



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

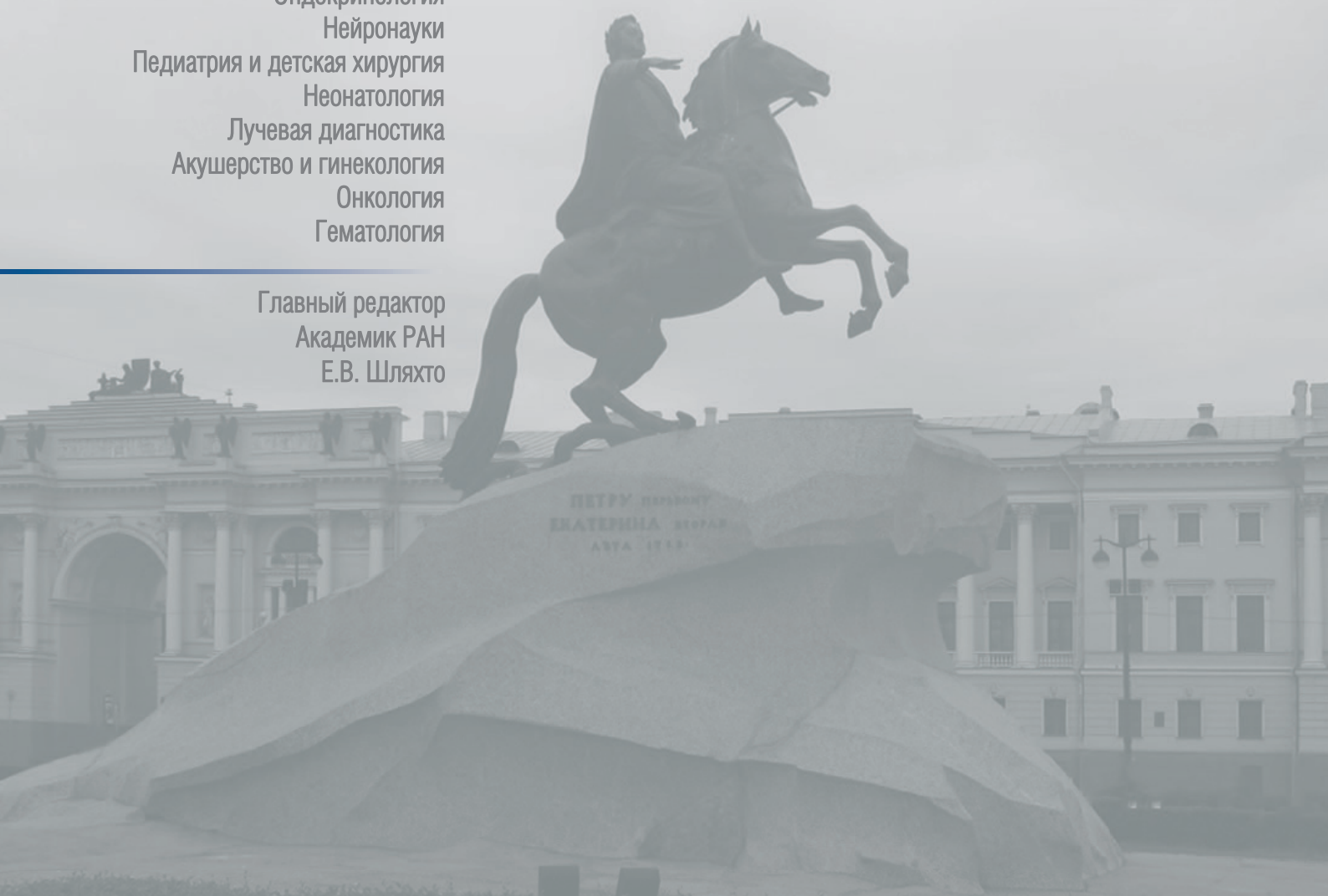
Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 5 №3 / 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 №3 / 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: bulleten@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. Shlyakheto

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)

MEMBERS**OF THE INTERNATIONAL
EDITORIAL BOARD**

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

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

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: bulleten@almazovcentre.ru

Subscription on catalogue of Rospechat agency: index 57996

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

All rights reserved. © 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** Полякова Е.А., Зарайский М.И., Беркович О.А., Баранова Е.И., Шляхто Е.В.
РОЛЬ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В ПАТОГЕНЕЗЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА

- 15** Мельник О.В., Князева А.А., Полубояринова О.Ю., Вахрушев Ю.А., Фомичева Ю.В., Ситникова М.Ю., Симоненко М.А., Вершинина Т.Л., Козырева А.А., Полякова А.А., Васичкина Е.С., Гудкова А. Я., Костарева А.А.
ФИЛАМИНОВАЯ РЕСТРИКТИВНАЯ КАРДИОМИОПАТИЯ: О ЧЁМ СЛЕДУЕТ ЗНАТЬ

- 23** Скородумова Е.Г., Костенко В.А., Скородумова Е.А., Сиверина А.В.
ОЦЕНКА ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОГО ОТЕКА У ПАЦИЕНТОВ С ПРОМЕЖУТОЧНОЙ ФУНКЦИЕЙ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА ПОСЛЕ КУПИРОВАНИЯ ОСТРОЙ ДЕКОМПЕНСАЦИИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

- 28** Улупова Е.О., Богданова Г.А., Каронова Т.Л., Гринева Е.Н.
СООТНОШЕНИЕ СВОБОДНЫХ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ АМИОДАРОН-ИНДУЦИРОВАННЫМ ТИРЕОТОКСИКОЗОМ 1 И 2 ТИПОВ

НЕВРОЛОГИЯ И НЕЙРОХИРУРГИЯ

- 36** Малышев С.М., Алексеева Т.М., Хачатрян В.А., Галагудза М.М.
НЕГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ *IN VIVO* И СТИМУЛЯЦИЯ БЛУЖДАЮЩЕГО НЕРВА

ОНКОЛОГИЯ

- 45** Чернов А.Н., Баранцевич Е.П., Калюнов В.Н., Галагудза М.М.
МЕТОДЫ ПОДБОРА *IN VITRO* ХИМИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ПАЦИЕНТОВ

НЕОНАТОЛОГИЯ И ПЕДИАТРИЯ

- 66** Михайлов А.В., Романовский А.Н., Овсянников Ф.А., Каштанова Т.А., Кянксеп И.В., Кянксеп А.Н., Кузнецов А.А., Шлыкова А.В., Мовчан В.Е.
ПОВТОРНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ФЕТОСКОПИЧЕСКОЙ ЛАЗЕРНОЙ КОАГУЛЯЦИИ АНАСТОМОЗОВ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ РЕЦИДИВЕ ФЕТО-ФЕТАЛЬНОГО ТРАНСФУЗИОННОГО СИНДРОМА

CONTENT

CARDIOVASCULAR MEDICINE

- 5** Polyakova E.A., Zaraiskii M.I., Berkovich O.A., Baranova E.I., Shlyakhto E.V.
THE ROLE OF SMALL NONCODING RNAs IN THE PATHOGENESIS OF CORONARY ARTERIES ATHEROSCLEROSIS

- 15** Melnik O.V., Knyazeva A.A., Poluboyarinova O.Y., Vakhrushev Yu.A., Fomisheva Yu.V., Sitnikova M.Yu., Simonenko M.A., Vershinina T.L., Kozyreva A.A., Polyakova A.A., Vasichkina T.S., Gudkova A. Ya., Kostareva A.A.
CLINICAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF RESTRICTIVE CARDIOMYOPATHY ASSOCIATED WITH MUTATIONS IN THE FILAMIN C GENE

- 23** Skorodumova E.G., Kostenko V.A., Skorodumova E.A., Siverina A.V.
ASSESSMENT OF INTERSTITIAL EDEMA IN PATIENTS WITH INTERMEDIATE FUNCTION OF THE LEFT VENTRICLE AFTER RESOLVING OF ACUTE DECOMPENSATION OF HEART FAILURE

METABOLIC DISEASES

- 28** Ulupova E.O., Bogdanova G.A., Karonova T.L., Grineva E.N.
FREE THYROID HORMONS RATION IN PATIENTS WITH AMIODARON-INDUCED THYROTOXICOSIS TYPE 1 AND TYPE 2

NEUROLOGY AND NEUROSURGERY

- 36** Malyshev S.M., Alekseeva T.M., Khachatryan W.A., Galagudza M.M.
NON-GENETIC *IN VIVO* EXPERIMENTAL MODELS OF EPILEPSY AND VAGUS NERVE STIMULATION

ONCOLOGY

- 45** Chernov A.N., Barantsevich E.P., Kalunov V.N., Galagudza M.M.
THE METHODS OF *IN VITRO* SELECTION OF CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS FOR INDIVIDUAL CHEMOTHERAPY OF MALIGNANT TUMORS IN PATIENTS

NEONATOLOGY AND PEDIATRICS

- 66** Mikhailov A.V., Romanovsky A.N., Ovsyannikov P.A., Kashtanova T.A., Kyanksep I.V., Kyanksep A.N., Kuznetsov A.A., Shlykova A.V., Movchan V.E.
EXPERIENCE OF REPEATED FETOSCOPIC LASER COAGULATION OF PLACENTAL ANASTOMOSES IN CASE OF RECURRENCE OF TWIN-TO-TWIN TRANSFUSION SYNDROME

РОЛЬ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В ПАТОГЕНЕЗЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ

Полякова Е.А.^{1,2}, Зарайский М.И.¹, Беркович О.А.¹,
Баранова Е.И.^{1,2}, Шляхто Е.В.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация

Полякова Екатерина Анатольевна
ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад.
И.П.Павлова» Минздрава России
ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-
Петербург, Россия, 197022
E-mail: polyakova_ea@yahoo.com

Статья поступила в редакцию 23.07.2018
и принята к печати 06.08. 2018.

Резюме

Актуальность. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), в том числе ишемическая болезнь сердца (ИБС), остаются ведущими причинами смертности. Результаты исследований указывают на участие микроРНК в патогенезе коронарного атеросклероза при ИБС.

Цель. Определить экспрессию микроРНК-27а, микроРНК-133а и микроРНК-203 в кардиомиоцитах и в сыворотке крови больных ишемической болезнью сердца с различной степенью поражения коронарных артерий.

Материалы и методы. В исследование было включено 100 человек, составивших 3 группы: 40 больных ИБС со стенозом 1-2^х коронарных артерий; 40 больных ИБС со стенозом 3^х и более коронарных артерий и 20 обследованных из группы сравнения без ИБС. Уровни экспрессии микроРНК-27а, микроРНК-133а и микроРНК-203 в кардиомиоцитах и в сыворотке крови оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Экспрессия микроРНК-27а и микроРНК-133а в кардиомиоцитах выше, чем в сыворотке крови, а экспрессия микроРНК-203 в сыворотке крови выше, чем в кардиомиоцитах. У больных ИБС экспрессия всех изучаемых микроРНК в крови и в кардиомиоцитах была значимо выше, чем у обследованных без стенозирующего атеросклероза коронарных артерий. Уровни экспрессии микроРНК-27а, -133а и -203 в сыворотке крови и в кардиомиоцитах левого предсердия больных ИБС с поражением 3^х и более коронарных артерий были значимо выше, чем у больных с поражением 1-2^х сосудов. Наиболее значимые различия между группами установлены при исследовании уровня микроРНК-203 в сыворотке крови.

Заключение. У больных ИБС экспрессия микроРНК-27а, — 133а и — 203 в кардиомиоцитах и в сыворотке крови выше, чем в группе сравнения. Кардиомиоцитами преимущественно экспрессировались микроРНК-27а и микроРНК-133а, а в сыворотке крови преобладала экспрессия микроРНК-203. При многососудистом поражении коронарных артерий экспрессия микроРНК-27а, — 133а и -203 в кардиомиоцитах и в сыворотке крови выше, чем при атеросклерозе одной и 2-х коронарных артерий. Высокий уровень экспрессии микроРНК-203 у больных ИБС может стать новым маркером прогноза степени поражения коронарных артерий.

Ключевые слова: микроРНК, кардиомиоциты, ИБС, атеросклероз, факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний.

Для цитирования: Полякова Е.А., Зарайский М.И., Беркович О.А., Баранова Е.И., Шляхто Е.В. Роль малых некодирующих рнк в патогенезе атеросклероза коронарных артерий. Трансляционная медицина. 2018; 5 (3): 5–14.

THE ROLE OF SMALL NONCODING RNAS IN THE PATHOGENESIS OF CORONARY ARTERIES ATHEROSCLEROSIS

Polyakova E.A.^{1,2}, Zraiskii M.I.¹, Berkovich O.A.¹, Baranova E.I.^{1,2}, Shlyakhto E.V.^{1,2}

¹Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

²Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Ekaterina A. Polyakova
Pavlov First Saint Petersburg State Medical University

L'va Tolstogo str. 6/8 Saint Petersburg, Russia, 197022

E-mail: polyakova_ea@yahoo.com

Received 23 July 2018; accepted 06 August 2018.

Abstract

Background. Cardiovascular disease, including coronary artery disease (CAD), remains a leading cause of mortality. The results of recent studies demonstrate that microRNA engages in pathogenesis of different pathological states, including coronary atherosclerosis and its clinical manifestation — CAD.

Objective. To evaluate microRNA-27a, microRNA-133a and microRNA-203 expression in cardiomyocytes and blood serum of CAD patients with different degrees of coronary artery lesion.

Design and methods. 100 patients were included in the study, they formed 3 groups: 40 patients with CAD and significant atherosclerosis of 1-2 coronary arteries; 40 patients with multi arterial coronary disease and 20 persons without CAD and significant comorbidity. The microRNA-27a, microRNA-133a and microRNA-203 expression was determined in cardiomyocytes and blood serum of these patients by real-time polymerase chain reaction.

Results. Level of microRNA-27a, microRNA-133a and microRNA-203 expression in left atrium cardiomyocytes of CAD patients with significant stenosis of 3 or more coronary arteries was higher, then their expression in the patients with 1-2-vessel and in group without coronary atherosclerosis. Examination of the microRNA expression level in blood serum and in left atrium cardiomyocytes revealed a significant difference. The expression of microRNA-27a and microRNA-133a in cardiomyocytes is above than in blood serum, while the expression of microRNA-203 in the myocardium is lower, than in the blood serum. Level of microRNA-27a, microRNA-133a and microRNA-203 expression in blood serum in CAD patients with significant stenosis of 3 or more coronary arteries was significantly higher, than in patients with 1-2 stenosis of coronary arteries. Furthermore, classification tree method established that risk of atherosclerotic heart disease increases five-fold if microRNA-203 expression in blood serum is more than 100 REU.

Conclusion. MicroRNA-27a and microRNA-133a expression in cardiomyocytes of left atrium is higher than in blood serum in CAD patients. MicroRNA-203 expression level in blood serum may be a new predictive marker of coronary artery degree atherosclerotic stenosis in CAD patients.

Key words: microRNA, cardiomyocytes, coronary artery disease, atherosclerosis, cardiovascular risk factors.

For citation:

Polyakova E.A., Zraiskii M.I., Berkovich O.A., Baranova E.I., Shlyakhto E.V. The role of small noncoding rnas in the pathogenesis of coronary arteries atherosclerosis. *Translyatsionnaya meditsina= Translational Medicine*. 2018; 5 (3): 5-14 pages. (In Russ.)

Список сокращений:

ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания

ИБС — ишемическая болезнь сердца

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

микроРНК — микрорибонуклеиновая кислота

КШ — коронарное шунтирование

УЕЭ — условная единица экспрессии

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), в том числе ишемическая болезнь сердца (ИБС), остаются ведущими причинами смертности во всем мире. Традиционные факторы риска могут объяснить лишь 70% случаев ИБС, а в 30% случаев связи заболевания с известными факторами риска ИБС — нет. Кроме того, не всегда можно объяснить, почему одни пациенты при равных условиях имеют однососудистое поражение, в то время как у других выявляются стенозы двух и более коронарных артерий [1]. Направленность на персонифицированный подход в современной медицине диктует необходимость поиска новых, высокочувствительных и специфичных факторов риска и неблагоприятного течения ИБС.

Известно, что ИБС — многофакторное заболевание, которое является следствием взаимодействия факторов среды с генетическими и эпигенетическими факторами. Изменение профиля экспрессии тканеспецифичных генов, цитокинов, факторов роста, генов, конститутивно и индуцибельно экспрессирующихся в макрофагах, эндотелиальных клетках, кардиомиоцитах, репрессия и активация транскрипционных факторов и клеточных рецепторов играют определяющую роль в атерогенезе и прогрессировании ИБС [2].

