1 в коже и опухоли, но его активация сохранялась на повышенном уровне только на 2 неделе после перевивки, а на 3 неделе снижалась до нормы. Это позволяет предполагать различную роль PAI-1 в развитии опухоли при стандартной перевивке и на фоне хронической нейрогенной боли.

Заключение

В представленном эксперименте меланомы, воспроизведенная на фоне хронической нейрогенной боли, регистрировалась у мышей основной группы раньше, чем у группы сравнения. Мы наблюдали и ранние сроки появления, и более широкую «географию» локализации метастазов. Более высокое содержание в меланоме у мышей с нейрогенной болью плазмина и uPAR (относительно группы сравнения) подтверждает их ведущую роль в развитии этой опухоли. Урокиназа, вероятно, уже была истощена болью (как и в эксперименте Wu F. et al. [15]) в 2-недельный срок исследования, перед перевивкой, и, несмотря на достоверный прирост, сохранила этот уровень в течение 3 недель после перевивки. Однако, относительно соответствующей контрольной группы с болью, прирост uPA в опухоли и коже в 1-3 недели после перевивки был выше, чем у мышей с традиционной меланомой, данные которых сравнивали с нормой. Учитывая динамику uPAR и PAI-1 в коже животных, велика вероятность того, что хроническая боль, еще до перевивки злокачественной меланомы, активирует в коже мышей факторы, традиционно создающие условия для роста и развития этой злокачественной опухоли. Pro-tPA болью не подавлялся, но замедлялась его активация в tPA во все сроки исследования, из чего можно заключить, что tPA-зависимый протеолиз, зафиксированный многими исследователями при нейрогенной боли, инициируется в большой степени его проферментом, к тому же, функции плазмина различаются, в зависимости от того, где он образуется, и какой активатор этому способствует [22].

Таким образом, мы показали, что плазмин, tPA,

uPA, uPAR и PAI-1, наряду с матричными металлопротеиназами [23], а также факторами роста [12,24], играют ведущую роль в быстром росте и повышении злокачественности меланомы, развивающейся на фоне хронической нейрогенной боли. Роль PAI-1 в этом случае может заключаться в индукции мигрирующего фенотипа злокачественных клеток.

Наши экспериментальные данные не демонстрируют окончательной причинно-следственной связи между наличием хронической нейрогенной боли и быстрым развитием меланомы с немедленным метастазированием. Мы предлагаем модель, которая позволит при дальнейшем изучении найти ответы на многие вопросы, касающиеся канцерогенеза и генерализации злокачественного процесса.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

1. Kumar A, Kaur H, Singh A. Neuropathic Pain models caused by damage to central or peripheral nervous system. *Pharmacol Rep.* 2018; 70(2): 206-216.
2. Yamanaka H, Obata K, Fukuoka T., et al. Tissue plasminogen activator in primary afferents induces dorsal horn excitability and pain response after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci.* 2004; 19: 93-102.
3. Yamanaka H, Obata K, Fukuoka T., et al. Induction of plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in dorsal root ganglion neurons after peripheral nerve injury. *Neuroscience.* 2005; 132:183-191.
4. Kozai T, Yamanaka H, Dai Y., et al. Tissue type plasminogen activator induced in rat dorsal horn astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity following dorsal root injury. *Glia.* 2007; 55: 595-603.
5. Berta T, Liu YC, Xu ZZ, Ji RR. Tissue plasminogen activator contributes to morphine tolerance and induces mechanical allodynia via astrocytic IL-1 β and ERK signaling in the spinal cord of mice. *Neuroscience.* 2013;247:376-385.
6. Chlebowski RT, Col N. Bisphosphonates and breast cancer prevention. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2012; 12(2): 144-150.
7. Yamanaka H, Kobayashi K, Okubo M., et al. Annexin A2 in primary afferents contributes to neuropathic pain associated with tissue type plasminogen activator. *Neuroscience.* 2016; 314: 189-199.
8. Nishioka N, Matsuoka T, Yashiro M., et al. Plasminogen activator inhibitor 1 RNAi suppresses gastric cancer metastasis in vivo. *Cancer Sci.* 2012; 103(2): 228-232.
9. Valiente M, Obenaus AC, Jin X., et al. Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell.* 2014; 156(5): 1002-1016.
10. Sato M, Kawana K, Adachi K., et al. Decreased expression of the plasminogen activator inhibitor type 1 is involved in degradation of extracellular matrix surrounding cervical cancer stem cells. *Int J Oncol.* 2016; 48(2): 829-835.
11. Kit OI, Frantsiyants EM, Kotieva IM., et al. Some mechanisms of increasing malignancy of B16/F10 melanoma in female mice with chronic pain. *Russian Journal of Pain.* 2017; 53 (2): 14-20. In Russian [Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М. и др. Некоторые механизмы повышения злокачественности меланомы. *Российский журнал боли.* 2017; 53 (2): 14-20].
12. Kit OI, Frantsiyants EM, Kotieva IM et al. The effect of chronic pain on the dynamics of some growth factors in the intact and pathologically altered skin of female mice with B₁₆/F₁₀ melanoma. *Russian Journal of Pain.* 2017; (3-4): 37-44. In Russian [Кит О.И., Франциянц Е.М., Котиева И.М. и др. Влияние хронической боли на динамику некоторых ростовых факторов в интактной и патологически измененной коже самок мышей с меланомой B₁₆/F₁₀. *Российский журнал боли.* 2017; (3-4): 37-44].
13. Dingemane KP. B-16 melanoma metastasis in mouse liver and lung. *Inv. Metast.* 1985; (5): 50-60.
14. Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain.* 2013;154 Suppl 1:S10-28.
15. Wu F, Catano M, Echeverry R, et al. Urokinase-type plasminogen activator promotes dendritic spine recovery and improves neurological outcome following ischemic stroke. *J Neurosci.* 2014;34(43):14219-14232.
16. Mahmood N, Mihalcioiu C, Rabbani SA. Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front Oncol.* 2018;8:24.
17. Merino P, Diaz A, Jeanneret V, et al. Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) Binding to the uPA Receptor (uPAR) Promotes Axonal Regeneration in the Central Nervous System. *J Biol Chem.* 2017;292(7):2741-2753.
18. Mazziere R, Pietrogrande G, Gerasi L, et al. Urokinase Receptor Promotes Skin Tumor Formation by Preventing Epithelial Cell Activation of Notch1. *Cancer Res.* 2015; 75(22):4895-4909.
19. Gonias SL, Hu J. Urokinase receptor and resistance to targeted anticancer agents. *Front Pharmacol.* 2015; (6): 154.
20. Pavón MA, Arroyo-Solera I, Céspedes MV, et al. uPA/uPAR and SERPINE1 in head and neck cancer: role in tumor resistance, metastasis, prognosis and therapy. *Oncotarget.* 2016;7(35):57351-57366.
21. Chen JS, Chang LC, Wu CZ, et al. Significance of the urokinase-type plasminogen activator and its receptor in the progression of focal segmental glomerulosclerosis in clinical and mouse models. *J Biomed Sci.* 2016; 23: 24.
22. Schuliga M. The inflammatory actions of coagulant and fibrinolytic proteases in disease. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 437695.
23. Santibanez JF, Obradović H, Kukolj T, Krstić J. Transforming growth factor- β , matrix metalloproteinases, and urokinase-type plasminogen activator interaction in the cancer epithelial to mesenchymal transition. *Dev Dyn.* 2018; 247(3): 382-395.
25. Santibanez JF. Transforming growth factor-Beta and urokinase-type plasminogen activator: dangerous partners in tumorigenesis-implications in skin cancer. *ISRN Dermatol.* 2013; 2013: 597927.