Известен ряд кандидатных генов, вовлеченных в этиопатогенез атеросклероза, но, вместе с тем, большое значение в возникновении и развитии ИБС имеет влияние эпигенетических факторов, регулирующих экспрессию генов, среди которых — метилирование ДНК, модификация гистонов и РНК-интерференция (регуляция экспрессии генов на транскрипционном или посттранскрипционном уровнях при участии малых регуляторных некодирующих молекул РНК, называемых — микрорибонуклеиновые кислоты). Микрорибонуклеиновые кислоты (микроРНК) являются внутриклеточными тканеспецифичными молекулами, которые не подвержены разрушению ферментами РНКазами [3]. Ряд молекул микроРНК был обнаружен в составе апоптозных телец, микровезикул, экзосом и липопротеинов, которые выполняют транспортную функцию, обеспечивая обмен генетической информацией между клетками [4].

Установлено, что микроРНК высвобождаются в циркуляторное русло различными путями, включая активную секрецию, апоптоз или некроз. Так как ряд нуклеотидных последовательностей поступает из клеток в жидкие среды организма, в том числе и в кровь, то уровень их экспрессии легко доступен оценке [6]. В частности, повышение уровня экспрессии микроРНК-1, микроРНК-133а и микроРНК-499 выявлено в крови больных острым коронарным синдромом. В настоящее время многие авторы рассматривают данные молекулы в качестве потенциальных чувствительных диагностических маркеров ИБС [5, 6, 14].

Установлено, что микроРНК принимают участие в патогенезе атеросклероза на всех его этапах, включая эндотелиальную дисфункцию (микроРНК-23, микроРНК-27а, микроРНК-130а, микроРНК-133а и др.), клеточную адгезию (микроРНК-27а/б, микроРНК-221 и др.), формирование и разрыв атеросклеротической бляшки (микроРНК-130а, микроРНК-221, микроРНК-144 и др.), хроническое воспаление, миграцию и активацию моноцитов в стенке сосудов (микроРНК-27а, микроРНК-203 и др.), образование липопротеинов (микроРНК-122, микроРНК-133аа/б и др.), активность тромбоцитов (микроРНК-27а, микроРНК-633 и др.), функцию гладкомышечных клеток (микроРНК-26, микроРНК-195 и др.), также принимают участие в электрическом ремоделировании миокарда (микроРНК-1, микроРНК-133а) [3, 5, 6, 7].

Тяжесть течения и неблагоприятный прогноз при ИБС в значительной степени обусловлены распространенностью поражения коронарных артерий. В последние годы появились работы, посвященные роли микроРНК в прогрессировании коронарного атеросклероза. Сведения о значении микроРНК в патогенезе атеросклероза коронарных артерий различной тяжести и распространенности противоречивы [1, 5, 7, 13].

Исходя из этого, целью данного исследования явилось изучение экспрессии молекул микроРНК, ассоциированных с развитием ИБС, в сыворотке крови и кардиомиоцитах пациентов, перенесших коронарное шунтирование, с различной тяжестью поражения коронарных артерий и у обследованных без коронарного атеросклероза для определения эпигенетических предпосылок неблагоприятного течения ишемической болезни сердца.

Материалы и методы

Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова» МЗ РФ, все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Обсле-

довано 100 человек, которые составили 3 группы: 40 пациентов с ИБС и гемодинамически значимым атеросклерозом 1-2-х коронарных артерий; 40 пациентов с многососудистым поражением коронарных артерий (3 и более сосудов) и 20 обследованных без ИБС. Средний возраст мужчин и женщин с ИБС не различался ($61,3 \pm 1,1$ года и $62,2 \pm 2,3$ года, соответственно; $p > 0,05$), соотношение больных по полу составило 2,5:1 (57 мужчин и 23 женщины). В группе сравнения соотношение мужчин и женщин было 1:1, а средний возраст составил $53,3 \pm 1,3$ и $50,2 \pm 1,3$ года, соответственно ($p > 0,05$).

Критерии не включения: вторичный характер ожирения и артериальной гипертензии; инсульт в анамнезе, сахарный диабет, хроническая обструктивная болезнь легких, злокачественное новообразование в анамнезе, почечная недостаточность, тяжелая патология печени, системное заболевание соединительной ткани, острая ревматическая лихорадка, инфекционный эндокардит, гипо/гипертиреоз, органические заболевания головного мозга, алкоголизм, наркомания.

Все пациенты с ИБС регулярно получали терапию антиагрегантами, бета-адреноблокаторами, ингибиторами АПФ/сартанами и ингибиторами ГМГ-КоА-редуктазы в соответствии с отечественными и зарубежными рекомендациями [10, 11].

Кардиохирургическое лечение с возможностью выполнения биопсии миокарда левого предсердия проведено 100 пациентам: 80 пациентам с ИБС выполнялось коронарное шунтирование (КШ) и 20 пациентам, оперированным по поводу клапанных пороков сердца, без атеросклеротического поражения коронарных артерий (по данным ангиографии) и без клинических признаков ИБС.

Всем пациентам проводили стандартное биохимическое исследование сыворотки крови с определением показателей липидного спектра. Уровень лептина сыворотки крови исследовали иммуноферментным методом. Всем больным выполнена коронароангиография и проанализированы ее результаты.

Анализ литературных данных позволил сделать выбор в пользу ряда микроРНК, ассоциированных с патогенезом ИБС, поэтому нами были изучены молекулы микроРНК-27а, микроРНК-133а, микроРНК-203, уровень экспрессии которых оценивали в кардиомиоцитах левого предсердия и в сыворотке крови.

Для выделения микроРНК использовали гомогенат миокарда левого предсердия и сыворотку крови. МикроРНК выделяли с использованием набора miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, США), согласно предложенной производителем инструкции. Концентрацию водного раствора микроРНК

определяли на спектрофотометре Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, США). Обратная транскрипция проводилась с использованием набора реагентов для обратной транскрипции микроРНК TaqMan. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили с использованием наборов Applied Biosystems (США) TaqMan® Gene Expression Assays для определения экспрессии всех исследуемых микроРНК в соответствии с инструкцией изготовителя.

Статистическую обработку данных проводили с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Методы дескриптивной статистики включали в себя оценку среднего арифметического (М) и среднеквадратического отклонения (σ), частот встречаемости признаков. Сравнение количественных параметров в исследуемых группах осуществляли с использованием критерия Манна-Уитни, модуля ANOVA. При сравнении частотных величин пользовались χ^2 -критерием Пирсона, а также точным методом Фишера. Также использовали метод построения классификационных деревьев, методы однофакторного дисперсионного анализа и линейного корреляционного анализа — критерии Пирсона и Спирмена. Проводили логистический регрессионный анализ. Статистическая обработка материала выполнена с использованием программы SPSS 17.0 для Windows. Различия результатов принимали за статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты

При изучении уровней экспрессии микроРНК были выявлены общие закономерности. Экспрессия микроРНК-27а и микроРНК-133а в кардиомиоцитах была значимо выше, чем в сыворотке крови. Экспрессия микроРНК-203 в кардиомиоцитах выражена слабо и преимущественно представлена в сыворотке крови (таблица 1).

У больных ИБС экспрессия всех изучаемых микроРНК в кардиомиоцитах и в сыворотке крови была значительно выше, чем значения соответствующих показателей у обследованных без коронарного атеросклероза (таблица 1).

Уровни экспрессии микроРНК-27а, -133а и -203 в кардиомиоцитах левого предсердия и в сыворотке крови у больных ИБС с поражением 3⁺ и более коронарных артерий были значимо выше, чем у больных с поражением 1-2⁺ сосудов (таблицы 2 и 3).

В сыворотке крови экспрессия всех исследуемых микроРНК при 3-х сосуди́стом поражении выше, чем у пациентов с атеросклерозом 1-2-х артерий и значительно выше, чем в группе контроля (таблица 3). Следует отметить, что уровень микроРНК-203 у больных с многососудистым поражением коронарного русла в десятки раз выше,

Таблица 1. Экспрессия микроРНК в миокарде предсердий и в сыворотке крови у больных ИБС и в группе сравнения

микроРНК, УЕЭ	Исследуемый материал	1	2	P ₁₋₂
		Группа сравнения	Больные ИБС	
27a	Кардиомиоциты	152,16±16,41	234,62±21,29	<0,0001
	Кровь	3,05±0,89	4,98±0,73	<0,05
	p, (кардиомиоциты, кровь)	<0,001	<0,001	
133a	Кардиомиоциты	98,28±9,53	119,54±12,72	<0,05
	Кровь	1,66±0,57	6,49±2,53	<0,05
	p, (кардиомиоциты, кровь)	<0,0001	<0,0001	
203	Кардиомиоциты	1,91±0,15	4,98±0,75	<0,05
	Кровь	4,11±0,85	94,71±14,17	<0,0001
	p, (кардиомиоциты, кровь)	<0,05	<0,0001	

Примечание: УЕЭ — условные единицы экспрессии

Таблица 2. Экспрессия микроРНК в кардиомиоцитах левого предсердия у больных ИБС с различным числом коронарных артерий, пораженных атеросклерозом, и в группе сравнения

микроРНК, УЕЭ	1	2	3	P
	Без поражения коронарных артерий	Поражение 1-2* коронарных артерий	Поражение 3* и более коронарных артерий	
27a	152,16±16,41	182,39±19,62	234,62±29,51	1-2<0,05 1-3<0,01 2-3<0,01
133a	98,28±9,53	111,35±12,31	127,53±13,41	1-2<0,05 1-3<0,01 2-3<0,01
203	1,91±0,15	4,71±0,67	5,25±0,96	1-2<0,01 1-3<0,01 2-3<0,05

Таблица 3. Экспрессия микроРНК в сыворотке крови у больных ИБС с различным числом коронарных артерий, пораженных атеросклерозом, и в группе сравнения

микроРНК, УЕЭ	1	2	3	P
	Без поражения коронарных артерий	Поражение 1-2* коронарных артерий	Поражение 3* и более коронарных артерий	
27a	3,05±0,89	4,82±1,82	11,41±3,85	1-2<0,05 1-3<0,001 2-3<0,01
133a	1,66±0,57	4,35±1,23	8,42±2,43	1-2<0,05 1-3<0,01 2-3<0,01
203	4,11±0,85	43,70±9,67	145,71±15,73	1-2<0,01 1-3<0,0001 2-3<0,01

Таблица 4. Показатели липидного спектра и уровень лептина сыворотки крови у больных ИБС и в группе сравнения

		Группа сравнения	Больные ИБС	Достоверность различий в группах
ОХС, ммоль/л		5,58±1,13	4,71±1,11	p<0,05
ХС ЛПНП, ммоль/л		3,30±0,11	2,62±0,91	p<0,05
ХС ЛПОНП, ммоль/л		0,60±0,10	0,79±0,04	p<0,05
ХС ЛПВП, ммоль/л		1,25±0,05	1,30±0,02	НД
Триглицериды, ммоль/л		1,93±0,13	1,68±0,08	НД
Лептин, нг/мл	Мужчины	14,1±2,8	22,8±3,2	p<0,01
	Женщины	26,5±3,6	41,1±4,2	p<0,001
	p (мужчины, женщины)	p<0,001	p<0,001	

Примечание: ОХС — общий холестерин, ЛПНП — липопротеины низкой плотности, ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности, ЛПВП — липопротеины высокой плотности, НД — недостоверно.

чем у обследованных без атеросклероза коронарных артерий.

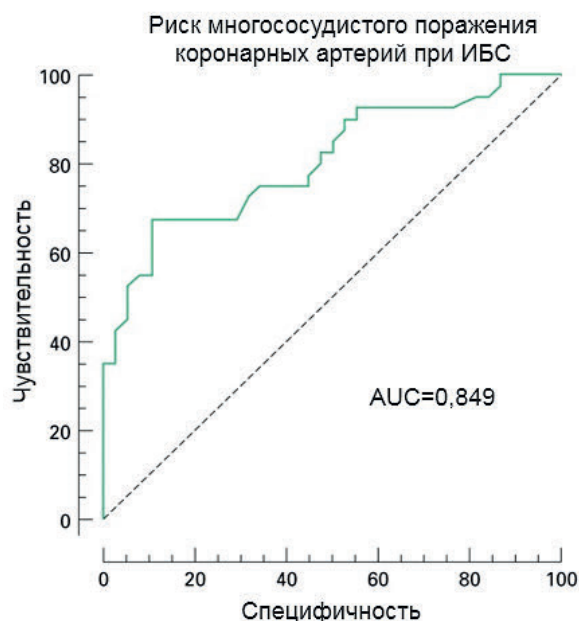
Методом построения классификационных деревьев установлено, что при уровне экспрессии микроРНК-203 в сыворотке крови более 100 УЕЭ риск атеросклеротического поражения коронарных артерий возрастал в 5 раз. Для других изучаемых микроРНК подобных закономерностей выявлено не было.

При анализе показателей липидного спектра установлено, что у больных ИБС, которые получали лечение статинами, концентрация в крови общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов низкой (ХС ЛПНП) и очень низкой плотности (ХС ЛПОНП) ниже, чем у обследованных из группы сравнения. Концентрация холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) и триглицеридов в крови больных ИБС и в группе сравнения не различались (таблица 4). Концентрация лептина в сыворотке крови у больных ИБС выше, чем у обследованных из группы сравнения (таблица 4).

При проведении корреляционного анализа у больных ИБС выявлен ряд взаимосвязей между уровнями экспрессии изучаемых микроРНК в сыворотке крови и различными показателями, определяющими сердечно-сосудистый риск. В частности, была выявлена положительная корреляция между уровнем экспрессии микроРНК-27а в крови и показателями липидного спектра крови — концентрацией холестерина ЛПОНП, триглицеридов ($r=0,405$; $p=0,012$ и $r=0,347$; $p=0,017$). У обследованных без ИБС экспрессия микроРНК-27а ассоциировалась с более высоким уровнем ХС ЛПНП в сыворотке крови.

По данным логистического регрессионного анализа у больных ИБС с атеросклеротическим поражением 3^х и более коронарных артерий факторами,

в наибольшей степени определяющими риск многососудистого поражения, были повышенный уровень экспрессии микроРНК-203 в сыворотке крови, высокий уровень лептина сыворотки крови и низкий уровень холестерина ЛПВП, чувствительность и специфичность указанной модели составили 80% и 96%, соответственно, при пороге классификации 0,53 в соответствии с данными ROC-анализа ($AUC=0,849$ при 95% доверительном интервале от 0,741 до 0,957; $p<0,001$, рисунок № 1).

Рисунок 1. Результаты ROC-анализа чувствительности и специфичности модели, определяющей риск многососудистого атеросклеротического поражения коронарных артерий у больных ИБС

Обсуждение

Патологические процессы, происходящие в кардиомиоцитах при ИБС характеризуются апоптозом, интерстициальным фиброзом и ангиогенезом, которые на посттранскрипционном уровне регулируются путем изменения экспрессии и функций генов, каждый из которых служит мишенью для специфических микроРНК [8, 21].

Два подтипа микроРНК-133 широко представлены в скелетной мускулатуре (микроРНК-133b) и в сердечной мышечной ткани (микроРНК-133a). А. Zampetaki с соавторами (2013), при изучении функций микроРНК-133a, установили, что эта молекула непосредственно подавляет уровень фактора транскрипции человека, кодируемого геном Sp1 (specificity protein 1) на 12-й хромосоме. Поскольку повышение экспрессии Sp1 ассоциируется с прогрессированием апоптоза миоцитов, полагают, что подавление экспрессии Sp1 микроРНК-133a сопровождается снижением апоптоза кардиомиоцитов [12]. Более того, было доказано, что у больных ИБС микроРНК-133a оказывает антиапоптотическое действие, специфично связываясь с 3'-нетранслируемой областью гена каспазы-9, подавляя его экспрессию на уровне матричной РНК. Снижение каспазы-9 влечет за собой подавление апоптоза кардиомиоцитов в тех зонах миокарда, которые подвержены ишемии [23]. Исходя из этого, эффекты микроРНК-133a можно считать адаптивными в условиях ишемического повреждения.

Е. Cipollone с соавторами (2011) сопоставили уровень микроРНК-133a у пациентов с разной степенью стабильности атеросклеротических бляшек у больных с дислипидемией и выявили значительно более высокую экспрессию этой молекулы в бляшках с признаками нестабильности [13].

В нашем исследовании экспрессия тканеспецифичной микроРНК-133a у больных с многососудистым атеросклеротическим поражением коронарных артерий была существенно выше, чем при поражении 1-2 коронарных артерий и у обследованных без коронарного атеросклероза.

Нами также получены данные о преобладании экспрессии микроРНК-133a в кардиомиоцитах, по сравнению с экспрессией этого показателя в сыворотке крови, которые согласуются с данными литературы [23].

Следует отметить, что в последние годы обсуждается возможность использования циркулирующих микроРНК в качестве чувствительных биомаркеров ИБС. Находящиеся в крови микроРНК высоко стабильны при кипячении и устойчивы к высоким и низким значениям pH среды, к дли-

тельной инкубации при комнатной температуре и к повторному замораживанию [5].