Информация об авторах:

Кит Олег Иванович, член-корр. РАН, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, генеральный директор, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Франциянц Елена Михайловна, д.б.н., профессор, зам. генерального директора РНИОИ по науке, рук. «Лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей», ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Котиева Инга Мавликиевна, к.м.н., старший научный сотрудник, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Каплиева Ирина Викторовна, к.м.н., старший научный сотрудник, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Трепитаки Лидия Константиновна, научный сотрудник, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Бандовкина Валерия Ахтямовна, к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Козлова Лариса Степановна, к.б.н., доцент, старший научный сотрудник, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Погорелова Юлия Александровна, к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Роженко Людмила Яковлевна, д.м.н., проф., главный научный сотрудник, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Черярина Наталья Дмитриевна, врач-лаборант, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России;

Author information:

Oleg I. Kit, corresponding member of RAS, Dr.Sci., professor, honored doctor of the Russian Federation, general director, Rostov Research Institute of Oncology;

Elena M. Frantsiyants, Dr.Sci., professor, deputy general director for science, head of laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis Study, Rostov Research Institute of Oncology;

Inga M. Kotieva, PhD, senior researcher, Rostov Research Institute of Oncology;

Irina V. Kaplieva, PhD, senior researcher, Rostov Research Institute of Oncology;

Lidia K. Trepitaki, researcher, Rostov Research Institute of Oncology;

Valeria A. Bandovkina, PhD, senior researcher, Rostov Research Institute of Oncology;

Larisa S. Kozlova, PhD, Associate Professor, senior researcher, Rostov Research Institute of Oncology;

Yulia A. Pogorelova, PhD, senior researcher, Rostov Research Institute of Oncology;

Lyudmila Ya. Rozenko, Dr.Sci., professor, chief researcher, Rostov Research Institute of Oncology;

Natalia D. Cheryarina, laboratory doctor, Rostov Research Institute of Oncology.

ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ В ПРОТОКОЛАХ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ ХРОМАТИНА (МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК И МОДИФИКАЦИЙ ГИСТОНОВ) В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Игнатъева Е.В., Смирнов Д.Д., Костарева А.А., Дмитриева Р.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Игнатъева Елена Владимировна
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: lefut@mail.ru

Статья поступила в редакцию 07.06.2018
и принята к печати 13.06.2018

Резюме

Эпигенетические механизмы контролируют наследственные и ненаследственные изменения в экспрессии генов, не затрагивая структурные изменения в их нуклеотидной последовательности. К числу известных эпигенетических механизмов относятся ковалентные модификации хроматина, такие как метилирование ДНК; метилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, ацетилирование и гликозилирование гистонов. Эти процессы связаны с адаптацией структурной и функциональной организации хроматина к локальным физиологическим и метаболическим нуждам клетки в ответ на постоянно изменяющиеся условия внешней среды. Нарушение механизмов эпигенетической регуляции напрямую или косвенно связано с множеством заболеваний, а факт потенциальной обратимости эпигенетических модификаций делает перспективным поиск методов коррекции патологий, связанных с эпигенетическим перепрограммированием.

Экспериментальные подходы к изучению эпигенетических механизмов могут показаться сложными начинающему исследователю, так как являются трудоемкими, требуют опыта выполнения сложных экспериментальных задач. В нашей работе мы описали и проанализировали протоколы подготовки образцов для изучения метилирования ДНК и модификаций гистонов. Представленные протоколы являются результатом интеграции и адаптации методических подходов, описанных в различных изданиях. Все экспериментальные процедуры мы тестировали на клеточных моделях жировой дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток. Протоколы будут полезны как исследователям, изучающим механизмы эпигенетической регуляции конкретных генов, так и для проведения исследований, включающих полногеномное картирование определённых эпигенетических модификаций, а также могут быть адаптированы для иммунопреципитации любых регуляторных комплексов ДНК-белок.

Ключевые слова: эпигенетические модификации, иммунопреципитация метилированной ДНК, иммунопреципитация хроматина.

Для цитирования: Игнатъева Е.В., Смирнов Д.Д., Костарева А.А., Дмитриева Р.И. Особенности пробоподготовки в протоколах исследования роли эпигенетических модификаций хроматина (метилирования ДНК и модификаций гистонов) в регуляции экспрессии генов. *Трансляционная медицина*. 2018; 5 (2): .

////////////////////////////////////
**SAMPLE PREPARATION FOR DOWNSTREAM ANALYSIS
OF EPIGENETIC MODIFICATIONS (DNA METHYLATION
AND HISTONE MODIFICATIONS) IN THE REGULATION
OF GENE EXPRESSION**

Ignatieva E.V., Smirnov D.D., Kostareva A.A., Dmitrieva R.I.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Elena V. Ignatieva
Almazov National Medical Research Centre
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341
E-mail: lefut@mail.ru

*Received 07 June 2018; accepted 13 June
2018.*

////////////////////////////////////
Abstract

Epigenetic changes are defined as inherited/non-inherited modifications that control alterations in gene expression without any structural changes in their nucleotide sequence. Epigenetic mechanisms include DNA methylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination, acetylation and glycosylation of histones. These processes are associated with the adaptation of the structural and functional organization of chromatin to the local physiological and metabolic changes in response to environmental conditions. It is known by now that the number of diseases is associated with disruptions in the mechanisms of epigenetic regulation; however, epigenetic changes are dynamic and their potential reversibility makes them the promising targets for pharmaceutical interventions to correct alterations associated with epigenetic reprogramming.

Experimental approaches to the investigation of epigenetic mechanisms may seem complicated, since they all are time-consuming and require experience in performing complex experimental tasks. In our work, we present the protocols for the preparation of samples for the study of DNA methylation and histone modifications that are the result of integration and adaptation of the methodological approaches described in various scientific publications. All experimental procedures we tested on the cellular models of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. These protocols will be useful for those who plan to study the mechanisms of epigenetic regulation of specific genes, or for full-genome mapping of certain epigenetic modifications; these protocols can also be adapted for immunoprecipitation of any regulatory DNA-protein complexes.