Описаны молекулы, в частности, микроРНК 1, 133a, 134, 208a, 451, 499, которые, являясь кардиоспецифичными, рассматриваются в качестве маркеров повреждения при таком жизнеугрожающем проявлении ИБС, как инфаркт миокарда [14]. Вместе с тем, молекулы микроРНК-1, 133a и 499 в небольшом количестве экспрессируются и миоцитами скелетной мускулатуры, а микроРНК-133a также и эндотелиальными клетками [14]. Известно, что уровень экспрессируемых эндотелиоцитами молекул микроРНК-126, микроРНК-92a, микроРНК-17, микроРНК-145, микроРНК-155, микроРНК-208 и микроРНК-133a в крови у больных ИБС ниже, чем у обследованных без ИБС. Авторы объясняют эту особенность процессом обратного захвата микроРНК из кровотока клетками, образующими поверхность атеросклеротической бляшки [15]. В какой-то степени низкие значения экспрессии ряда циркулирующих в крови молекул микроРНК, в том числе — микроРНК-133a, можно объяснить обратным захватом этих молекул эндотелиоцитами артерий, пораженных атеросклерозом [16]. По данным нашего исследования экспрессия микроРНК-27a и -133a в кардиомиоцитах выше, чем в сыворотке крови.

МикроРНК могут оказывать как протективное, так и повреждающее действие [7, 8]. Исследования функции микроРНК-27a *in vivo* и *in vitro* выявили ее ключевую роль в ангиогенезе, адипогенезе, воспалении, липидном метаболизме, окислительном стрессе, инсулинорезистентности, т.е. практически во всех процессах, способствующих развитию и прогрессированию атеросклероза [9].

В литературе появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что микроРНК участвуют в регуляции процессов фиброза. Фиброз при ИБС характеризуется нарушением соотношения компонентов межклеточного матрикса, причиной которого является дисбаланс работы многокомпонентного метаболического каскада, вовлеченного в регенерацию тканей и процесс воспаления [21]. Среди молекул, участвующих в процессе формирования фиброза — микроРНК-27a. Одним из многочисленных эффектов микроРНК-27a является включение поляризации макрофагов M1 путем блокирования PPAR γ . Также микроРНК-27a участвует в активации апоптоза кардиомиоцитов через сигнальные пути GATA-4, Smad7 и интерлейкин 10 (IL-10). Доказано, что ремоделирование сердца в значительной степени связано с повышенным уровнем экспрессии микроРНК-27a в сыворотке крови и эта молекула может выступать в качестве

потенциального маркера фиброза миокарда [3, 20]. В нашем исследовании была выявлена положительная взаимосвязь между ХС ЛПОНП, триглицеридами и уровнем экспрессии микроРНК-27а в сыворотке крови.

По данным литературы микроРНК-27а участвует в регуляции синтеза рецептора липопротеинов низкой плотности. Повышение экспрессии этой молекулы ассоциировалось с высоким уровнем ХС ЛПНП в крови, а блокада экспрессии микроРНК-27а в эксперименте приводила к снижению циркулирующих ХС ЛПНП более чем на 70% [17]. Исходя из этого, можно предположить, что микроРНК-27а может быть кандидатом для разработок таргетной терапии атеросклероза. В нашей работе у обследованных без ИБС выявлена корреляционная связь между экспрессией микроРНК-27а и концентрацией ХС ЛПНП в сыворотке крови. Вместе с тем, у больных ИБС ассоциации между экспрессией микроРНК-27а и концентрацией ХС ЛПНП в крови получено не было, что, возможно, связано с терапией статинами.

По нашим данным у больных ИБС уровень экспрессии микроРНК-27а как в крови, так и в кардиомиоцитах был выше у пациентов с множественным поражением коронарных артерий, и уровень экспрессии микроРНК-27а преобладал в кардиомиоцитах, по сравнению с этим показателем в сыворотке крови.

В то время как роль микроРНК-27а в развитии атеросклероза достаточно исследована, существуют малоизученные молекулы, к которым, в частности, относится микроРНК-203. Опубликована единственная работа Q. He с соавторами (2017), в которой на культуре кардиомиоцитов мыши (*in vitro*) было показано, что избыточная экспрессия микроРНК-203 приводила к уменьшению уровней экспрессии трансформирующего фактора роста- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), фактора роста соединительной ткани (CTGF) и фибронектина, принимающих участие в регуляции активности фибробластов миокарда в условиях хронической ишемии. Напротив, ингибирование экспрессии микроРНК-203 сопровождалось повышением уровней TGF- $\beta 1$, CTGF и фибронектина, потенцируя развитие фиброза [18]. Также, опубликованы данные исследования по изучению роли микроРНК-203 в развитии фиброза печени: избыточная экспрессия микроРНК-203 подавляет фиброз в печеночных дольках [19].

По нашим данным экспрессия микроРНК-203 была значимо выше у пациентов с многососудистым поражением коронарных артерий, при этом, уровень ее экспрессии в сыворотке крови значимо преобладал по сравнению с показателем в кардиомиоцитах.

Заключение

Таким образом, по данным проведенного исследования экспрессия всех изучаемых микроРНК у больных ишемической болезнью сердца была значимо выше, чем у обследованных без коронарного атеросклероза как в крови, так и в кардиомиоцитах.

Экспрессия микроРНК-27а, микроРНК-133а и микроРНК-203 в сыворотке крови и кардиомиоцитах левого предсердия больных ишемической болезнью сердца с поражением 3^х и более коронарных артерий была значимо выше, чем у больных с поражением 1-2^х артерий.

В сыворотке крови у больных ишемической болезнью сердца выявлен высокий уровень экспрессии микроРНК-203, что может стать новым маркером прогноза степени поражения коронарных артерий.

По результатам работы экспрессия микроРНК-27а в сыворотке крови у больных ишемической болезнью сердца коррелировала с атерогенной дислипидемией.

Выявленный в нашей работе высокий уровень экспрессии микроРНК-203 в сыворотке крови оказывал влияние на риск многососудистого коронарного атеросклероза у больных ишемической болезнью сердца. На основании данных логистического регрессионного анализа, установлено, что в этот процесс также вовлечены высокий уровень лептина сыворотки крови и низкие показатели холестерина ЛПВП.

Данное исследование расширяет представления о молекулярных основах патогенеза ишемической болезни сердца путем количественной оценки экспрессии микроРНК-27а, микроРНК-133а и микроРНК-203 как в кардиомиоцитах левого предсердия, так и в доступном для исследования материале — сыворотке крови.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Благодарности / Acknowledgments

Авторы выражают признательность за оказанную помощь в осуществлении работы сотрудникам ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова», в числе которых Алексеева Галина Васильевна (к.м.н., научный сотрудник лаборатории ИБС НИИ Сердечно-сосудистых заболеваний Научно-клинического исследовательского центра), Немков Александр Сергеевич (д.м.н., профессор кафедры факультетской хирургии), Маслевцов Дмитрий Вадимович (к.м.н., заведующий кардиохирургиче-

ским отделением №1 клиники госпитальной хирургии №2), Гавриленков Владимир Иванович (д.м.н., профессор кафедры госпитальной хирургии №2), Галкина Ольга Владимировна (к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики).

Список литературы / References

1. Ding X-Q, Ge P-C, Liu Z, et al. Interaction between microRNA expression and classical risk factors in the risk of coronary heart disease. *Scientific Reports*. 2015; 5:14925.
2. McPherson R, Tybjaerg-Hansen A. Genetics of Coronary Artery Disease. *Circ Res*. 2016; 118(4):564-578.
3. Chao C, Murugavel P, Cuiyun L, et al. MicroRNA as a Therapeutic Target in Cardiac Remodeling. *BioMed Research International*. 2017; 2017:1278436.
4. Kim YS, Ahn JS, Kim S, et al. The potential theragnostic (diagnostic+therapeutic) application of exosomes in diverse biomedical fields. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2018; 22(2):113-125.
5. Sayed AS, Xia K, Yang TL, et al. Circulating microRNAs: a potential role in diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction. *Dis Markers*. 2013; 35:561-566.
6. Nishiguchi T, Imanishi T, Akasaka T. MicroRNAs and Cardiovascular Diseases. *BioMed Research International*. 2015; 2015:1-14.
7. Papageorgiou N, Tousoulis D, Charakida M, et al., Prognostic role of miRNAs in coronary artery disease. *Curr. Top. Med. Chem*. 2013; 13:1540-1547.
8. Hamed M, Gordon AF, Amir A, et al. Cytokines and MicroRNA in Coronary Artery Disease. *Advances in Clinical Chemistry*. 2017; 82:47-70.
9. Tian C, Gao L, Zimmerman MC, et al. Myocardial infarction-induced microRNA-enriched exosomes contribute to cardiac Nrf2 dysregulation in chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018; May 1; 314(5):H928-H939.
10. Bokeriya LA, Aronov DM. Russian clinical guidelines. Coronary artery bypass grafting in patients with ischemic heart disease: rehabilitation and secondary prevention. *CardioSomatika*. 2016; 7(3-4) :5-71. In Russian. [Бокерия Л.А., Аронов Д.М. Российские клинические рекомендации. Коронарное шунтирование больных ишемической болезнью сердца: реабилитация и вторичная профилактика. Кардио Соматика. 2016; 7(3-4):5-71].
11. 2013 ESC Guidelines on the management of stable coronary artery disease. *European Heart Journal*. 2013; 34:2949-3003.
12. Zampetaki A, Katarzyna D, Mayr M. Oxidative stress in atherosclerosis: The role of microRNAs in arterial remodeling. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013; 64:69-77.
13. Cipollone F, Felicioni L, Sarzani R, et al. A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans. *Stroke*. 2011; 42:2556-2563.
14. Fedorov AV, Kostareva AA, Galagudza MM, et al. MicroRNA as biomarkers of myocardial ischemic injury: a perspective. *Microcirculation*. 2012; 11(3) :69-75. In Russian. [Федоров А.В., Костарева А.А., Галагудза М.М. и др. Перспективы использования микроРНК в качестве биомаркера ишемического повреждения миокарда. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2012; 11(3):69-75].
15. Syed SA, Chandra K, Mohd A, et al. Pathological microRNAs in acute cardiovascular diseases and microRNA therapeutics. *Journal of Acute Disease*. 2016; 5(1):9-15.
16. Jamaluddin MS, Weakley SM, Zhang L, et al. MiRNAs: roles and clinical applications in vascular disease. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011; 11(1):79-89.
17. Alvarez ML, Khosroheidari M, Eddy E, et al. MicroRNA-27a decreases the level and efficiency of the LDL receptor and contributes to the dysregulation of cholesterol homeostasis. *Atherosclerosis*. 2015; 242(2):595-604.
18. He Q, Wang C, Qin J, et al. Effect of miR-203 expression on myocardial fibrosis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2017; 21:837-842.
19. Zheng I, Jian X, Guo F, et al. miR-203 inhibits arecoline-induced epithelial-mesenchymal transition by regulating secreted frizzled-related protein 4 and transmembrane-4 L six family member 1 in oral submucous fibrosis. *Oncol Rep*. 2015; 33:2753-2760.
20. Wu-Jun C, Kai Y, Guo-Jun Z, et al. The magic and mystery of MicroRNA-27 in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012; 222:314- 323.
21. Navickas R, Gal D Laucevicius A, Taparauskaitė A, et al. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. *Cardiovascular Research*. 2016; 111:322-337.
22. Sattar N, Wannamethee G, Sarwar N, et al. Leptin and coronary heart disease: prospective study and systematic review. *J Am Coll Cardiol*. 2009; Jan 13; 53(2):167-175.
23. Abdellatif M. Differential Expression of MicroRNAs in Different Disease States. *Circ Res*. 2012; 110:638-650.

Информация об авторах:

Полякова Екатерина Анатольевна, к.м.н., ассистент кафедры факультетской терапии с курсом эндокринологии, кардиологии и функциональной диагностики, научный сотрудник лаборатории артериальной гипертензии НИИ сердечно-сосудистых заболеваний Научно-клинического исследовательского центра ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ, старший научный сотрудник НИЛ метаболического синдрома ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» МЗ РФ;

Зарайский Михаил Игоревич, д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ;

Беркович Ольга Александровна, д.м.н., профессор кафедры терапии факультетской с курсом эндокринологии, кардиологии и функциональной диагностики, заведующая лабораторией ИБС НИИ сердечно-сосудистых заболеваний Научно-клинического исследовательского центра ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ;

Баранова Елена Ивановна, д.м.н., профессор кафедры терапии факультетской с курсом эндокринологии, кардиологии и функциональной диагностики, директор Научно-исследовательского института сердечно-сосудистых заболеваний ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ; заведующая НИЛ метаболического синдрома ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» МЗ РФ;

Шляхто Евгений Владимирович, академик РАН, заведующий кафедрой терапии факультетской с курсом эндокринологии, кардиологии и функциональной диагностики ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ; генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» МЗ РФ;

Author information:

Ekaterina A. Polyakova, PhD, MD, researcher, department of arterial hypertension, academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, researcher, laboratory of metabolic syndrome, Almazov National Medical Research Centre;

Mikhail I. Zaraiskii, Dr. Sci., prof., Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Olga A. Berkovich, MD, prof., head of the laboratory of Cardiac ischemia, Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Elena I. Baranova, MD, Dr. Sci., the head of the laboratory of metabolic syndrome, Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Evgeniy V. Shlyakhto, acad., the head of Almazov National Medical Research Centre.

ФИЛАМИНОВАЯ РЕСТРИКТИВНАЯ КАРДИОМИОПАТИЯ: О ЧЁМ СЛЕДУЕТ ЗНАТЬ

Мельник О.В.¹, Князева А.А.¹, Полубояринова О.Ю.¹,
Вахрушев Ю.А.¹, Фомичева Ю.В.¹, Ситникова М.Ю.¹,
Симоненко М.А.¹, Вершинина Т.Л.¹, Козырева А.А.¹,
Полякова А.А.¹, Васичкина Е.С.¹, Гудкова А. Я.^{1,2},
Костарева А.А.¹

Контактная информация:
Костарева Анна Александровна
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: akostareva@hotmail.com

Статья поступила в редакцию 24.07.2018
и принята к печати 01.08.201

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет им. акад.
И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Ранее считалось, что мутации в структуре гена филамина С способны вызывать только скелетные миопатии, сердечные ткани при этом не исследовались. Однако недавно были обнаружены филаминовые мутации, которые приводят как к сочетанным повреждениям скелетной и сердечной мускулатуры, так и изолированному поражению сердечной ткани. Более того, в настоящее время стало известно, что мутации в FLNC ассоциированы со всеми известными видами кардиомиопатий (ГКМП, ДКМП, РКМП, аритмогенной). В статье представлены собственные клинические наблюдения взрослого и детского случаев изолированной филаминовой РКМП на базе нашего учреждения. Изучение данной проблемы в дальнейшем позволит включить известные нам мутации в скрининговые панели, что приведет к ранней диагностике кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями в FLNC, возможности предотвращения быстрого прогрессирования заболевания, а также к более поздним срокам трансплантации сердца.

Ключевые слова: рестриктивная кардиомиопатия, FLNC, филамин С.

Для цитирования: Полубояринова О.Ю., Князева А.А., Мельник О.В., и соавт. Филаминовая рестриктивная кардиомиопатия: о чём следует знать. Трансляционная медицина. 2018; 5 (3): 15–22.

CLINICAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF RESTRICTIVE CARDIOMYOPATHY ASSOCIATED WITH MUTATIONS IN THE FILAMIN C GENE

Melnik O.V.¹, Knyazeva A.A.¹, Poluboyarinova O.Y.¹, Vakhrushev Yu.A.¹, Fomisheva Yu. V.¹, Sitnikova M.Yu.¹, Simonenko M.A.¹, Vershinina T.L.¹, Kozyreva A.A.¹, Polyakova A.A.¹, Vasichkina T.S.¹, Gudkova A.Ya.^{1,2}, Kostareva A.A.¹

Corresponding author:

Anna A. Kostareva
Almazov National Medical Research Centre
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341
E-mail: akostareva@hotmail.com

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

Received 24 July 2018; accepted 01 August 2018.

Abstract

Previously, it was believed that mutations in filamin C are able to cause only skeletal myopathies, cardiac tissues have not been studied. However mutations in FLNC have been recently found that lead to both joint damage to the skeletal and cardiac musculature and to isolated cardiac tissue damage. Moreover, had known that mutations in FLNC are associated with all known types of cardiomyopathies (HCM, DCM, RCM, arrhythmogenic) at present. The article presents our own clinical observations of an adult and children's cases of isolated phylaminic RCM based on our institution. The study of this problem will allow us to include the known mutations in the genetic screening panels, which will lead to early diagnosis of cardiomyopathies associated with mutations in FLNC and the ability to prevent rapid disease progression and more later cardiac transplantation in the future.

Key words: restrictive cardiomyopathy, FLNC, filamin C.

For citation: Poluboyarinova O.Y., Knyazeva A.A., Melnik O.V., et al. Clinical and morphological characteristics of restrictive cardiomyopathy associated with mutations in the filamin c gene. Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2018; 5 (1):(In Russ.)

Список сокращений

АКМП — аритмогенная кардиомиопатия, ВС — внезапная смерть, ГКМП — гипертрофическая кардиомиопатия, ДКМП — дилатационная кардиомиопатия, ЖТ — желудочковая тахикардия, ЖЭС — желудочковая экстрасистолия, КМП — кардиомиопатия, ЛЖ — левый желудочек, РКМП — рестриктивная кардиомиопатия, СН — сердечная недостаточность, ЭхоКГ — эхокардиография, FLNC — филамин С.

Кардиомиопатии (КМП) представляют собой врожденные и приобретенные заболевания миокарда ишемического генеза, сопровождающиеся изменением формы и размеров сердца, нарушени-

ем его систолической или диастолической функции и приводящие к развитию сердечной недостаточности (СН), нарушению сердечного ритма и проводимости. В структуре всех кардиомиопатий большую часть занимают идиопатические КМП, в основе которых лежат генетические причины. На сегодняшний день благодаря многолетнему опыту исследований нам известно множество генов, являющихся причиной гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП), также хорошо изучена генетическая структура дилатационной (ДКМП) и аритмогенной кардиомиопатий (АКМП). Самой редкой, а потому и малоизученной, остается рестриктивная кардиомиопатия (РКМП). РКМП — заболевание, характеризующееся ригидностью

или сниженной степени комплаентности стенок миокарда, что приводит к его диастолической дисфункции, нарушению внутрисердечной гемодинамики и развитию СН [1]. В качестве причин формирования рестриктивного фенотипа у пациентов с наследственными КМП известны мутации в генах, кодирующих синтез саркомерных и несаркомерных белков кардиомиоцита, а также некоторых белков теплового шока. Панель генов РКМП выглядит следующим образом: ACTC1, DES, GLA, MYBPC3, MYH7, MYL2, MYL3, TNNI3, TNNT2, TPM1, TTR, ACTN2, FHL1, HFE, MYPN, TNNC1, TTN, BAG3, FLNC, LMNA, CRYAB. Мутации данных генов ведут к формированию РКМП посредством различных механизмов. Например мутации в генах DES и CRYAB вызывают возникновение рестриктивного фенотипа путем структурного нарушения внутриклеточной локализации промежуточных филаментов, тогда как мутации в генах саркомерных белков TNNI3, TNNT2, ACTC служат причиной нарушений функций самого саркомера, что приводит к формированию РКМП [2, 3].

РКМП проявляется клиникой прогрессирующей диастолической СН, которая плохо поддается медикаментозной коррекции. Характерной чертой РКМП являются наджелудочковые нарушения ритма, такие как фибрилляция и трепетание предсердий, нередко приводящие к образованию тромбов в полостях сердца и тромбоэмболическим осложнениям. В редких случаях заболевание манифестирует с клиникой желудочковых нарушений ритма и внезапной сердечной смерти [4, 5]. При морфологическом и электронно-микроскопическом анализе биоптатов миокарда пациентов с РКМП регистрируются выраженная степень фиброза, миофибриллярная деструкция и вакуолизация мембран [1]. Нередко в эндо- и субэндокардиальных слоях миокарда обнаруживается феномен дисконфракции, или так называемый «disarray», характерный для ГКМП [6].

Ранее считалось, что мутации в FLNC приводят исключительно к возникновению скелетных миопатий [7]. Доминантные мутации, вызывающие миофибриллярную миопатию типа 5 (MFM; MIM #609524) и дистальную миопатию типа 4 (MIM #614065), были описаны Vorgerd и соавторами [8]. Однако ряд последних исследований показал, что определенные мутации FLNC способны вызывать кардиальную патологию, причем, как в сочетании со скелетной миопатией, так и без нее. Совсем недавно были описаны FLNC мутации у пациентов с ГКМП и пациентов с ДКМП, подтверждая то, что мутации FLNC могут привести к кардиальному фенотипу, не вызывая нейромышечную патологию [9]. При этом экспрессия мутантных вариантов FLNC

обуславливает образование крупных внутриклеточных агрегатов филамина С, что и лежит в основе дисфункции отдельных кардиомиоцитов [10].

Одними из первых были описаны случаи ДКМП, обусловленной гомозиготными рецессивными мутациями в FLNC. Исследования проводились на семье евреев Ашкенази, которая состояла из родителей и пяти детей. Признаков дистальной или проксимальной миопатии ни у кого в описанной семье обнаружено не было. Гистологическое исследование миокарда пробанда после проведения трансплантации сердца выявили заметные саркомерные аномалии, дезорганизацию и редукцию миофибрилл, непостоянную морфологию ядра и вакуолей кардиомиоцитов, разорванные волокна миокарда [11].

Позже было показано, что сплайсинговые мутации в гене FLNC ассоциируются с высоким риском возникновения дилатационной и аритмогенной кардиомиопатии. Так, при исследовании когорты из 2877 пациентов с различными вариантами кардиомиопатий, были выявлены 23 мутации, приводящие к трункции (усечению) филамина у 28 пациентов, при этом у 20 пациентов стоял диагноз ДКМП, у 7 пациентов — АКМП и у одного — РКМП. В других генах патогенные мутации у данных пациентов не обнаруживались. В итоге частота укорачивающих форм мутаций FLNC среди пациентов с ДКМП составила 3,9%, среди пациентов с АКМП — 3,2%, а среди пациентов с РКМП — 2,2%. У трех из вновь выявленных носителей мутаций не было симптомов на момент постановки диагноза, причиной их обследования явилось наличие случаев внезапной смерти в семье. У 43% родственников с положительным генотипом не было симптомов и патология была найдена в результате семейного скрининга. У большей части пробандов наблюдалась дилатация левого желудочка (ЛЖ) (конечно-диастолический диаметр 61 ± 13 мм) и систолическая дисфункция (фракция выброса левого желудочка $34 \pm 13\%$), так же данные симптомы часто наблюдались среди родственников (конечно-диастолический диаметр 53 ± 9 мм, фракция выброса $52 \pm 12\%$). Умеренная гипертрофия ЛЖ (максимальная толщина стенки ≤ 14 мм) не удовлетворяла диагностическим критериям ГКМП и была описана у 10 обследуемых (13%). Желудочковые аритмии наблюдались чрезвычайно часто среди носителей мутаций в гене FLNC (82%). Частая ЖЭС и неустойчивая ЖТ являлись наиболее распространенными нарушениями ритма. Два пациента из этих обследуемых умерли в результате синдрома внезапной смерти (в возрасте 22 и 25 лет, соответственно), наличие фиброза миокарда у данных пациентов было подтверждено гистологически [12].

При первоначальной оценке, ни у кого из обследованных не было мышечной слабости или признаков скелетной миопатии. Лишь у одной пациентки с диагнозом РКМП и трансплантацией сердца в возрасте 45 лет отмечалась слабость мышц нижних конечностей, при этом электромиографическое исследование в возрасте 59 лет выявило умеренную миопатию. Однако эта женщина получала терапию симвастатином и кортикостероидами, которые могли бы объяснить данные результаты. Таким образом, мутации, вызывающие «укорочение» FLNC, связаны с определенным сердечным фенотипом, который включает дилатацию ЛЖ с систолической дисфункцией и миокардиальным фиброзом [12].

Белок FLNC (филамин С, g-филамин) принадлежит семейству филаминов и имеет наиболее высокий уровень экспрессии в скелетных и сердечных мышцах. Основной ролью филамина С в поперечно-полосатых мышцах является стабилизация трехмерной сети актиновых филаментов, а также их соединение с цитоплазматической мембраной. В скелетных мышцах филамин С преимущественно локализован в области Z-диска саркомера, связываясь с такими белками, как миотилин и миоподин; вместе с тем показано взаимодействие FLNC с белками семейства саркогликанов в зоне сарколеммы [13]. Более того, FLNC принимает участие в шаперон-опосредованной аутофагии, являясь мишенью ко-шаперона BAG3, а нормальное функционирование FLNC необходимо для поддержания целостности мышечных клеток [7, 8].

Поскольку филамин С, как и десмин, представлен в основном в скелетной и сердечной мышце, клинические проявления мутаций FLNC весьма схожи с проявлениями мутаций в гене DES, которые тоже могут приводить к формированию внутриклеточных агрегатов. Кроме того, мутации в гене BAG3, также приводящие к формированию внутриклеточных агрегатов в мышечных клетках и известные в связи с развитием миофибриллярных миопатий, недавно были описаны у пациентов с РКМП [14]. Таким образом, развитие РКМП нередко может являться следствием нарушения цитоскелетной структуры кардиомиоцитов, ведущей к формированию внутриклеточных белковых включений. Недавно было доказано, что белковые агрегаты, образующиеся вследствие мутаций в гене DES влияют на наномеханические свойства клеток, тем самым обуславливая формирование рестриктивного фенотипа [15]. И несмотря на то, что детальная молекулярная связь между филамином С и десмином в области Z-диска не расшифрована, оба белка обнаруживались среди внутриклеточных агрегатов миоцитов, что указывает на коагрегацию белков [8, 12].

Таким образом, мутации гена FLNC ассоциированы со всеми типами кардиомиопатий (ГКМП, ДКМП, РКМП, АКМП). Особый интерес в связи с редкостью представляют мутации, связанные с идиопатической РКМП.

Нами представлены два случая РКМП с дебютом во взрослом и детском возрасте, которым с целью этиологической диагностики на первом этапе было выполнено таргетное секвенирование нового поколения с использованием целевой панели из 108 генов, ассоциированных с развитием врожденных заболеваний миокарда, кардиомиопатий и каналопатий, с последующим секвенированием по Сэнгеру, по результатам которого не было обнаружено патогенных и вероятно-патогенных мутаций в генах интереса. После чего обоим пациентам было проведено полноэкзомное секвенирование, что позволило детектировать миссенс замены в гене FLNC.

Клинический случай 1

У пациентки — женщины 64 лет — с 32 лет наблюдалась клиника хронической СН, синкопальные состояния. Проведение повторных эхокардиографий (ЭхоКГ) в динамике демонстрировало картину рестриктивного фенотипа с постепенным прогрессированием диастолической дисфункции, а выполнение холтеровского мониторирования электрокардиограммы — появление, а затем прогрессирование нарушений ритма и проводимости (фибрилляция предсердий, неустойчивые пароксизмы ЖТ, групповая ЖЭС, паузы длительностью более 3 сек за счет субтотальной АВ-блокады), на фоне чего в феврале 2008г. пациентке был имплантирован постоянный электрокардиостимулятор в режиме VVI. В связи с неуклонным прогрессированием заболевания пациентка была включена в лист ожидания трансплантации сердца. С целью исключения вторичной этиологии РКМП в ноябре 2012 г. выполнялась эндомиокардиальная биопсия, по результатам которой данных за миокардит, амилоидоз, гликогенозы получено не было. Также исключалось системное поражение миокарда. При проведении генетического обследования методом секвенирования нового поколения была выявлена мутация в гене FLNC [P2298S] и таким образом подтверждена РКМП в структуре филаминопатии (Рисунок 1).

В апреле 2015 г. пациентке была успешно выполнена трансплантация сердца, а в 2017г. при плановом консультировании пациентка указала на возникновение болей в области кистей и предплечий, болезненность по типу «тоннельных» синдромов, стала отмечать слабость, повышенную утомляемость дистальных отделов рук, что было расценено как возможное проявление скелетной миопатии.

Рисунок 1. Фрагмент сиквенса гена FLNC пробанда и её сына

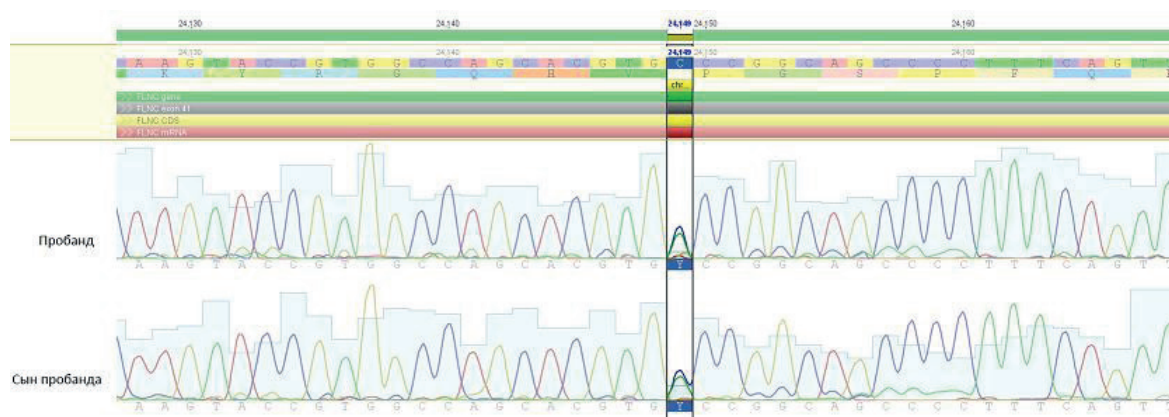
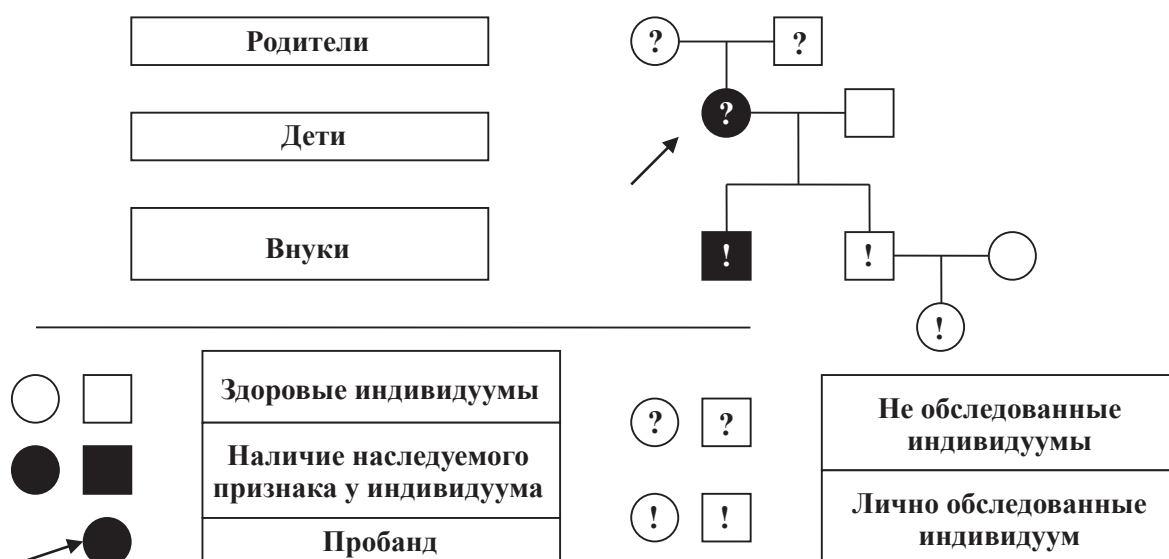


Рисунок 2. Генеалогическое древо



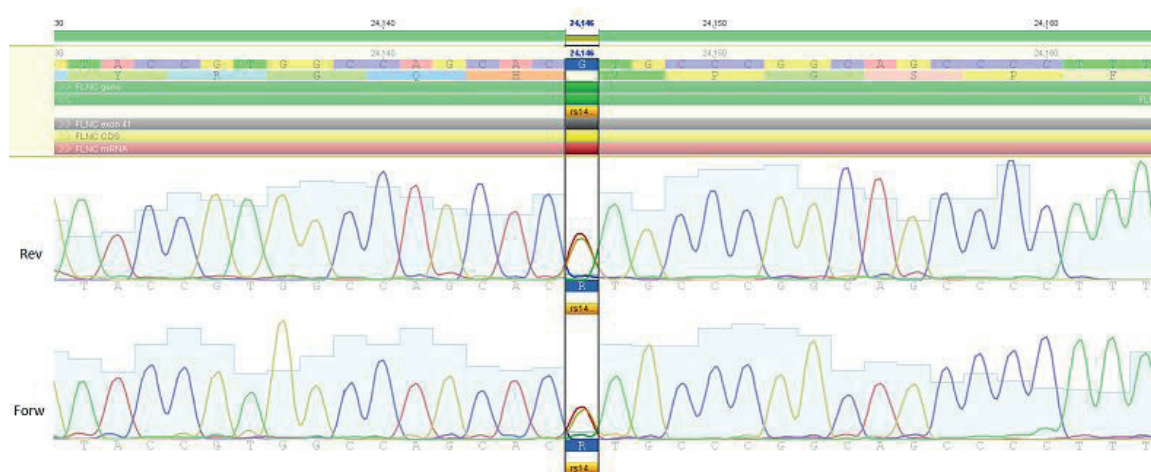
тии. Однако при выполнении миографии данных за наличие миопатии получено не было. С учетом известной генетической причины заболевания и возможным семейным характером наследования, были проведены генетический анализ родословной и генетическое обследование детей и внуков пациентки (Рисунок 2), в результате чего мутация была детектирована у сына (Рисунок 1), единственным проявлением заболевания у которого являлась умеренная дилатация левого предсердия, выявленная в возрасте 40 лет по данным ЭхоКГ.