Key words: epigenetic modifications, methylated DNA immunoprecipitation, chromatin immunoprecipitation

*For citation: Ignatieva E.V., Smirnov D.D., Kostareva A.A., Dmitrieva R.I. Sample preparation for downstream analysis of epigenetic modifications (DNA methylation and histone modifications) in the regulation of gene expression. *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*. 2018; 5 (2):pages. (In Russ.)*

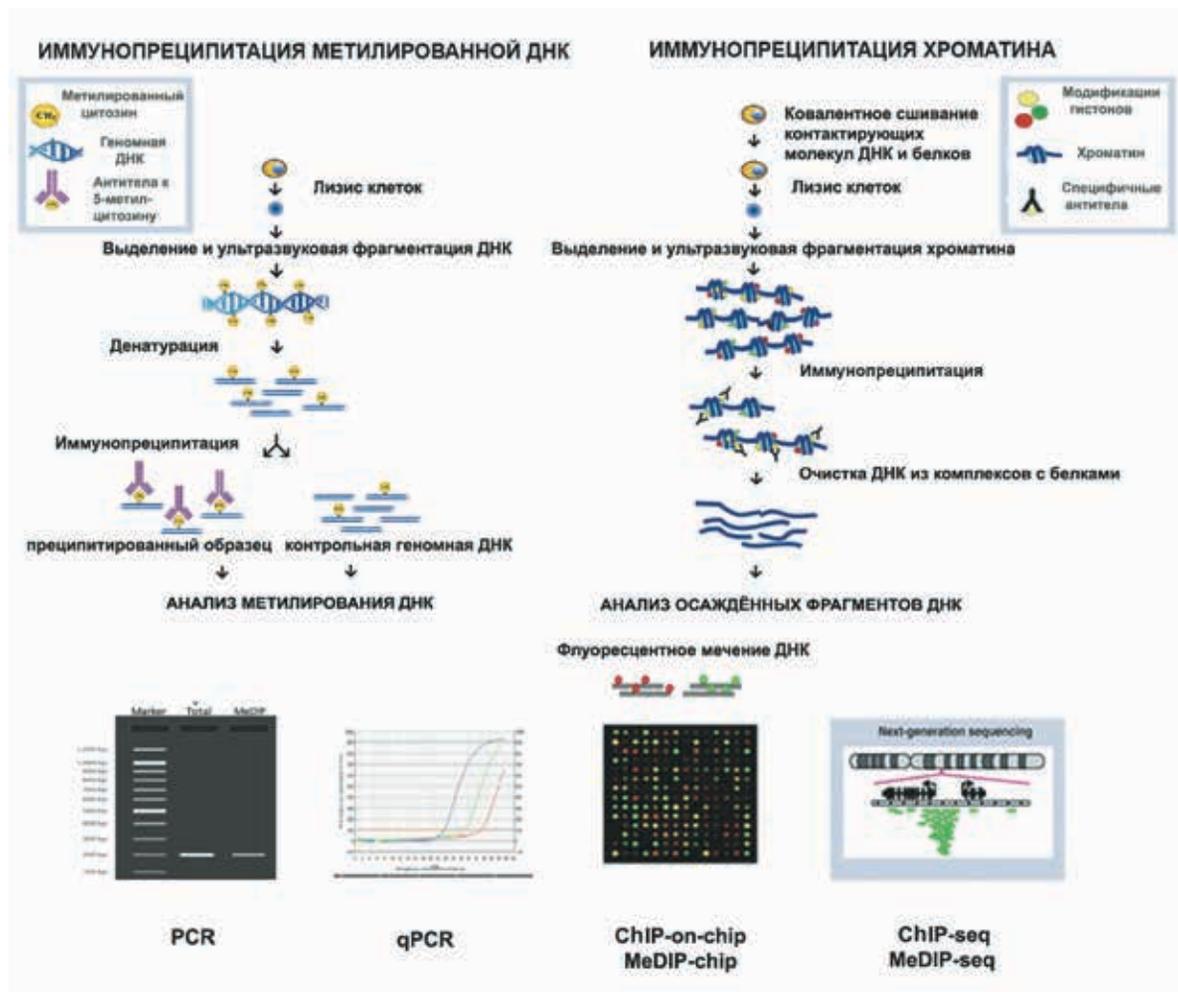
Список сокращений:

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Эпигенетические механизмы контролируют изменение активности генов, не затрагивая последовательность ДНК, но оказывая влияние на взаимодействие между ДНК-последовательностью и переменными регуляторными структурами генома. Эпигенетические механизмы включают в себя

такие ковалентные модификации хроматина как метилирование ДНК, метилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, ацетилирование и гликозилирование гистонов; добавление и удаление этих модификаций катализируется ферментами, активность которых опосредована специфическими субстратами, кофакторами и аллостерическими регуляторами, наличие которых определяется конкретными физиологическими условиями и/или

Рисунок 1. Принципы экспериментальных подходов к изучению эпигенетических модификаций



Методы иммунопреципитации метилированной ДНК (MeDIP – methylated DNA immunoprecipitation) и иммунопреципитации хроматина (ChIP – chromatin immunoprecipitation) используют преципитацию эпигенетически модифицированных фрагментов ДНК/хроматина специфическими антителами. Применяя антитела к 5-метилцитозину, получают фракции ДНК, обогащённые метилированными последовательностями. С использованием антител, специфичных к различным модификациям гистонов, выделяют фрагменты ДНК, связанные с модифицированными гистонами. Полученные путём иммунопреципитации последовательности ДНК затем возможно анализировать, применяя гибридизацию на микрочипах (ChIP-on-chip/MeDIP-chip), прямую ПЦР-амплификацию локусов интереса (PCR, qPCR) или секвенированием (ChIP-seq /MeDIP-seq).

метаболическим статусом клетки [1-3]. Эпигенетическое перепрограммирование, вызванное взаимодействием клетки с внешними условиями, может приводить к развитию наследуемых функциональных изменений в органах и тканях, а также к формированию клонов клеток с новыми, в том числе патологическими свойствами, без изменений в последовательности ДНК.

Эпигенетические модификации могут передаваться потомству и поддерживаться в последующих поколениях даже тогда, когда устранены внешние стимулы, вызывающие конкретный эпигенетический механизм перепрограммирования. В то же время, потенциальная обратимость эпиге-

нетических модификаций создает хорошие предпосылки для поиска эффективных подходов к терапии заболеваний, связанных с эпигенетическим перепрограммированием. Именно поэтому выявление возможной роли эпигенетических механизмов в возникновении, развитии, наследовании и лечении широкого спектра заболеваний становится популярным, а часто и необходимым этапом современных медико-биологических исследований.

Экспериментальные подходы к изучению эпигенетических модификаций можно разделить на две группы: (а) исследования направленные на определение того, как конкретные эпигенетические процессы регулируют активность генов интереса и

(б) исследования, дизайн которых включает в себя полногеномное картирование эпигенетических модификаций в тех или иных экспериментальных или физиологических условиях.

Общим этапом для многих экспериментальных подходов, направленных как на исследование эпигенетических модификаций, которые участвуют в регуляции конкретного гена интереса, так и на полногеномное картирование конкретной эпигенетической модификации, является обогащение исследуемого образца модифицированными фрагментами хроматина/ДНК. Для достижения этой цели обычно используют метод иммуноосаждения метилированных фрагментов ДНК с применением антител к метилированному цитозину анти-5mC или иммуноосаждение модифицированных участков хроматина с применением антител, специфичных к различным модификациям гистонов. Общая схема эксперимен-

тальных подходов к изучению эпигенетических модификаций представлена на рисунке 1.

В данной работе мы представляем детальный анализ основных этапов подготовки образцов для исследования эпигенетических модификаций с использованием иммуноосаждения как метода обогащения исследуемого образца ДНК или хроматина эпигенетически модифицированной фракцией. Протоколы тестировались с использованием клеточных моделей жировой и мышечной дифференцировки взрослых стволовых клеток, хорошо охарактеризованных в наших предшествующих проектах [4,5].

Экспериментальные процедуры

Сравнительный анализ протоколов иммунопреципитации метилированных фрагментов ДНК и иммунопреципитации хроматина.

Получение образцов метилированных фрагментов ДНК (MeDIP) для дальнейшего анализа	Получение образцов фрагментов ДНК, ассоциированных с модифицированными гистонами (ChIP) для дальнейшего анализа
<p>1. Выделение ДНК из клеточной культуры</p> <p>Клетки отмывают от культуральной среды теплым фосфатным буфером и обрабатывают трипсином. Полученную суспензию клеток промывают фосфатным буфером с 2% бычьей фетальной сыворотки для нейтрализации трипсина, центрифугируют при 300×g 7 минут, супернатант удаляют и отмывают клетки от следов сыворотки теплым фосфатным буфером два раза. Считают клетки.</p> <p>Способ выделения геномной ДНК на анализ метилирования не влияет. Однако чрезвычайно важна тщательная очистка ДНК от ассоциированных с ней белков, таких как гистоны, и РНК.</p> <p>В нашей работе ДНК из культур клеток выделяли с помощью коммерческого набора FlexiGene (Quiagen, UK), с ферментативной обработкой образцов протеиназой K при 65°C-68°C в течение двух часов или ночи¹.</p> <p>Оценку количества и качества выделенной ДНК производили с помощью ДНК-электрофореза в агарозном геле, спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (TermoFisher Scientific; Wilmington, DE). Для дальнейшего использования в работу брали только те образцы ДНК, спектральные характеристики которой были: A260/280 = 1,8-2,0 (свидетельство отсутствия в образце контаминирующих белков); A260/A230 > 1.8 (отсутствие следов ЭДТА, углеводов, фенола).</p>	<p>1. Получение клеточного препарата, фиксирование хроматина, (ДНК-протеин связывание)</p> <p>Добавляют 500 мкл фосфатного буфера, если клеток меньше, чем 2×10⁶ и 1 мл, если клеток от 2×10⁶ до 10×10⁶. Переносят полученную суспензию клеток в 1,5 мл пробирку². К 500 мкл полученной суспензии добавляют 14 мкл формальдегида (36,5% сток, SIGMA) или PFA из расчета получения конечной концентрации PFA 1%. Инкубируют 10 минут при комнатной температуре, после чего инактивируют PFA глицином (28 мкл 2,5 М раствора глицина). Инкубируют 5 минут при комнатной температуре. Затем центрифугируют клетки при 470×g в течение 10 минут при 4°C, супернатант удаляют, ресуспендируют клетки в 500 мкл холодного фосфатного буфера², центрифугируют при 470×g в течение 10 минут при 4°C. Повторяют процедуру отмывания два раза. После этого клетки можно быстро заморозить и хранить при -70°C в течение месяца.</p>

2. Ультразвуковая фрагментация ДНК

Для иммунопреципитации требуется 5 мкг геномной ДНК, растворенной в 250 мкл фосфатно-солевого буфера, поэтому к нужному объёму ДНК в воде добавляется 25 мкл 10×PBS, и объём пробы доводится до 250 мкл. Затем ДНК подвергается обработке ультразвуком для разбиения на низкомолекулярные фрагменты случайной длины.

Фрагментацию ДНК и хроматина производят ультразвуком с использованием оборудования Bioruptor (Diagenode) при режиме 30 сек ON/OFF на высокой энергии 3-4 раза по 10 минут.

Необходимо помнить, что эффективность фрагментации зависит от типа клеток, условий фиксации хроматина, объема образца. В связи с этим может возникнуть необходимость в оптимизации протокола фрагментации для достижения размера фрагментов 200-500 bp.

Эффективность фрагментации анализируют в 1.5% агарозном геле с соответствующим маркером.³

2. Лизирование клеток, фрагментация хроматина

К полученному осадку добавляют 180 мкл лизирующего буфера (табл.5) на 2×10^6 клеток. В случае большего образца объем буфера увеличивают, но не более чем до 250 мкл. Встряхивают и оставляют для завершения лизирования на льду в течение 5 минут. Аккуратно пипетируют при необходимости.

Фрагментированный образец центрифугируют при $10000 \times g$ в течение 10 минут при $4^\circ C$. Переносят супернатант в новую пробирку. Избегают верхнего слоя (жировые капли в случае препаратов жировой ткани) и осадка. На этом этапе хроматин можно заморозить.

Из полученного препарата отбирают 10 мкл хроматина для анализа качества фрагментации. Подготовка образца хроматина к анализу производится следующим образом: к 10 мкл хроматина добавляют 1 мкл RNAase (используют сток 500 ng/ml , конечная концентрация 50 ng/ml). Инкубируют 20 минут при $37^\circ C$. Затем добавляют 190 мкл буфера для элюции (табл.6), если объем образца был больше, чем 10 мкл, следует добавить буфер до получения общего объема 200 мкл. Добавляют 5 мкл протеиназы K (из стока 2 mg/ml) и инкубируют при $68^\circ C$ 500 rpm на термомиксере два часа или в течение ночи. Из полученного образца выделяют ДНК, как описано в пункте 7⁴. Растворяют в 10 мкл MQ H₂O и анализируют в 1.5% агарозном геле с соответствующим маркером.

3. Иммунизация специфических анти-5MeC антител на магнитных частицах

50 мкл магнитных бусинок Dynabeads® Pan Mouse IgG (Life Technologies, США) переносят в отдельную пробирку, и пробирку помещают на магнитный штатив во льду или в холодной комнате при 4°C. Супернатант убирают. Снимают пробирку со штатива; аккуратно встряхивая, ресуспендируют бусинки в 750 мкл Block Solution 1 (табл.1) и в течение 5 минут при 4°C вращают пробирку на ротаторе. Затем на магнитном штативе при 4°C или на льду удаляют супернатант, повторяют процедуру промывки Block Solution 1, затем убирают надосадочную жидкость на магнитном штативе и центрифугируют магнитные частицы при 4°C и 1500×g в течение 3 минут. Осаждённые бусинки аккуратно ресуспендируют в 230 мкл Block Solution 2 (табл.2) и добавляют к суспензии 5 мкг моноклональных антител к 5-метилцитозину (Eurogentec, VI-MESY-0100). Полученную суспензию инкубируют на протяжении 6 часов или в течение ночи на ротационном перемешивателе при 4°C. На следующий день пробирки с подготовленными бусинками откручивают быстро на миницентрифуге, чтобы собрать все бусинки на дне, и помещают их в магнитном штативе на лед. Убирают супернатант и проводят два цикла промывки от несвязавшихся антител, включающие в себя ресуспендирование в 750 мкл Block Solution 2 и удаление надосадочной жидкости на магнитном стенде. Конъюгированные с антителами магнитные частицы ресуспендируют в 50 мкл Block Solution 2.