Клинический случай 2

Пробанд — мальчик 10 лет с РКМП, хронической сердечной недостаточностью 2ФК, сниженной толерантностью к физическим нагрузкам в виде появления одышки при подъеме на 2 этаж, повышенной утомляемости. При рождении диагности-

рована врожденная кривошея, по поводу которой в возрасте 4 лет проведено оперативное вмешательство. Из анамнеза известно, что пресинкопальных и синкопальных состояний не отмечалось, случаев ВС среди лиц молодого возраста в семье не регистрировалось, у матери пробанда имеет место НРС-пароксизмальная форма фибрилляции-трепетания предсердий, тахисистолическая форма, а также врожденная кривошея. Впервые идиопатическое расширение предсердий было выявлено при проведении ЭхоКГ в трехлетнем возрасте. Диагноз РКМП установлен в 7 лет, когда по данным ЭхоКГ наблюдалась двусторонняя атриомегалия (правое предсердие — 45x50мм, левое предсердие — 40x46мм), симметричная гипертрофия миокарда левого желудочка до 7,5мм, трансмитральный кровоток по рестриктивному типу. На момент госпитализации, во время которой была выполнена мо-

Рисунок 3. Фрагмент сиквенса гена FLNC пробанда



лекулярно-генетическая диагностика, на ЭХОКГ и магнитнорезонансной томографии отмечалась выраженная дилатация предсердий: левое предсердие — 49,3 x 42,5 мм, правое предсердие — 52,8 x 46,2 мм, недостаточность трикуспидального клапана 2 степени. Вместе с тем убедительных данных за диффузное поражение и полинейропатию при проведении миографии получено не было.

В результате молекулярно-генетического обследования у пробанда была обнаружена замена в гене FLNC [V2297M], rs1420394583 (Рисунок 3), описанная Tucker NR, et al. (2017), как патогенная и ассоциированная в развитии семейной формы РКМП [7].

Заключение

РКМП является наиболее редкой формой кардиомиопатии (2-5%). Она характеризуется значительной внутрисемейной изменчивостью в степени тяжести заболевания и имеет наихудший прогноз по причине высокого риска возникновения внезапной сердечной смерти и желудочковых аритмий [14, 15], что диктует необходимость проведения трансплантации сердца со средней пятилетней выживаемостью после трансплантации около 65% согласно Hong JA, et al. (2017) [16, 17]. Несмотря на то, что на настоящий момент доля филаминопатий в этиологии РКМП неизвестна ввиду редкости нозологии, по данным ряда авторов до 10% ГКМП и до 5% ДКМП обусловлено вариантами в гене FLNC [7, 8]. При этом большинство описанных мутаций являются укорачивающими и ассоциированы в большей степени с дилатационной и аритмогенной кардиомиопатиями, а большинство точечных мутаций — с гипертрофической и рестриктивной. Проводя ретроспективный анализ, следует отметить, что точечные мутации в гене филамина С ассоциированы

с выраженной диастолической дисфункцией и рестриктивным фенотипом, в связи с чем сопряжены с высоким риском трансплантации сердца. Изучение спектра мутаций в гене филамина С в группе пациентов, являющихся кандидатами на проведение трансплантации сердца, представляет особый интерес для дальнейших исследований.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Благодарности / Acknowledgments

Работа проводилась при поддержке гранта РНФ 14-15-00745П.

Список литературы / References

1. Saryeva OP, Kamenskaya MV. Primary cardiomyopathies. Archive of pathology=Arkiv patologii. 2014; 76(5):78-83. In Russian [Сарыева О.П., Каменская М.В. Первичные кардиомиопатии. Архив патологии. 2014; 76(5):78-83].
2. Kostareva AA, Pervunina TM, Moiseeva OM et al. Genetic variants of cardiomyopathies with neuromuscular phenotype. Russian Heart Failure Journal. 2016; 4(97): 278-286. In Russian [Костарева А.А., Первунина Т.М., Моисеева О.М. и др. Генетические варианты кардиомиопатий с нейромышечным фенотипом. Журнал Сердечная Недостаточность. 2016; 4(97): 278-286].
3. Muchtar E, Blauwet LA, Gertz MA. Restrictive Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. Circulation Research. 2017; 121: 819-837.
4. Mutafyan OA. Cardiomyopathies in children and adolescents. SPb.: Dialect; 2003. p. 217. In Russian [Мутафьян О.А. Кардиомиопатии у детей и подростков. СПб.: Диалект, 2003. с. 271].
5. Kaktursky LV. Primary (idiopathic) cardiomyopathies. Archive of pathology=Arkiv patologii. 2011; 3:18-20. In Russian [Кактурский Л. В. Первичные

(идиопатические) кардиомиопатии. Архив патологии. 2011; 3:18-20].

6. Gudkova AY, Semernin EN, Baranova EI, et al. Structural and functional characteristics of the myocardium of patients with idiopathic restrictive cardiomyopathy. Journal of arrhythmology=Vestnik arithmologii. 2004; 33:34-43. In Russian [Гудкова А.Я., Семернин Е.Н., Баранова Е.И. и др. Структурно-функциональная характеристика миокарда больных идиопатической рестриктивной кардиомиопатией. Вестник аритмологии. 2004; 33: 34-43.]

7. Tucker NR, McLellan MA, Hu D, et al. Novel Mutation in FLNC (Filamin C) Causes Familial Restrictive Cardiomyopathy. Circ Cardiovasc Genet. 2017; 10(6). pii: e001780.

8. Vorgerd M, van der Ven PF, Bruchertseifer V, et al. A mutation in the dimerization domain of filamin c causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy. Am J Hum Genet. 2005 Aug; 77(2):297-304

9. Brodehl A, Ferrier RA, Hamilton SJ et al. Mutation in FLNC are Associated with Familial Restrictive Cardiomyopathy. Hum Mutat. 2016; 37(3):269-79.

10. Valdes-Mas R, Gutierrez-Fernandez A, Gomez J et al. Mutations in Filamin C cause a new form of familial hypertrophic cardiomyopathy. Nat Commun. 2014; 5:5326.

11. Fujita M, Mitsuhashi H, Isogai S, et al. Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant *zacro*. Dev Biol. 2012; 361(1):79-89

12. Konersman CG, Bordini BJ, Scharer G, Lawlor MW, Zangwill S, Southern JF, Amos L, Geddes GC, Kliegman R, Collins MP. BAG3 myofibrillar myopathy presenting with cardiomyopathy. Neuromuscul Disord. 2015; 25(5): 418-422

13. Plodinec M1, Loparic M, Suetterlin R, Herrmann H, Aebi U, Schoenenberger CA. The nanomechanical properties of rat fibroblasts are modulated by interfering with the vimentin intermediate filament system. J Struct Biol. 2011; 174(3):476-84

14. Reinstein E, Gutierrez-Fernandez A, Tzur S et al. Congenital dilated cardiomyopathy caused by biallelic mutations in Filamin C. Eur J Hum Genet. 2016; 24(12):1792-1796.

15. Ortiz-Genga MF, Cuenca S, Dal Ferro M et al. Truncating FLNC Mutations Are Associated With High-Risk Dilated and Arrhythmogenic Cardiomyopathies. J Am Coll Cardiol. 2016; 68(22):2440-2451.

16. Hong JA, Kim MS, Cho MS et al. Clinical features of idiopathic restrictive cardiomyopathy: A retrospective multicenter cohort study over 2 decades. Medicine (Baltimore). 2017; 96(36):e7886.

17. Bublik N, Alvarez JA, Lipshultz SE. Pediatric Cardiomyopathy as a Chronic Disease: A Perspective on Comprehensive Care Programs. Prog Pediatr Cardiol. 2008; 25(1):103-111.

Информация об авторах:

Мельник Олеся Владимировна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории хирургии врожденной и наследственной патологии Института перинатологии и педиатрии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Князева Анастасия Алексеевна, лаборант-исследователь группы клеточной биологии Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Полубояринова Ольга Юрьевна, клинический ординатор по специальности «Кардиология», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Вахрушев Юрий Алексеевич, ассистент научно-исследовательской лаборатории молекулярной кардиологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Фомичева Юлия Васильевна, ассистент научно-исследовательской лаборатории молекулярной кардиологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Ситникова Мария Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник научно-исследовательского отдела сердечной недостаточности Института сердца и сосудов, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Симоненко Мария Андреевна, младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории кардиопульмонального тестирования научно-исследовательского отдела физиологии кровообращения Института сердца и сосудов, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Вершинина Татьяна Леонидовна, заведующая отделением детской кардиологии и медицинской реабилитации, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Козырева Александра Анатольевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной кардиологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Полякова Анжелика Александровна, старший научный сотрудник группы амилоидоза научно-исследовательского отдела инфильтративных заболеваний сердца Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Васичкина Елена Сергеевна, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник научно-исследовательского отдела сердечно-сосудистых заболеваний у детей Института перинатологии и педиатрии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гудкова Александра Яковлевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры Факультетской терапии им. Г. Ф. Ланга ФГБОУВО «ПСПбГМУ им. Акад. И. П. Павлова» Минздрава России; ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной кардиологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Костарева Анна Александровна, кандидат медицинских наук, доцент, директор Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Author information:

Olesya V. Melnik, PhD, Researcher of the research laboratory of surgery of congenital and hereditary pathology of the Institute of Perinatology and Pediatrics, National Almazov North-West Medical Research Centre;

Anastasiya A. Knyazeva, laboratory Assistant-researcher of the Cell Biology Group of the Institute of Molecular Biology and Genetics, National Almazov North-West Medical Research Centre;

Olga Y. Poluboyarinoва, clinical resident in cardiology, National Almazov North-West Medical Research Centre;

Yurii A. Vakhrushev, assistant of the Research Laboratory of Molecular Cardiology and Genetics, National Almazov North-West Medical Research Centre;

Yulia V. Fomicheva, assistant of the Research Laboratory of Molecular Cardiology and Genetics, National Almazov North-West Medical Research Centre;

Mariya Yu. Sitnikova, MD, PhD, prof., Chief Researcher of the Research Department of Heart Failure of the Institute of the Heart and Vessels, National Almazov North-West Medical Research Centre;

Mariya A. Simonenko, Junior Researcher of the Research Laboratory of Cardiopulmonary Testing of the Research Department of the Physiology of the Circulatory Institute of the Heart and Vessels, National Almazov North-West Medical Research Centre;

Tatyana L. Vershinina, Head of the Department of Pediatric Cardiology and Medical Rehabilitation, National Almazov North-West Medical Research Centre;

Alexandra A. Kozyreva, PhD, Senior Researcher of the Research Laboratory of Molecular Cardiology and Genetics, National Almazov North-West Medical Research Centre;

Angelica A. Polyakova, Senior Researcher of the Amyloidosis Group of the Research Department of Infiltrative Heart Disease of the Institute of Molecular Biology and Genetics, National Almazov North-West Medical Research Centre;

Elena S. Vasichkina, MD, PhD, Professor, the main scientific employee of the research department of cardiovascular diseases in children of the Institute of Perinatology and Pediatrics, National Almazov North-West Medical Research Centre;

Alexandra Ya. Gudkova, MD, PhD, Professor of the Department of Faculty Therapy of G. F. Lang, Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University of the Ministry of Health; leading researcher of the research laboratory of molecular cardiology and genetics of the Institute of Molecular Biology and Genetics, National Almazov North-West Medical Research Centre;

Anna A. Kostareva, PhD, Director of the Institute of Molecular Biology and Genetics, National Almazov North-West Medical Research Centre.

ОЦЕНКА ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОГО ОТЕКА У ПАЦИЕНТОВ С ПРОМЕЖУТОЧНОЙ ФУНКЦИЕЙ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА ПОСЛЕ КУПИРОВАНИЯ ОСТРОЙ ДЕКОМПЕНСАЦИИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Скородумова Е.Г., Костенко В.А., Скородумова Е.А.,
Сиверина А.В.

Государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация

Скородумова Елизавета Геннадьевна
ГБУ «СПб НИИ скорой помощи
им. И. И. Джанелидзе»
Будапештская ул., д. 3А, Санкт-Петербург,
Россия, 192242
E-mail: lisavetta91@mail.ru

Статья поступила в редакцию 20.06.2018
и принята к печати 04.08.2018.

Резюме

Актуальность. Согласно рекомендациям европейского общества кардиологов ультразвуковое исследование легких можно использовать для оценки застойных изменений в легких, однако, этот метод имеет пока невысокий класс рекомендации — Ib и уровень доказательности C, что можно расценивать, как следствие его недостаточной изученности.

Цель исследования. Изучить ультразвуковые характеристики легочной ткани у пациентов с промежуточной функцией левого желудочка после купирования острой декомпенсации сердечной недостаточности (ОДСН).

Материалы и методы. Изучены ультразвуковые характеристики ткани легких 71 пациента с сердечной недостаточностью на фоне промежуточной функции левого желудочка после купирования ОДСН. Средний возраст наблюдаемых составил $65,2 \pm 3,6$ лет. Мужчин было 64,3% женщин 25,7%. С использованием ультразвукового метода были изучены В-линии, расстояние между которыми было 3 мм и 7 мм полуколичественным способом, согласно методике E. Pисано 2016 г. Результаты статистически обработаны.

Результаты. У лиц после перенесенной ОДСН остается резидуальный застой в легких, с доминированием интерстициального компонента во всех отделах. Наличие интерстициального отека является прогностическим фактором повышения частоты повторных госпитализаций.

Заключение. Интерстициальный застой в легочной паренхиме рассматривается как фактор ухудшения клинического течения сердечной недостаточности, проявление ее острой декомпенсации. В связи с этим представляет интерес выявление интерстициального легочного отека на начальной стадии, что сможет способствовать предотвращению развернутой клинической картины ОДСН.

Ключевые слова: острая декомпенсация, сердечная недостаточность, УЗИ легких, интерстициальный отек, альвеолярный отек, прогнозирование повторных госпитализаций.

Для цитирования:

Скородумова Е.Г., Костенко В.А., Скородумова Е.А., Сиверина А.В. Оценка интерстициального отека у пациентов с промежуточной функцией левого желудочка после купирования острой декомпенсации сердечной недостаточности. Трансляционная медицина. 2018; 5 (3): 23–27.

ASSESSMENT OF INTERSTITIAL EDEMA IN PATIENTS WITH INTERMEDIATE FUNCTION OF THE LEFT VENTRICLE AFTER RESOLVING OF ACUTE DECOMPENSATION OF HEART FAILURE

Skorodumova E.G., Kostenko V.A., Skorodumova E.A., Siverina A.V.

Saint Petersburg I. I. Dzhaneldze research institute of emergency medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Elizaveta G. Skorodumova
St. Petersburg I. I. Dzhaneldze
Research Institute of Emergency Medicine
Budapeshtskaya str. 3, Saint Petersburg,
Russia, 192242
E-mail: lisavetta91@mail.ru

Received 20 June 2018; accepted 04 August 2018.

Abstract

Background. According to the recommendations of the European Society of Cardiology, ultrasound examination of the lung can be used to assess congestive changes, however, this method has so far a low recommendation class IIb and a level of evidence C, which can be regarded as a consequence of its insufficient knowledge.

The aim of the research. To study ultrasound characteristics of the lung tissue in patients with intermediate left ventricular function after resolving of acute decompensation of heart failure.

Materials and methods. The ultrasound profile of the lung tissue was studied in 71 patients after resolution of acute heart failure decompensation under intermediate left ventricular function. The average age of patients studied was 65.2 ± 3.6 years. 64.3% of them were males, 25.7%—females. Using the ultrasonic method, B-lines were studied, the distance between them being 3 mm and 7 mm in a semi-quantitative manner, according to the method of E. Picano in 2016. The results were statistically processed.

Results. In persons after the acute decompensation of the heart failure residual congestion persisted with interstitial component dominated in both lungs. Appearance of interstitial lung edema to be considered as prognostic factor of re-hospitalizations rate increasing.

Conclusion. Interstitial congestion in the pulmonary parenchyma considered as a factor in the deterioration of the clinical course of heart failure sign of its acute decompensation. In this connection, it is interesting to identify interstitial pulmonary edema at the early stage to prevent real clinical presentation of acute decompensation of the heart failure.

Key words: acute decompensation, heart failure, ultrasound of the lungs, interstitial edema, alveolar edema, prognosis of repeated hospitalizations.

For citation:

Skorodumova E.G., Kostenko V.A., Skorodumova E.A., Siverina A.V. Assessment of interstitial edema in patients with intermediate function of the left ventricle after resolving of acute decompensation of heart failure. *Translyatsionnaya meditsina* = Translational Medicine. 2018; 5 (1): 23–27 pages. (In Russ.)