4. Денатурация ДНК

Фрагментированную ДНК денатурируют в течение 10 минут при 95°C и затем охлаждают в течение 10 минут во льду⁷. Денатурированную ДНК делят на две фракции. Одна фракция (50 мкл ДНК, растворённой в PBS и подвергнутой ультразвуковому дроблению) затем используется как полногеномный референс (INPUT), другая (200 мкл того же раствора) – для иммунопреципитации.

3. Иммунизация на магнитных частицах антител, специфических к модифицированным гистонам.⁵

Для иммуноосаждения используют магнитные бусинки Dynabeads «Protein A» или «Protein G» в зависимости от того, антитела какого вида используются. Перед использованием бусинки следует хорошо встряхнуть на вортексе до получения гомогенной суспензии. Рассчитывают количество бусинок, необходимых для проведения эксперимента (100 мкл на образец), помещают их в пробирку 1,5 мл и отмывают в 2,5 объеме RIPA буфера (табл.7). Помещают пробирку на магнит на 1 минуту и удаляют буфер. Повторяют отмывку еще раз, после чего ресуспендируют бусинки в 10× объеме RIPA буфера. В подготовленные и подписанные пробирки на 0,2 мл добавляют 100 мкл подготовленных бусинок и 2,5 мкг антител. Инкубируют на ротационном перемешивателе при 40 rpm 2 часа или в течение ночи при 4°C.

4. Подготовка хроматина к иммуноосаждению

Количество хроматина в образце определяют на спектрофотометре Nanodrop по поглощению на A260. Рабочая концентрация для иммуноосаждения соответствует поглощению 2 U/ml, соответственно до такой концентрации следует разбавить образец RIPA буфером без SDS⁶. 100 мкл хроматина отбирают в отдельную пробирку для дальнейшего использования в качестве референсного образца (INPUT), остальную часть образца используют для иммунопреципитации.

<p>5. Иммунопреципитация метилированных фрагментов ДНК</p> <p>К 50 мкл подготовленных бусинок добавляют 200 мкл денатурированной ДНК и 250 мкл 2×IP (табл.3) буфера. Преципитацию проводят в течение ночи, на ротаторе, при +4°C. После этого помещают пробирки в магнитный штатив на льду и удаляют супернатант. Далее магнитные частицы промывают от неспецифически связанных фрагментов ДНК буфером IP Wash (табл.4). Для этого снимают пробирки со штатива, бусинки ресуспендируют, аккуратно встряхивая, в 1 мл буфера и вращают на ротаторе в течение 3 минут при +4°C. Снова удаляют супернатант на магнитном штативе и повторяют процедуру ещё дважды.</p>	<p>5. Иммунопреципитация фрагментов хроматина ассоциированных с модифицированными гистонами</p> <p>Пробирки с подготовленными бусинками откручивают быстро на миницентрифуге, чтобы собрать все бусинки на дне и помещают их в магнитном штативе на лед. Удаляют супернатант. Добавляют 100 мкл подготовленного хроматина и инкубируют в течение 2 часов на ротационном перемешивателе при 40 rpm при 4°C. Сбрасывают на миницентрифуге весь материал на дно пробирки, помещают пробирки в магнитном штативе на лед и удаляют супернатант. Добавляют 100 мкл RIPA буфера и инкубируют 4 минуты на rotator при 40 rpm при 4°C. Удаляют супернатант и повторяют отмывку еще два раза. Затем отмывают бусинки в 100 мкл TE буфер (pH 8), крутят rotator при 40 rpm при 4°C, переносят бусинки в новые пробирки и удаляют TE буфер.</p>
<p>6. Отмывка и элюирование метилированной фракции ДНК с магнитных частиц</p> <p>Добавляют в каждую пробирку с бусинками по 150 мкл Elution Buffer (табл.6), содержащего 1% SDS и 50 ng/mkl Proteinase K. Инкубируют образцы с протеиназой 2 часа или в течение ночи при 68°C на 1300 rpm. Сбрасывают материал на миницентрифуге и собирают супернатант в 1,5 мл пробирку. К бусинкам добавляют ещё 150 мкл Elution Buffer (1% SDS и 50 ng/mkl Proteinase K) и вымывают остатки образца в течение 5 минут при 68°C на 1300 rpm. Собирают супернатант в ту же пробирку. В результате получается 300 мкл экстракта. Затем добавляют по 200 мкл Elution Buffer, чтобы получить образцы объемом 500 мкл для очистки ДНК (увеличение объема увеличивает выход ДНК).</p> <p>К 50 мкл контрольного образца ДНК INPUT добавляют 450 мкл Elution Buffer (табл.6), и затем оба образца – INPUT и иммунопреципитированный – процессируются одинаково.</p>	<p>6. Отмывка и элюирование фракции ДНК, ассоциированной с модифицированными гистонами</p> <p>К 100 мкл исходного образца хроматина INPUT добавляют 200 мкл Elution Buffer содержащего 1% SDS и 50 ng/mkl Proteinase K. Инкубируют с протеиназой 2 часа или в течение ночи при 68°C на 1300 rpm. Затем добавляют 200 мкл Elution Buffer, чтобы получить 500 мкл.</p>

7. Экстракция ДНК

1. К 500 мкл образца добавить 500 мкл смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (24:24:1)
2. Перемешать, аккуратно переворачивая пробирку несколько раз, и центрифугировать на 15000×g 5 минут
3. Аккуратно перенести верхнюю фазу в новую пробирку
4. Добавить 450 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1)
5. Перемешать, аккуратно переворачивая пробирку несколько раз, и центрифугировать на 15000×g 5 минут
6. Аккуратно собрать верхнюю фазу и перенести в новую пробирку
7. Добавить 40 мкл (0,1 объема) 3M Na-acetate, 10 мкл акриламида или гликогена для визуализации осадка и 1 мл холодного 96% спирта и оставить при -80°С на 2 часа или в течение ночи для осаждения ДНК⁹
8. Центрифугировать при 20000×g 15 минут при 4°С
9. Удалить супернатант и высушить ДНК в открытой пробирке
10. Растворить в 10 мкл MQ H₂O

8. Контроль эффективности иммуноосаждения метилированных фрагментов ДНК осуществлялся с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) для стабильно метилированного гена контроля области импринтинга H19 ICR, а ген домашнего хозяйства UBE2B использовался в качестве контроля для неметилированных фрагментов [6]. Последовательность праймеров для ПЦР-реакций представлена ниже.

UBE2B-F ACCCGTTCTAAACGCGTCA
 UBE2B-R CACTAGTTTAGGCTCGGCGG
 H19ICR-F GAGCCGCACCAGATCTTCAG
 H19ICR-R TTGGTGGAACACACTGTGATCA

Условия ПЦР-реакции на этапе контроля качества необходимо подбирать для каждой серии образцов индивидуально: количество ДНК-матрицы и число циклов подбирают таким образом, чтобы в INPUT образце на электрофорезе была видна четкая линия продукта амплификации UBE2B, а в образце IP была видна четкая линия продукта амплификации стабильно метилированного гена контроля области импринтинга H19ICR. Эффективность иммуноосаждения определяется по соотношению интенсивности полос H19ICR / UBE2B в INPUT/IP образцах. Типичные результаты контроля качества полученных образцов показаны на рисунке 2 (Б, В).

Итоговое количество выделенной ДНК – 500-700нг.

8. Контроль качества полученного образца

Для подтверждения качества выполнения эксперимента можно использовать профиль эпигенетических модификаций промоторной области гена, про который известно, как он ведет себя в данных экспериментальных условиях. Роль различных модификаций хроматина в регуляции транскрипции подробно описана в обзоре [7]. В наших условиях таким примером может быть ген GAPDH, промотор которого всегда «помечен» маркером H3K4me₃ и не содержит меток H3K9me₃ и H3K27me₃. Контроль качества осуществляют с использованием ПЦР в реальном времени⁸. Во всех экспериментальных условиях промоторная область гена GAPDH была «помечена» маркером H3K4me₃ и содержала минимальное количество меток H3K9me₃ и H3K27me₃ (рис. 3А, В). Результаты ПЦР в реальном времени следует анализировать согласно рекомендациям журнала Clinical Chemistry [8], дизайн праймеров к промоторным областям можно выполнять с использованием базы данных http://epd.vital-it.ch/human/human_database.php

В этой же базе данных есть информация об уже известных эпигенетических модификациях хроматина для разных типов клеток.

Комментарии к экспериментальным процедурам

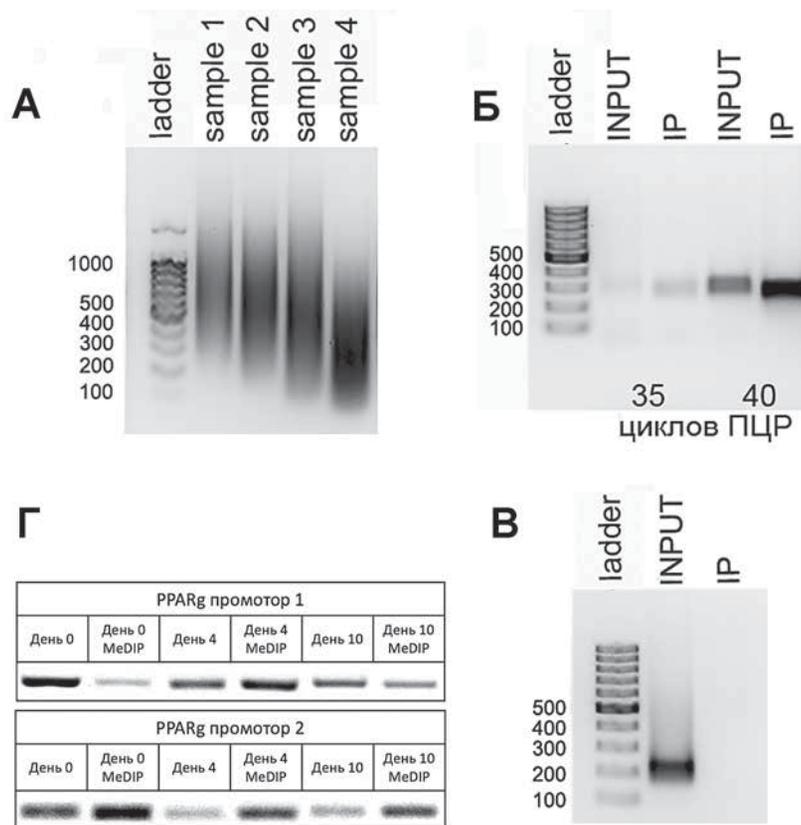
1. Следует обратить особое внимание на этап инкубирования образца с протеиназой К. В данном протоколе он является ключевым, так как очень важно освободить метилированные участки ДНК от белков/гистонов, для того чтобы антитела могли свободно взаимодействовать с эпитопом.

2. Если планируется исследование ацетилирования хроматина, к суспензии добавляют 20 mM бутирата натрия (Na-butyrate), который является ингибитором деацетилаз хроматина.

3. Все процедуры производятся на льду; в присутствии коктейля ингибиторов протеиназ, PMSF и в случае необходимости бутирата натрия. Длина фрагментов ДНК и хроматина имеет важное значение для успешной реализации эксперимента:

они должны быть достаточно короткими, чтобы обеспечить специфичность анализа, но и достаточно длинными для осуществления ПЦР реакции как на этапах контроля качества образца, так и на этапах анализа результатов, если дизайн эксперимента предусматривает такой анализ. Таким оптимальным диапазоном длины фрагментов является 150-500 пар оснований с пиком на 250-300. В случае, если предложенные условия протокола ультразвуковой фрагментации не позволяют добиться нужной длины фрагментов, условия следует откорректировать. Если фрагменты получились слишком длинными, допускается провести дополнительный цикл фрагментации и, убедившись, что полученный образец соответствует заданным критериям, использовать его в эксперименте. Следует также учитывать, что установка ультразвукового