Список сокращений:

ОДСН — острая декомпенсация сердечной недостаточности

УЗИ — ультразвуковое исследование

ВЗ — В-линии, расстояние между которыми было 3 мм

В7 — В-линии, расстояние между которыми было 7 мм

ПВО — передне-верхний отдел

ПНО — передне-нижний отдел

БВО — Боковой верхний отдел

БНО — Боковой нижний отдел

Известно, наиболее частым поводом для госпитализаций пациентов с явлениями сердечной недостаточности является нарастание симптомов и признаков венозного застоя. Последний подразделяется на системный и легочный. Легочный застой возникает вследствие повышения давления наполнения левом желудочка и часто сочетается с системным застоем. По мнению ряда авторов [1;2], выявление легочного застоя в доклинической стадии позволяет предотвратить развитие острой декомпенсации сердечной недостаточности (ОДСН) [3;4;5]. По рекомендациям европейского общества кардиологов для оценки застойных изменений в легких можно использовать ультразвуковое исследование (УЗИ) легких [4,6,7]. Этот метод имеет пока невысокий класс рекомендации — IIb и уровень доказательности C, но это можно расценивать, как следствие его недостаточной изученности. Производится оценка двух типов так называемых, В-линий: расстояние между которыми было 3 мм (В3) — маркер альвеолярного отека и 7 мм (В7) — маркер интерстициального отека.

Целью нашего исследования явилось изучение ультразвуковых характеристик легочной ткани у пациентов с промежуточной функцией левого желудочка после купирования ОДСН.

Материалы и методы: изучен ультразвуковой профиль легких 71 пациента, после купирования

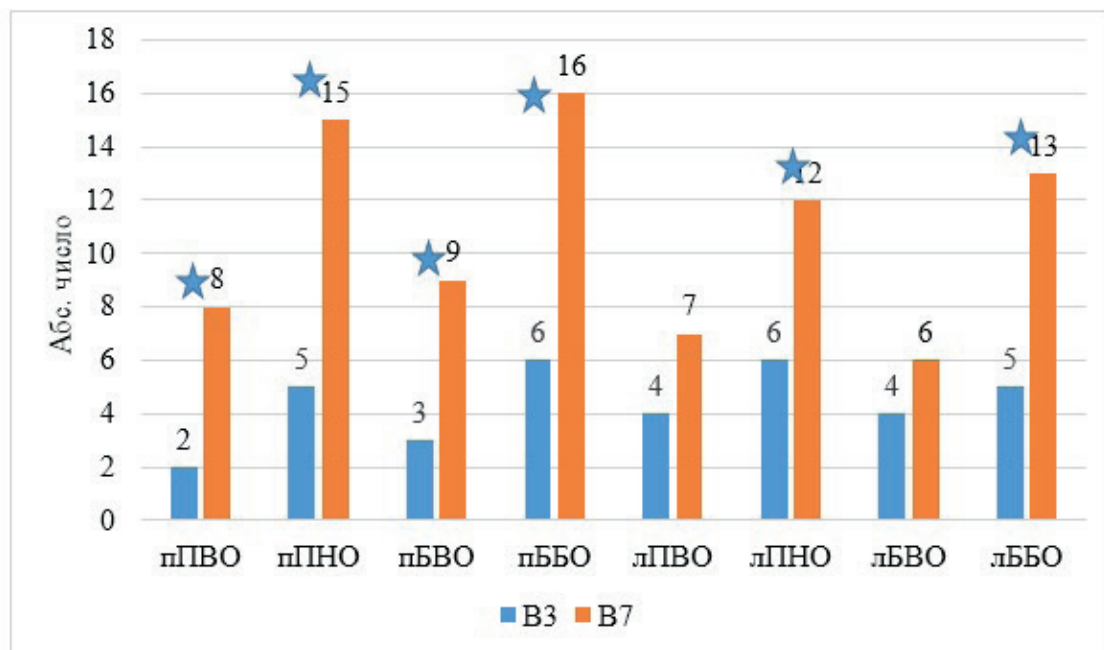
ОДСН. Средний возраст изучаемой выборки $65,2 \pm 3,6$ лет. Мужчин 64,3% женщин 25,7%. С использованием ультразвукового метода были изучены В-линии, расстояние между которыми было 3 мм (В3) и 7 мм (В7) полуколичественным способом, согласно методике Е. Picanò 2016 г. Результаты статистически обработаны.

Результаты: Обращало на себя внимание доминирование у исследуемой когорты лиц В7 линий, характерных, по данным литературы, для интерстициального отека легочной паренхимы. В3 линии встречались в малом количестве. Результаты представлены на рисунке 1.

Из рисунка 1 видно, что у лиц после перенесенной ОДСН остается некоторый застой в легких, классифицируемый как небольшой, при этом, обращало на себя внимание доминирование интерстициального компонента во всех отделах обоих легких.

После была оценена прогностическая ценность изучаемого параметра. Известно, что 25 человек (35,2% выборки) повторно поступили в стационар с явлениями сердечной недостаточности. Все пациенты были поделены на 2 подгруппы с минимальным застоем (6-15 В-линий) и тех, у кого застоя не было (<5 В-линий). Результаты представлены на рисунке 2

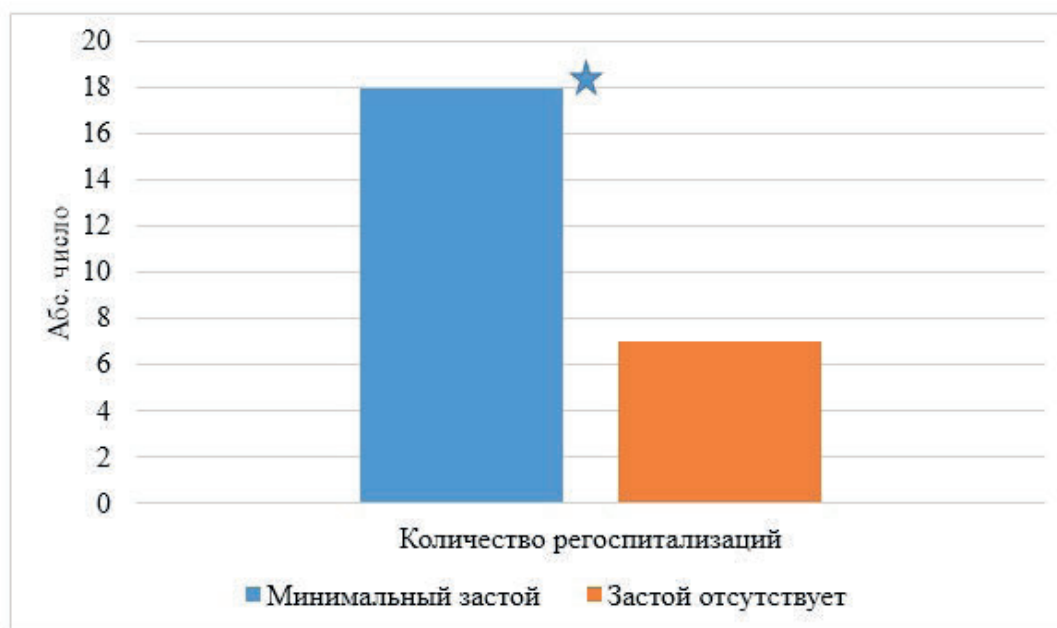
Рисунок 1. Распределение В-линий по отделам



Примечание: ПВО — передне-верхний отдел
ПНО — передне-нижний отдел
БВО — Боковой верхний отдел
БНО — Боковой нижний отдел

п — справа
л — слева
★ — Различия между В3 и В7 линиями достоверны, $p < 0,05$ между собой

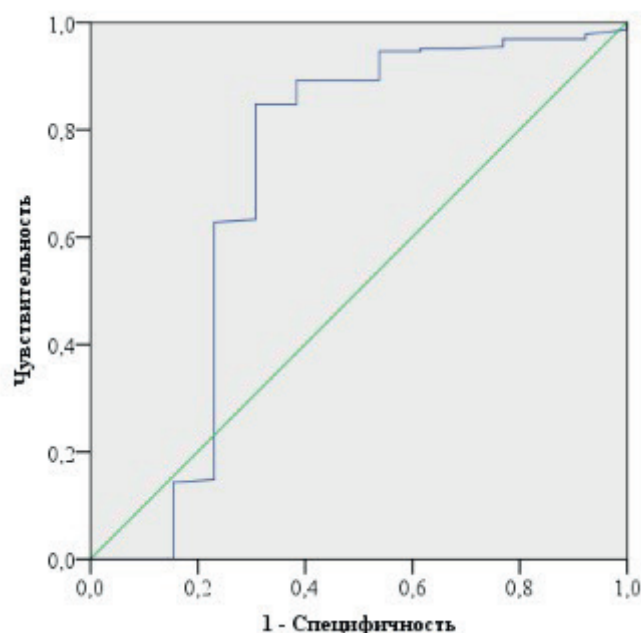
Рисунок 2. Взаимосвязь В-линий с частотой повторных госпитализаций



Примечание:

★ — Различия достоверны, $p < 0,05$ между собой

Рисунок 3. ROC-кривая для проверки полученных данных



Таким образом, выявлено, что в группе пациентов с минимальным застоем в легких уровень регоспитализаций был достоверно выше, чем в выборке, не имеющей застойных изменений по данным УЗИ легких. Данное положение было проверено с использованием метода ROC-анализа.

На рисунке 3 показана ROC-кривая для оценки полученной взаимосвязи. Так, площадь под кривой

составила 0,706, что соответствует оценке «хорошо» на экспертной шкале AuROC. Чувствительность — 78,6%, специфичность — 89,7%.

Выводы:

1. Ультразвуковой синдром отека легочной ткани у пациентов с промежуточной функцией ЛЖ после купирования ОДСН характеризуется преобладанием интерстициального компонента.

2. Определяемый при помощи УЗИ резидуальный интерстициальный венозный застой в легочной паренхиме может рассматриваться как прогностический фактор повторной госпитализации.

3. Согласно проверке вышеуказанных заключений методом ROC-кривой, полученные результаты имеют высокую чувствительность и специфичность.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

1. Grishin AM, Alekhin MN, Sidorenko BA. Experience in using ultrasound to detect extravascular fluid in the lungs in patients with heart failure. Ter. Archive. 2010; 82(4): 35-39. In Russian. [Гришин А.М., Алехин М.Н., Сидоренко Б.А. Опыт использования ультразвукового исследования для выявления внесосудистой жидкости в легких у больных с сердечной недостаточностью. Тер. Архив. 2010; 82(4): 35-39].

2. Lyakhin RE, Schegolev AV, Zhirnova EA, et al. Characteristics of ultrasound signs in the diagnosis of the volume and nature of lung damage. Bulletin of Intensive Therapy. 2016; 4:5-11. In Russian. [Ляхин Р.Е., Щеголев А.В., Жирнова Е.А., и др. Характеристика ультразвуковых признаков в диагностике объема и характера поражения легких. Вестник интенсивной терапии. 2016; 4:5-11].

3. Skorodumova EG, Kostenko VA, Skorodumova EA, et al. Problems and Specificity of Diagnosis of Acute Heart Failure in Patients with Left Ventricular Edge Function at Prehospital Stage. Emergency medical care. 2018; 1: 16-19. In Russian. [Скородумова Е.Г., Костенко В.А., Скородумова Е.А., и др. Проблемы и специфика диагностики острой сердечной недостаточности у пациентов с пограничной функцией левого желудочка на догоспитальном этапе. Скорая медицинская помощь. 2018; 1:16-19].

4. Cabello FE, Solovyov AE, Safarova AF, et al. Evaluation of pulmonary congestion in heart failure: the technique of examination, the clinical prognostic value of ultrasound lung examination. Difficult patient. 2017; 15(6-7): 19-23. In Russian. [Кабельо Ф.Э., Соловьева А.Е., Сафарова А.Ф., и др. Оценка легочного застоя при сердечной недостаточности: методика обследования, клиническое прогностическое значение ультразвукового исследования легких. Трудный пациент. 2017; 15(6-7): 19-23].

5. Skorodumova EG, Kostenko VA, Skorodumova EA, et al. The red distribution width is a potentially new marker of acute decompensation of heart failure Cardiology: news, opinions, training. 2017; 1: 40-43. In Russian. [Скородумова Е.Г., Костенко В.А., Скородумова Е.А., и др. Ширина распределения эритроцитов — потенциально новый маркер острой декомпенсации сердечной недостаточности. Кардиология: новости, мнения, обучение. 2017; 1: 40-43].

6. McDonagh T, Gardner RS, Clark AL, et al. Oxford Textbook of Heart Failure. Oxford, 2012. p. 524.

7. Mann DL, Felker GM. Heart Failure: a companion to Braunwald's Diseases, 3-rd edition. Elsevier, 2016. p. 762.

Информация об авторах:

Скородумова Елизавета Геннадьевна, младший научный сотрудник, отдел неотложной кардиологии и ревматологии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе»;

Костенко Виктор Авенирович, к.м.н., руководитель отдела неотложной кардиологии и ревматологии, ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе»;

Скородумова Елена Андреевна, д.м.н., старший научный сотрудник, отдел неотложной кардиологии и ревматологии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе»;

Сиверина Анна Викторовна, врач-кардиолог, отдел неотложной кардиологии и ревматологии ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе»;

Author information:

Elizaveta G. Skorodumova, MD, Junior Researcher, Department of Emergency Cardiology and Rheumatology, St. Petersburg I.I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency medicine;

Viktor A. Kostenko, MD, PhD, head of the department of emergency cardiology and rheumatology, I.I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency medicine;

Elena A. Skorodumova, MD, PhD, Senior Researcher, Department of Emergency Cardiology and Rheumatology, I.I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency medicine;

Anna V. Siverina, MD, cardiologist, Department of Emergency Cardiology and Rheumatology, I.I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency medicine.

СООТНОШЕНИЕ СВОБОДНЫХ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ АМИОДАРОН- ИНДУЦИРОВАННЫМ ТИРЕОТОКСИКОЗОМ 1 И 2 ТИПОВ

Улупова Е.О., Богданова Г.А., Каронова Т.Л., Гринева Е.Н.

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

Контактная информация:
Гринева Елена Николаевна
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России
ул. Пархоменко, д. 15 лит. Б, Санкт-
Петербург, Россия, 194156.
E-mail: grineva_e@mail.ru

Статья поступила в редакцию 04.07.2018
и принята к печати 01.08.2018..

Резюме

Дифференциальный диагноз между амиодарон-индуцированным тиреотоксикозом 1 типа (АМИТ1) и 2 типа (АМИТ2) является серьезной клинической проблемой. Существующие сегодня диагностические тесты часто оказываются неспособными дифференцировать эти два типа тиреотоксического синдрома. В ряде исследований было обнаружено, что уровень Т4 и соотношение тиреоидных гормонов больных деструктивным тиреоидитом и болезнью Грейвса существенно отличаются. Так сывороточная концентрация Т4, была значимо выше, а соотношение Т3/Т4 ниже у больных с деструктивным тиреоидом по сравнению с этими показателями при болезни Грейвса. Поскольку известно, что АМИТ1 развивается у пациентов с латентной болезнью Грейвса, а АМИТ2 является деструктивным тиреоидитом, целью нашего исследования было оценить уровень свТ4 в сыворотке и соотношение св.Т4/св.Т3 при АМИТ1 и АМИТ2 в качестве дополнительного диагностического теста для дифференциальной диагностики этих типов тиреотоксикоза.

В исследование включили 45 пациентов с тиреотоксикозом (33 с АМИТ1 и 12 АМИТ2). Диагноз тиреотоксикоза (АМИТ1 или АМИТ2) был установлен на основе клинических данных, результатов цветного доплеровского сканирования (ЦД), наличия аутоантител к ТТГ-рец., а также эффекта от лечения. Не было выявлено различий в уровнях свТ3 у пациентов с АМИТ1 и АМИТ2, тогда как значения свТ4 ($36,2 \pm 19,1$ и $17,8 \pm 3,7$ пмоль/л соответственно, $p = 0,002$) и соотношение св.Т4 /св.Т3 ($6,1 \pm 5,7$ и $2,7 \pm 0,8$ соответственно, $p = 0,048$) были значительно выше у пациентов с АМИТ2, чем у пациентов с АМИТ1. Более того, 75% пациентов с АМИТ1 имели значение соотношения св.Т4 /св.Т3 $< 3,10$, тогда как у 75% пациентов с АМИТ2 этот показатель был более 3,65. Значение соотношения св.Т4/св.Т3 может быть использовано в качестве дополнительного теста в дифференциальной диагностике АМИТ1 и АМИТ2.

Ключевые слова: амиодарон-индуцированный тиреотоксикоз, св.Т3, св.Т4, соотношение св.Т4/Т3

Для цитирования:

Улупова Е.О., Богданова Г.А., Каронова Т.Л., Гринева Е.Н. Соотношение свободных тиреоидных гормонов в сыворотке крови больных амиодарон-индуцированным тиреотоксикозом 1 и 2 типов. Трансляционная медицина. 2018; 5 (3): 28–35.