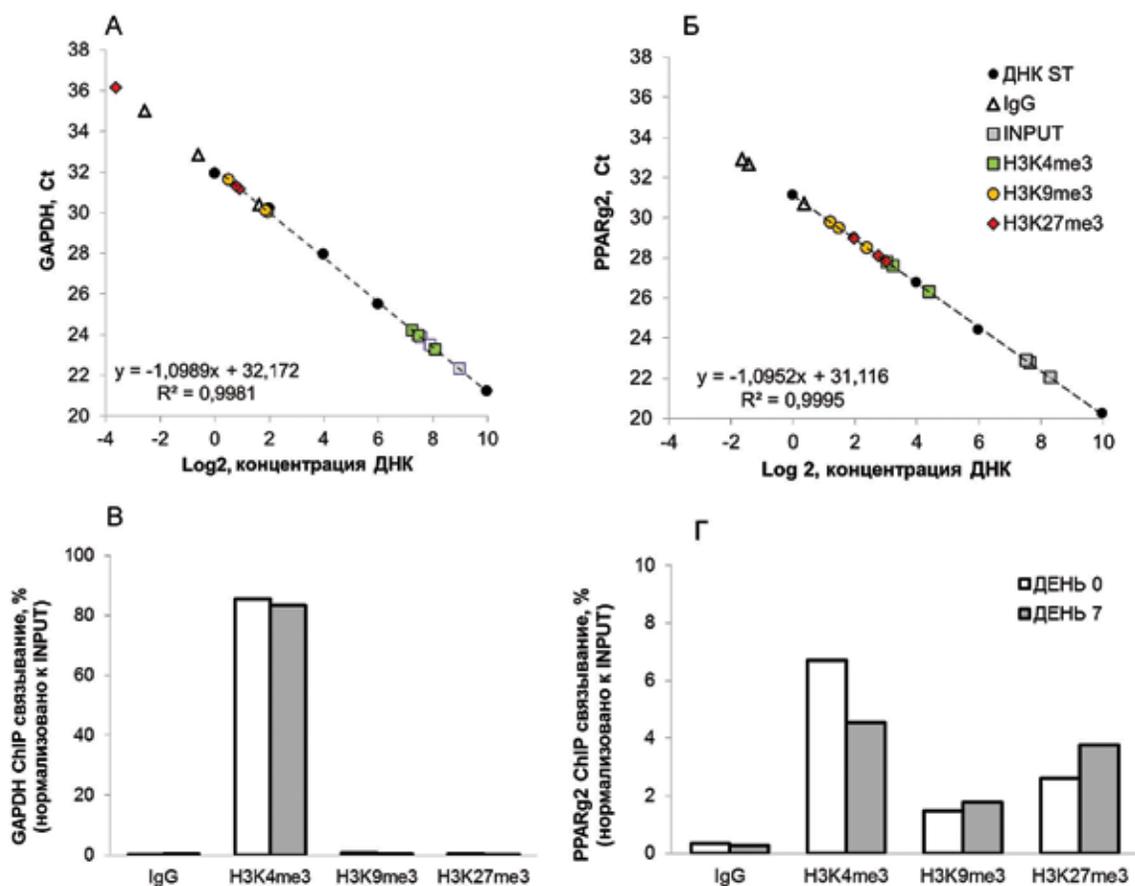
Рисунок 2. Анализ образцов, полученных в результате иммунопреципитации метилированных фрагментов ДНК



(А) Анализ влияния режима ультразвуковой фрагментации геномной ДНК на размер полученных фрагментов. Sample 1: Н/1 цикл; Sample 2: Н/2 цикла; Sample 3: Н/3 цикла; sample 4: Н/4 цикла. (Б-В) Контроль эффективности иммуноосаждения метилированных фрагментов ДНК. Гель-электрофорез для визуализации ПЦР с праймерами к стабильно метилированному гену контроля области импринтинга H19 ICR (Б) и с контрольными праймерами к неметилированной области – промотору гена домашнего хозяйства UBE2B (В). (Г) Пример анализа динамики метилирования промоторных областей гена PPARg (промотор 1 и промотор 2) в ходе жировой дифференцировки стромальных клеток подкожной жировой клетчатки.

INPUT – контрольная (геномная) ДНК; IP – иммуноосаждённая (антителами к 5-метилцитозину) ДНК.

Рисунок 3. Пример анализа эпигенетических модификаций хроматина с использованием ПЦР в реальном времени



(А,Б) Анализ эпигенетических модификаций ассоциированных с промоторной областью гена GAPDH.

(В,Г) Анализ эпигенетических модификаций ассоциированных с промоторной областью гена PPARg2.

На панелях А-Б показано, что во всех экспериментальных условиях промоторная область гена GAPDH «помечена» H3K4me3 модификацией (количество сопоставимо со значениями, полученными для исходного образца INPUT), и содержит минимальное количество меток H3K9me3 и H3K27me3, сопоставимое со значениями, полученными для отрицательного контроля (IgG). Для сравнения мы показываем профиль распределения эпигенетических меток в промоторной области гена PPARg2 (В-Г): распределение эпигенетических меток может свидетельствовать как о неоднородности исследуемой клеточной популяции, так и о динамике эпигенетических модификаций хроматина в промоторной области гена PPARg2 в ходе жировой дифференцировки стромальных клеток подкожной жировой клетчатки.

дробления Bioruptor имеет разные типы штативов для пробирок и объем материала в образце имеет значение для поддержания стабильной эффективности дробления: в пробирки на 2 мл следует помещать не больше 250 мкл материала, а в пробирки на 0.5 мл – не больше 100 мкл. Также не рекомендуется перегружать образец материалом, и в случае высокой концентрации ДНК или хроматина следует разделить образец на несколько частей. Эффективность фрагментации будет стабильна только в образцах с сопоставимой концентрацией. На рисунке 2 (А) показаны примеры ультразвуковой фрагментации разной эффективности.

4. Все объемы реагентов уменьшить в соответствии с тем, что объем исходного образца 200 мкл, а не 500.

5. На начальных этапах отработки условий иммунопреципитации рекомендуется использовать образец неспецифичных антител (IgG) в качестве отрицательного контроля.

6. Разбавляют образец не только для того, чтобы привести в соответствие количество хроматина с количеством антител и «бусинок», которые используют для иммуноосаждения, но и для того, чтобы снизить концентрацию SDS в рабочем растворе, так как SDS может препятствовать связыва-

нию антител с антигеном. Поэтому образец должен быть разбавлен не менее чем 1:5 в RIPA буфере с ингибиторами протеиназ и деацетилаз независимо от исходной концентрации хроматина.

7. Денатурация с последующей иммунопреципитацией позволяет добиться селективного обогащения отдельно по каждой из комплементарных нитей ДНК, что важно при анализе эпигенетических меток.

8. Анализ выполняется с использованием стандартной кривой, полученной при последовательном разведении количественного стандарта ДНК с последующей нормализацией на значения, полученные для контрольных образцов INPUT. Стандартные образцы ДНК могут быть получены из любой ткани, любым доступным в лаборатории методом. Для построения стандартной кривой были использованы 6 последовательных разведений 1:4 с использованием начальной концентрации ДНК 1000 нг/мкл. В каждой серии экспериментов следует использовать одни и те же стандартные образцы ДНК. Обогащение иммуноосажденной фракции соответствующей эпигенетической модификацией промоторной области определяется нормализацией на значения, полученные для контрольных образцов INPUT. Пример

результатов анализа динамики эпигенетических модификаций ассоциированных с промоторной областью генов GAPDH и PPAR γ 2 в ходе жировой дифференцировки показан на рисунке 3.

9. Линейный полиакриламид является дешевым и удобным носителем для осаждения и визуализации небольших количеств ДНК и может использоваться наряду с коммерческим гликогеном. Приготовление раствора линейного полиакриламида выполняется как описано ранее [9]. Приготовить раствор 5% акриламида (без добавления бис-акриламида) в буферном растворе состава: 40mM Tris-HCl, 20mM Na acetate, 1mM EDTA, pH 7.8. Добавить 1/100 объема 10% ammonium persulfate и 1/1000 от объема TEMED и оставить полимеризоваться при комнатной температуре в течение 30 минут. После того как раствор стал вязким, высадить из него полимеризованный акриламид добавлением 2.5 объема этилового спирта, центрифугировать, удалить надосадочную жидкость и растворить осадок в 20-кратном количестве воды (по отношению к первоначальному объему) в течение ночи, на шейкере, при комнатной температуре. Полученный 0.25% раствор разлить по пробиркам и хранить в течение нескольких лет при -20 °C.

Приложение: состав буферных растворов

Таблица 1.

Block Solution 1	x10 мл
PBS	10 мл
0.5% BSA (масса/объем)	50 мг

Таблица 2.

Block Solution 2	x10 мл
PBS	10 мл
0.5% BSA (масса/объем)	5 мг

Таблица 3.

2×IP buffer	Stock	x 4 мл
0.05% Triton X-100	1% Triton X-100 in PBS	200 мкл
100 нг/мкл Yeast tRNA	50 мкг/мкл	8 мкл
PBS		3,8 мл

Таблица 4.

IP Wash buffer	Stock	x 5 мл
PBS		4,875 мл
0.025% Triton X-100	1% Triton X-100 in PBS	125 мкл

Таблица 5.

Lysis buffer	Stock	х 50 мл		
1% SDS	10%	5 мл		
10 mM EDTA (pH 8.0)	0.5 M	1 мл		
50 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1 M	2.5 мл		
dH ₂ O		41.5 мл		
Protease inhibitor cocktail	100×		10 мкл	Добавить к 1 мл Lysis buffer непосредственно перед использованием
1 mM PMSF	100 mM		10 мкл	
20 mM Na-butyrate	1 M		20 мкл	

Таблица 6.

Elution buffer	Stock	х 50 мл	4 °C
50 mM NaCl	5M	500 мкл	
20 mM Tris-HCl (pH 7.5)	1 M	1 мл	
5 mM EDTA (pH 8.0)	0.5 M	500 мкл	
dH ₂ O		42 мкл	
1% SDS	10%	5 мл	добавить непосредственно перед использованием

Таблица 7.

RIPA buffer	Stock	х 100 мл	1 мл	4 °C
0.1% SDS	10%	1 мл		
0.1% sodium deoxycholate		0.1 г		
1% Triton X-100	100%	1 мл		
1 mM EDTA (pH 8.0)	0.5M	200 мкл		
0.5 mM EGTA (pH 8.0)	0.5M	100 мкл		
140 mM NaCl	5M	2.8 мл		
10 mM Tris-HCl (pH 8.0)	1 M	1 мл		
dH ₂ O		93.9 мл		
Protease inhibitor cocktail	100×		10 мкл	добавить к 1 мл RIPA buffer непосредственно перед использованием
1 mM PMSF	100 mM		10 мкл	
20 mM Na-butyrate	1 M		20 мкл	

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Благодарности/Acknowledgments

Авторы благодарны коллективу лаборатории профессора Philippe Collas Университета Осло за помощь в освоении методов.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, грант 16-15-10178.

Список литературы / References

1. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature*. 2015;517(7534):321-326.
2. Reid MA, Dai Z, Locasale JW. The impact of cellular metabolism on chromatin dynamics and epigenetics. *Nat Cell Biol*. 2017;19(11):1298-1306.
3. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 2009; 325(5942):834-840.
4. Malashicheva A, Bogdanova M, Zabirnyk A, et al. Various lamin A/C mutations alter expression profile of mesenchymal stem cells in mutation specific manner. *Mol Genet Metab*. 2015; 115(2-3):118-27.

5. Smolina N, Kostareva A, Bruton J, et al. Primary Murine Myotubes as a Model for Investigating Muscular Dystrophy. *Biomed Res Int.* 2015;2015:594751.
6. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.* 2007;39(4):457-466.
7. Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell.* 2007;128(4):707-719.
8. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-622.
9. Gaillard C, Strauss F. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(2):378.

Информация об авторах:

Игнатъева Елена Владимировна, научный сотрудник Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»;

Смирнов Дмитрий Дмитриевич, студент, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого;

Костарева Анна Александровна, к.м.н., директор Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»;

Дмитриева Рената Игоревна, к.б.н., ведущий научный сотрудник Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»;

Author information:

Elena V. Ignatieva, researcher, Institute of molecular biology and genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Dmitry D. Smirnov, student, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University;

Anna A. Kostareva, PhD, director of the Institute of molecular biology and genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Renata I. Dmitrieva, PhD, Institute of molecular biology and genetics, Almazov National Medical Research Centre.

ВАЖНА КАЖДАЯ СЕКУНДА

Комплексные решения
для лечения острого
ишемического инсульта



Устройство для реваскуляризации SOLITAIRE™ 2

НАЗНАЧЕНИЕ

ВОССТАНОВЛЕНИЕ КРОВОТОКА У ПАЦИЕНТОВ,
ПЕРЕНЕСШИХ ИШЕМИЧЕСКИЙ ИНСУЛЬТ
В РЕЗУЛЬТАТЕ ЗАКУПОРКИ КРУПНОГО
ИНТРАКРАНИАЛЬНОГО СОСУДА.

СОСТАВ

СТЕНТ-РЕТРИВЕР ОТКРЫТОЙ КОНСТРУКЦИИ,
ЗАКРЕПЛЕННЫЙ НА ТОЛКАТЕЛЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ
И ПОЗИЦИОНИРОВАНИЯ

ПРЕИМУЩЕСТВА

ПАРАМЕТРИЧЕСКИЙ ДИЗАЙН

- ОПТИМАЛЬНОЕ ПРОХОЖДЕНИЕ ИЗВИЛИСТОЙ АНАТОМИИ ЗА СЧЕТ ОТКРЫТОЙ КОНСТРУКЦИИ СВЕРНУТОГО ЛИСТА
 - НАДЕЖНОЕ И АТРАВМАТИЧНОЕ ДЛЯ СОСУДА УДЕРЖИВАНИЕ ТРОМБА
 - СОКРАЩЕНИЕ ВРЕМЕНИ ПРОЦЕДУРЫ
- ОБШИРНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ - БОЛЕЕ 5 ИССЛЕДОВАНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОДУКТА!*

* Solitaire™ FR With the Intention For Thrombectomy (SWIFT) study SWIFT IDE # G090082 FD2923.

Дополнительное оборудование

- Баллонный катетер CELLO™
- Микрокатетер Rebar™
- Микропроводник Avigo™
- Микрокатетер Marksman™

на правах рекламы

Для медицинских специалистов. Товар сертифицирован.

ООО «Медтроник»
123112, Москва, Пресненская набережная, д.10, стр. С
Тел.: +7 (495) 580 -73-77
Факс: +7(495) 580 -73-78
Официальный сайт: www.medtronic.ru

Medtronic
Further, Together