FREE THYROID HORMONS RATION IN PATIENTS WITH AMIODARON-INDUCED THYROTOXICOSIS TYPE 1 AND TYPE 2

Ulupova E.O., Bogdanova G.A., Karonova T.L., Grineva E.N.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Elena N. Grineva

Almazov National Medical Research Centre
Parkhomenko str. 15-B, Saint Petersburg,
Russia, 194156

E-mail: grineva_e@mail.ru

Received 04 July 2018; accepted 01 August 2018.

Abstract

Differentiation between amiodarone-induced thyrotoxicosis type 1 (AmIT1) and type 2 (AmIT2) is a diagnostic challenge. The current diagnostic tests are often unable to differentiate these two types of thyrotoxic syndrome. Several studies had shown that the serum T4 level and T3/T4 ratio are significantly different in patients with destructive thyroiditis, and those with Graves' disease. These studies showed that the serum T4 concentration is significantly higher, and the T3/T4 ratio is significantly lower in patients with destructive forms of thyroiditis compared to their values in Graves' disease. Since AmIT1 is known to develop in patients with latent Graves' disease, and AmIT2 is a destructive thyroiditis, the purpose of our study was to evaluate the serum FT4 level and FT4/FT3 ratio in AmIT1 and AmIT2 as an additional diagnostic test for differentiating these types of thyrotoxicosis. 45 patients with thyrotoxicosis (33 with AmIT1 and 12 AmIT2) were included in the study. The diagnosis of thyrotoxicosis type (AmIT1 or AmIT2) was established on the basis of clinical data, color flow Doppler sonography (CFDS), the presence of TSH receptor autoantibody in patients with AmIT1, as well as the effect of treatment. There was no difference in FT3 levels in patients with AmIT1 and AmIT2, while the FT4 values were significantly higher in patients with AmIT2 ($36,2 \pm 19,1$ mmol/L) than in those with AmIT1 ($17,8 \pm 3,7$ mmol/L, $p = 0,002$). Also, a difference in the FT4/FT3 ratio was found between AmIT1 ($2,7 \pm 0,8$) and AmIT2 ($6,1 \pm 5,7$, $p = 0,048$). Moreover, 75% of patients with AmIT1 had FT4/FT3 ratio $< 3,10$, while 75% of patients with AmIT2 had FT4/FT3 ratio $> 3,65$. The FT4/FT3 ratio can be used as an additional test in the differential diagnosis AmIT1 and AmIT2.

Key words: amiodarone-induced thyrotoxicosis, FT3, FT4, FT4/FT3 ratio

For citation:

Ulupova E.O., Bogdanova G.A., Karonova T.L., Grineva E.N. Free thyroid hormones ration in patients with amiodaron-induced thyrotoxicosis type 1 and type 2. *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*. 2018; 5 (1): 28–35. (In Russ.)

Амиодарон — широко используемый антиаритмический препарат, представляющий собой богатое йодом производное бензофурана. Каждая молекула амиодарона содержит 37,5% йода. Ежедневно в циркуляторное русло с 1 таблеткой поступает 6 мг свободного йода, в то время как суточная потребность в йоде примерно 100–200 мкг/сут. [1, 2, 3]. Период полувыведения амиодарона составляет 20–100 дней.

Более того, из-за липофильности препарата, способствующей его накоплению в жировой ткани, повышенный уровень йода в циркуляции сохраняется не менее 6 месяцев после его отмены [1, 4].

Влияние амиодарона на щитовидную железу (ЩЖ) обеспечивается как наличием в составе его молекулы большого количества йода, так и структурной схожестью его молекулы с молекулой ти-

роксина. В результате, прием амиодарона в течение первых 3 месяцев сопровождается изменением лабораторных показателей (Т3, Т4, ТТГ) без нарушения функции ЩЖ, а у 15–20% больных лечение амиодароном может приводить к развитию гипотиреоза или тиреотоксикоза [1, 2, 5, 6, 7].

В отличие от амиодарон-индуцированного гипотиреоза, диагностика и лечение амиодарон-индуцированного тиреотоксикоза (АмИТ) сопряжена с большими трудностями.

Различают 2 типа АмИТ. АмИТ 1 типа развивается в результате избыточного неконтролируемого синтеза тиреоидных гормонов из-за поступления больших количеств йода в ЩЖ больных, обычно уже имеющих латентную болезнь Грейвса или многоузловой зоб. АмИТ 2 типа или деструктивный тиреоидит — следствие ассоциированного с йодом и/или амиодароном воспаления и деструкции ЩЖ и поступления в циркуляцию уже синтезированных в ЩЖ тиреоидных гормонов. Выделяют также смешанный (вызванный сочетанием деструкции фолликулярного эпителия ЩЖ с гиперпродукцией тиреоидных гормонов) тип АмИТ [8].

Диагностика связанного с избыточным поступлением йода автономного тиреотоксикоза не вызывает проблем, однако отличить АмИТ у больного с предшествующей болезнью Грейвса от деструктивного тиреоидита в отсутствие явных клинических признаков, таких как офтальмопатия (пре-тибиальная микседема, акропатия), чрезвычайно сложно. Никакие другие клинические симптомы, а также используемые в настоящее время диагностические тесты (24-часовой захват радиоактивного йода, определение антипероксидазных антител и сывороточной концентрации интерлейкина-6) не обладают высокой точностью. Применение сканирования ЩЖ с ^{99m}Tc -sestamibi (MIBI) пока еще мало изучено [9]. Наиболее подходящими тестами считают оценку кровотока в ЩЖ с помощью цветного доплеровского картирования (ЦДК) и определение антител к рецептору ТТГ (атТТГ-рец.), однако даже они не всегда позволяют различить 1 и 2 подтипы АмИТ [3, 10, 11, 12]. Между тем, дифференциальная диагностика 1 и 2 типов АмИТ крайне необходима, так как от её результатов зависит тактика ведения пациентов [13, 14]. В этой связи поиск новых диагностических тестов, позволяющих дифференцировать типы АмИТ, является актуальным.

Как известно, при болезни Грейвса, ЩЖ вырабатывает избыточное количество как тироксина (Т4), так и трийодтиронина (Т3), в то время как в случае деструктивного тиреоидита в системном кровотоке преобладает Т4. В ряде исследований показано, что соотношение Т3 и Т4 достоверно отличается у боль-

ных болезнью Грейвса и деструктивными вариантами тиреоидита и может быть использовано для дифференциальной диагностики этих двух причин тиреотоксикоза [15, 16, 17].

Учитывая, что механизм развития тиреотоксикоза при АмИТ 1 типа аналогичен таковому при болезни Грейвса, а при АмИТ 2 типа — деструктивному тиреоидиту, в настоящей работе мы изучили уровни свободных тиреоидных гормонов (св. Т4 и св. Т3) в сыворотке крови больных с известными типами АмИТ и их соотношение (св.Т4/св.Т3) с целью возможного использования последнего в дифференциальной диагностике АмИТ 1 и 2 типов.

Материалы и методы

В исследование включили 45 больных АмИТ, находившихся на лечении в отделениях эндокринологии НМИЦ им. В.А.Алмазова.

Дизайн исследования: наблюдательное ретроспективное

Критерии включения:

- мужчины и женщины в возрасте от 20 до 85 лет
- наличие явного тиреотоксикоза
- установленный тип АмИТ (для АмИТ 1 типа: наличие атТТГ-рец. в диагностическом титре, кровотока по ЦДК II-III и эффект от лечения тиреостатиками; для АмИТ 2 типа: отсутствие атТТГ-рец., кровотока по ЦДК 0-I, эффект от лечения глюкокортикоидами)

— определение св. Т4 и св. Т3 до начала лечения тиреотоксикоза

Критерии невключения:

- смешанный или неустановленный вариант АмИТ

— автономный АмИТ

Критерии исключения:

- определение свободных тиреоидных гормонов на фоне лечения
- использование другого, отличного от указанного, метода исследования тиреоидных гормонов
- одновременное определение свободных тиреоидных гормонов
- наличие узлов в ЩЖ, размер которых превышает 1 см
- беременность и кормление грудью
- употребление наркотиков и другие виды токсикомании

Исследование было одобрено Этическим комитетом НМИЦ им. В.А. Алмазова. Все больные подписали информированное согласие до включения в исследование.

Дизайн исследования: ретроспективное наблюдательное.

Таблица 1. Основные клинические характеристики, тесты, оценивающие функцию щитовидной железы, и данные доплерографии у больных амиодарон-индуцированным тиреотоксикозом 1 (АМИТ 1) и 2 (АМИТ 2) типов

Параметр	АМИТ 1 типа	АМИТ 2 типа	P
Число больных	12	33	
Возраст, лет	59,8±13,8 [28-83]	61,2±9,4 [42-82]	>0,05
Ж/М (п, %)	6/6 (50/50%)	10/23 (30,3/69,7%)	>0,05
Тип кровотока по данным ЦДК	II — III	0-I	
Антитела к ТТГ-рец.	+	-	
св.Т4 пмоль/л	17,8±3,7 [13,6-26,8]	36,2±19,1 [13,1-34,9]	0,002
св.Т3 пмоль/л	6,9±1,7 [1,57-32,1]	7,8±5,8 [1,57-32,1]	>0,05
св.Т4/св.Т3 соотношение	2,7±0,8 [1,63-4,32]	6,1±5,7 [2,34-32,85]	0,048
Эффективное лечение	Тионамиды	Преднизолон	

Свободный тироксин (св. Т4) определяли методом ИФА (AxSYM) (нормальные значения 9,14-23,81 пмоль/л), свободный трийодтиронин (св. Т3) — методом ИФА (AxSYM) (нормальные значения 2,23-5,35 пмоль/л). Антитела к рецептору ТТГ (атТТГ-рец.) определяли конкурентным иммуноферментным анализом на аппарате Alegria (Orgentec) (нормальные значения менее 1,0 МЕ/л). Ультразвуковое исследование ЩЖ с оценкой паренхиматозного кровотока методом цветного доплеровского картирования (ЦДК) выполняли на аппарате ACUSON ASPEN линейным датчиком 5-10 МГц в стандартных позициях. Результаты оценивали согласно рекомендациям Bogazzi F. и соавторов, а именно: 0 — отсутствие кровотока в паренхиме ЩЖ, I- слабо выраженный, нечеткий, неоднородный паренхиматозный кровоток, II — диффузный гомогенный повышенный паренхиматозный кровоток, III — значительно увеличенный кровоток [18]. При этом 0 и I типы паренхиматозного кровотока считали присущими АМИТ 2 типа, II и III — АМИТ 1 типа.

Для проведения статистического анализа использовалась программа SPSS 15.0. 2 случая с крайне высокими значениями св.Т4/св.Т3 были идентифицированы как выбросы. В соответствии с критерием Шапиро-Уилка распределение св.Т4 /св.Т3 для каждого типа заболевания не отличалось существенно от нормального распределения. Это позволило для сравнения средних значений применять однофакторный дисперсионный анализ. Однофакторный дисперсионный и дискриминантный анализ.

Результаты исследования

Среди 45 включенных в исследование больных АМИТ было 29 (64,4%) мужчин и 16 (35,6%) женщин в возрасте от 28 до 83 (ср. возраст 60,7±8,6) лет. АМИТ1 установили 12 больным (6 мужчинам и 6 женщинам), в возрасте от 28 до 83 (59,8±13,8) лет. Все больные этой группы имели клинические симптомы тиреотоксикоза, 4 человека — инфильтративную офтальмопатию. Диффузное увеличение ЩЖ выявили у 8 из 12 больных. У всех больных (100 %) были обнаружены атТТГ-рец. У большинства больных (9 из 12) при ЦДК обнаружили III тип кровотока в ЩЖ, в 3 случаях кровотоков соответствовал II типу. Лечение тионамидами оказалось эффективным во всех 12 случаях (таб.1).

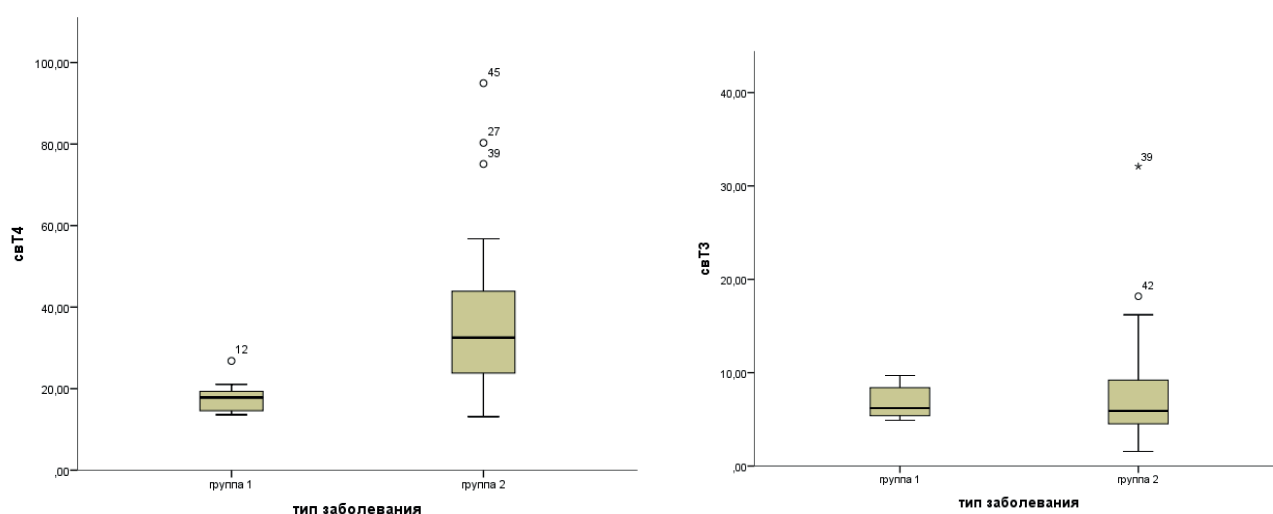
АМИТ2 диагностировали у 33 больных: у 9 человек — на основании отсутствия (тип 0) паренхиматозного кровотока, у 24 — слабо выраженно-го, нечеткого (тип I) паренхиматозного кровотока. Среди включенных в группу было 23 мужчины и 11 женщин в возрасте от 44 до 82 (ср.возраст 61,2±9,4) лет. Все больные имели клинические симптомы тиреотоксикоза, ЩЖ была увеличена у 13 из 33 больных, в остальных 20 случаях размеры ЩЖ не превышали нормальных значений. АтТТГ-рец. отсутствовали у всех включенных в эту группу больных. Монотерапия глюкокортикоидами (преднизолоном) была эффективной у всех больных АМИТ2 (таб.1).

Средний возраст больных в группе АМИТ1 (59,8±13,8) не отличался от такового в группе АМИТ2 (61,2±9,4), но в группе больных АМИТ2

Таблица 2. Перцентили значений соотношения св.Т4 /св.Т3 при АмИТ1 и АмИТ2

Параметры	АмИТ1	АмИТ2
Количество	12	33
Количество пропущенных данных	0	0
Перцентиль 25	2,168	3,650
50	2,705	4,253
75	3,100	5,298

Рисунок 1. Показатели значений св. Т4 и св.Т3 у больных с различными типа амиодарон-индуцированного тиреотоксикоза. Группа 1 — АмИТ1, группа 2 — АмИТ2



число мужчин было несколько больше (69,7%), чем в группе АмИТ1 (50%) ($p > 0,05$). Клинические симптомы тиреотоксикоза оказались схожими в сравниваемых группах, за исключением размеров ЩЖ: средний объем ЩЖ в группе больных АмИТ1 ($41,8 \pm 29,6$ мл) был больше, чем в группе больных АмИТ2 ($21,0 \pm 9,1$ мл) ($p = 0,02$).

Средние значения сывороточной концентрации св.Т3 в группе больных АмИТ1 ($6,9 \pm 1,7$ пмоль/л) не отличались от таковых у больных АмИТ2 ($7,8 \pm 5,8$ пмоль/л), в то время как были выявлены различия в средних значениях св.Т4 ($17,8 \pm 3,7$ и $36,2 \pm 19,1$ пмоль/л соответственно) ($p = 0,002$) (рис. 1).

Соотношение св.Т4 /св.Т3 у больных АмИТ1 находилось в диапазоне от 1,63 до 4,32 (ср. $2,7 \pm 0,8$). В группе АмИТ2 соотношение св.Т4 /св.Т3 варьировало от 2,34 до 32,85 и в среднем ($6,1 \pm 5,7$) было выше, чем в первой группе ($p = 0,048$).

В соответствии с критерием Шапиро-Уилка распределение св.Т4/св.Т3 для каждого типа заболевания не отличалось существенно от нормального распределения. Это позволило для сравнения средних значений применить однофакторный дис-

персионный анализ, который показал, что разница в средних значениях соотношения св.Т4 /св.Т3 при 1 и 2 типах АмИТ не случайна ($p = 0,01$) (рис.2).

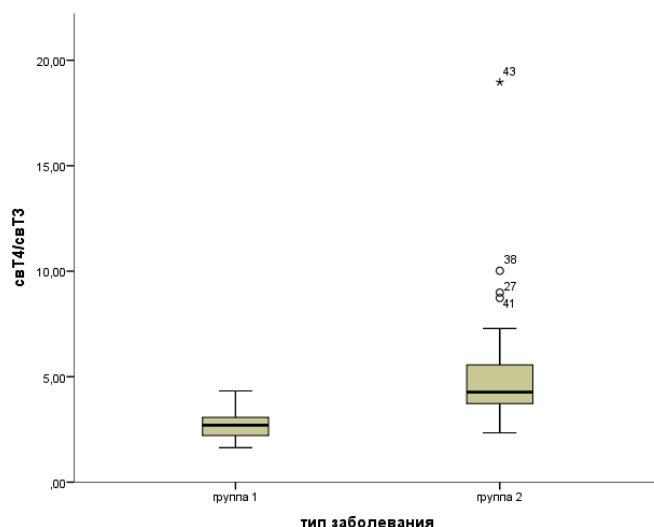
У 75% больных АмИТ1 соотношение св.Т4 /св.Т3 оказалось $< 3,10$, в то время как 75% больных АмИТ2 соотношение св.Т4/св.Т3 — $> 3,65$ (табл.2). Применение дискриминантного анализа, где в качестве дискриминирующих параметров были взяты паренхиматозный кровоток при ЦДК и соотношение св.Т4 /св.Т3 дали 100% результат в сравнении с классификацией больных по параметрам атТТГ-рец. и параметрами паренхиматозного кровотока при ЦДК.

Обсуждение результатов

Дифференциальный диагноз 1 и 2 типов АмИТ представляет серьезную диагностическую проблему, между тем, правильный диагноз — ключ к быстрому устранению тиреотоксикоза, который существенно ухудшает жизненный прогноз.

Дизайн настоящего исследования — ретроспективное, наблюдательное; включение больных в группы 1 или 2 типом АмИТ выполняли не только

Рисунок 2. Показатели соотношения св.Т4/св.Т3 у больных с амиодарон-индуцированного тиреотоксикоза 1 и 2 типов. Группа 1 — АмИТ1, группа 2 — АмИТ2.



по результатам наличия или отсутствия атТТГ-рец. и данным ЦДК ЩЖ, но на основании положительного эффекта от лечения (тионамидами — при АмИТ1 и преднизолоном — при АмИТ2). Такие критерии позволили сократить до минимума ошибки в определении типа АмИТ. В результате из 45 больных в группе АмИТ 1 оказалось 12 человек, а в группе АмИТ 2 — 33 человека. Значительное преобладание больных АмИТ2 в исследуемой популяции согласуется с данными F. Bogazzi и соавторов [19], которые уточняют, что соотношение двух типов АмИТ изменилось в последние годы не за счет уменьшения числа больных АмИТ1 (этот показатель остался неизменным), а за счет абсолютного возрастания больных АмИТ2. Авторы объясняют этот феномен тем, что в последние годы перед назначением амиодарона больных обычно обследуют. В результате обследования выявляют патологию ЩЖ (латентную форму болезни Грейвса или узловой зоб), которая может спровоцировать развитие АмИТ1, но не АмИТ2. АмИТ2 — деструктивный тиреоидит — развивается в неизменной ЩЖ и не может быть выявлен до назначения амиодарона.

В нашем исследовании средний возраст больных сравниваемых групп не отличался и составил $59,8 \pm 13,8$ в группе больных АмИТ1 и $61,2 \pm 9,4$ — в группе АмИТ2. Не было обнаружено различий в клинических симптомах тиреотоксикоза при 1 и 2 типах АмИТ, кроме того, что в группе АмИТ2 было значимо больше мужчин (69%) по сравнению с группой АмИТ1 (50%), а больных АмИТ 1 имели больший объем ЩЖ ($41,8 \pm 29,6$ мл) по сравнению с таковым больных АмИТ2 ($21,0 \pm 9,1$ мл). Полученные нами данные совпадают с результатами других исследователей [1, 3, 20, 21, 22].

Основной целью настоящего исследования было изучение возможности использования оценки сывороточной концентрации свободных тиреоидных гормонов (св.Т4 и св.Т3), а также их соотношения (св.Т4/св.Т3) для дифференциальной диагностики АмИТ 1 и 2 типов.

В основе этого предположения лежит тот факт, что у больных тиреотоксикозом степень повышения циркулирующих в крови тиреоидных гормонов, зависит, в том числе, от его этиологии [23, 24, 25]. Так при тиреотоксикозе, вызванном болезнью Грейвса, обнаруживают относительно более высокий уровень Т3, чем Т4. Это явление связывают со стимуляцией атТТГ-рец. экспрессии в ЩЖ дейодиназы II типа (D2), которая, в свою очередь, обеспечивает интратироидальное образование из Т4 значительных количеств Т3 и его высокую концентрацию в системной циркуляции [26, 27].

При деструктивном тиреоидите — основной гормон в системной циркуляции — Т4, — образуется в результате утечки из поврежденных фолликулов ЩЖ. Повышение в крови Т3 менее выражено из-за уменьшения экспрессии дейодиназ (D1 и D2), как в ЩЖ, так и в периферических тканях [28].

В ряде исследований показано, что уровни тиреоидных гормонов (св.Т4, св.Т3) и их соотношение (св.Т3/св.Т4) значимо отличаются у больных болезнью Грейвса и деструктивными вариантами тиреоидитов (тиреоидит де Кервена, безболевого тиреоидит). Более того, соотношение св.Т3/св.Т4 авторами этих исследований предлагается в качестве простого и быстрого теста дифференциальной диагностики двух видов тиреотоксического синдрома [16, 17, 23, 29, 30].

В литературе представлены единичные исследований, в которых изучена сывороточная концентрация тиреоидных гормонов, а также их соотношение у больных АМИТ 1 (развивающегося по типу болезни Грейвса) и 2 типов (развивающегося по типу деструктивного тиреоидита) [3, 11, 12, 19].

Так в одной из первых исследований, которое было опубликовано в 2002, S. E. M. Eaton и соавторы не нашли значимых различий в уровнях Т4 и Т3 в группах больных АМИТ1 и АМИТ2 типов, однако они подчеркнули наличие четкой тенденции к более высоким значениям Т4 у больных АМИТ2 (74,8 (25,9–111,9) пмоль/л) по сравнению с таковыми при АМИТ1 (52,1 (33,1–110,3) пмоль/л) [12].

В следующем году появилась работа F. Bogazzi и коллег, в которой они показали, что средняя сывороточная концентрация св. Т4 была значимо выше у больных АМИТ2 (37±15 пг/мл) по сравнению с его уровнем при АМИТ1 (среднее значение 26±15 пг/мл) ($p < 0,02$), в тоже время ими не была обнаружена разница у уровнях Т3 [11]. Более того, в 2007 году F. Bogazzi и коллеги опубликовали еще одну работу, представившую данные не только по уровню тиреоидных гормонов, но и их соотношению (св.Т4/св.Т3) у 215 больных 1 и 2 типами АМИТ. Оказалось, что средние значения св.Т3 не отличались у больных 1 и 2 типами АМИТ, в то время как они обнаружили различия в средних концентрациях св. Т4 при АМИТ1 (36,50±19,13 пмоль/л) и АМИТ 2 (44,85±19,67 пмоль/л). Соотношение св.Т4/св.Т3 при АМИТ1 составило 3,26±1,50, в то время как у больных АМИТ2 оно оказалось выше 4,01±1,38 ($p < 0,0001$) [19].

Результаты нашего исследования подобны данным, полученным F. Bogazzi и соавторами. Нами была обнаружена разница в сывороточной концентрации св.Т4 у больных АМИТ1 17,8±3,7 и АМИТ2 36,2±19,1 пМоль/л, в то время как уровни св.Т3 достоверно не отличались. Различия были получены и в соотношении св.Т4/св.Т3 у больных АМИТ1 (2,7±0,8) и АМИТ2 (6,1±5,7), причем, как показал однофакторный дисперсионный анализ, разница в соотношении не была случайной.

Заключение и выводы

1. Среди больных АМИТ преобладают больные АМИТ2.
2. Уровень св. Т4 и соотношение св.Т4 /св.Т3 значимо отличается при 1 и 2 типах АМИТ.
3. У 75% больных АМИТ1 соотношение св.Т4 /св.Т3 < 3,10, в то время как у 75% больных АМИТ2 соотношение св.Т4 /св.Т3 > 3,65.
4. Соотношение св.Т4/св.Т3 может быть использовано в дифференциальной диагностике 1 и 2 типов АМИТ.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

1. Martino E, Bartalena L, Bogazzi F, Braverman LE. The Effects of Amiodarone on the Thyroid. *Endocrine Reviews*. 2001; 22: 240 — 254.
2. Bogazzi F, Bartalena L, Gasperi M. et al. The Various Effects of Amiodarone on Thyroid Function Thyroid. 2001; 11: 511-519.
3. Cohen-Lehman J, Dahl P, Danzi S, Klein I. Effects of amiodarone therapy on thyroid function *Nat. Rev. Endocrinol.* 2009; 6:34–41.
4. Eskes SA, Wiersinga WM. Amiodarone and thyroid. *Best Practice Research Clinical Endocrinology Metabolism*. 2009; 23:735–751.
5. Grineva EN, Dora SV, Malakhova TV, Malakhova ZL. Influence of amiodarone on the thyroid gland structure and function. *Problems of Endocrinology*. 2008; 54: 17-21 (in Russian) [Гринева Е.Н, Дора С.В, Малахова Т.В, Малахова З.Л. Влияние амиодарона на структуру и функцию щитовидной железы. *Проблемы эндокринологии*. 2008; 54: 17-21].
6. Grineva EN, Babenko AY, Vygovskiy AB. Amiodaron-induced thyrotoxicosis: Difficulties in diagnosis and care. *Problems of Endocrinology*. 2005; 51(4): 18 (in Russian) [Гринева Е.Н., Бабенко А.Ю., Выговский А.Б. Кордарон-индуцированный тиреотоксикоз: трудности диагностики и врачебной тактики. *Проблемы эндокринологии*. 2005; 51(4): 18].
7. Basaria S, Cooper DS. Amiodarone and the thyroid. *Am J Med*. 2005;118: 706-714.
8. Bogazzi F, Bartalena L, Martino E. Approach to the Patient with Amiodarone-Induced Thyrotoxicosis. *JCEM*. 2010; 95: 2529–2535.
9. Pattison DA, Westcott J, Lichtenstein M, et al: Quantitative assessment of thyroid-to-background ratio improves the interobserver reliability of technetium-99m sestamibi thyroid scintigraphy for investigation of amiodarone-induced thyrotoxicosis. *Nuclear Medicine Communications*. 2015; 36: 356–362.
10. Tsang W, Houlden RL. Amiodarone-induced thyrotoxicosis: a review. *Can J Cardiol*. 2009; 25: 421-424.
11. Bogazzi F, Martino E, Dell'Unto E, et al. Thyroid color flow doppler sonography and radioiodine uptake in 55 consecutive patients with amiodarone-induced thyrotoxicosis *J. Endocrinol. Invest*. 2003; 26: 635-640.
12. Eaton SEM, Euinton HA, Newman CM, et al. Clinical experience of amiodarone-induced thyrotoxicosis over a 3-year period: role of colour-flow Doppler sonography *Clinical Endocrinology*. 2002; 56: 33–38.
13. Barvalia U, Amlani B, Pathak R. Amiodarone-Induced Thyrotoxic Thyroiditis: A Diagnostic and Therapeutic Challenge. *Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Medicine Volume*. 2014; Article ID 231651, 1-6.
14. Tanda ML, Piantanida E, Lai A, et al. Diagnosis and management of amiodarone-induced thyrotoxicosis: similarities and differences between North American and European thyroidologists. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008; 69:812 — 818.
15. Sriprapradang C, Bhasipol A. Differentiating Graves' disease from subacute thyroiditis using ratio of

serum free triiodothyronine to free thyroxine. *Annals of Medicine and Surgery*. 2016; 10: 69-72.

16. Yoshimura Noh J, Momotani N, Fukada S, et al. Ratio of serum free triiodothyronine to free thyroxine in Graves' hyperthyroidism and thyrotoxicosis caused by painless thyroiditis. *Endocr. J.* 2005; 52: 537-542.

17. Yanagisawa T, Sato K, Kato Y. et al. Rapid differential diagnosis of Graves' disease and painless thyroiditis using total T3/T4 ratio, TSH, and total alkaline phosphatase activity. *Endocr J.* 2005; 52:29-36.

18. Bogazzi F, Bartalena L, Brogioni S. et al. Color flow Doppler sonography rapidly differentiates type I and type II amiodarone-induced thyrotoxicosis. *Thyroid*. 1997; 7: 541-545.

19. Bogazzi F, Bartalena L, Dell'Unto E. et al. Proportion of type 1 and type 2 amiodarone-induced thyrotoxicosis has changed over a 27-year period in Italy. *Clinical Endocrinology*. 2007; 67: 533-537.

20. Carle A, Knudsen N, Bu'low Pedersen I, et al. Determinants of serum T₄ and T₃ at the time of diagnosis in nosological types of thyrotoxicosis: a population-based study. *Eur JEndocrinol*. 2013; 169: 537-545.

21. Martino E, Safran M, Aghini-Lombardi F. et al. Environmental iodine intake and thyroid dysfunction during chronic amiodarone therapy. *Ann Intern Med*. 1984; 101:28 — 34.

22. Sidhu, J, Jenkins D. Men are at increased risk of amiodarone-associated thyrotoxicosis in the UK. *QJM*. 2003; 96: 949-950.

23. Amino N, Yabu Y, Miki T. et al. Serum ratio of triiodothyronine to thyroxine, and thyroxine-binding globulin and calcitonin concentrations in Graves' disease and destruction-induced thyrotoxicosis. *JCEM*. 1981; 53: 113-116.

24. Laurberg P. Mechanisms Governing the Relative Proportions of Thyroxine and 3,5,3'-Triiodothyronine in Thyroid Secretion Metabolism. 1984; 33: 379-392.

25. Laurberg P, Vestergaard H, Nielsen S. et al. Sources of Circulating 3,5,3'-Triiodothyronine in Hyperthyroidism Estimated after Blocking of Type I and Type 2 Iodothyronine Deiodinases. *JCEM*. 2007; 92: 2149-2156.

26. Salvatore D, Tu H, Harney JW, Larsen R. Type 2 Iodothyronine Deiodinase Is Highly Expressed in Human Thyroid J. *Clin. Invest*. 1996; 98:962-968.

27. Murakami M, Araki O, Hosoi Y. et al. Expression and Regulation of Type II Iodothyronine Deiodinase in Human Thyroid Gland. *Endocrinol*. 2001; 142: 2961- 2967.

28. Nelson JC, Wang R, Asher DT, Wilcox RB. Underestimates and overestimates of total thyroxine concentrations caused by unwanted thyroxine-binding protein effects. *Thyroid*. 2005; 15: 12-15.

29. Shigemasa C, Abe K, Taniguchi S. et al. Lower serum free thyroxine (T4) levels in painless thyroiditis compared with Graves' disease despite similar serum total T4 levels. *JCEM*. 1987; 65: 359-363.

30. Izumi Y, Hidaka Y, Tada H. et al. Simple and practical parameters for differentiation between destruction-induced thyrotoxicosis and Graves' thyrotoxicosis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002; 57: 51-58.

Богданова Галина Александровна, врач УЗИ, НМИЦ им В.А. Алмазова;

Каронова Татьяна Леонидовна, д.м.н., заведующая НИЛ Клинической эндокринологии НИИ Эндокринологии НМИЦ им В.А. Алмазова;

Гринева Елена Николаевна, д.м.н., профессор, директор НИИ Эндокринологии НМИЦ им В.А. Алмазова;

Author information:

Evgeniya O. Ulupova, postgraduate student, Almazov National Medical Research Centre;

Galina A. Bogdanova, MD, doctor of ultrasound diagnostics, Almazov National Medical Research Centre;

Tatiana L. Karonova, MD, PhD, Associate Professor, head of the Clinical Endocrinology laboratory, Almazov National Medical Research Centre;

Elena N. Grineva, MD PhD, Professor, Director of Endocrinology Institute, Almazov National Medical Research Centre.

Информация об авторах:

Улупова Евгения Олеговна, клинический ординатор НИИ Эндокринологии НМИЦ им В.А. Алмазова;

ISSN 2311-4495
ISSN 2410-5155 (Online)
УДК 616.853

НЕГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ IN VIVO И СТИМУЛЯЦИЯ БЛУЖДАЮЩЕГО НЕРВА

Малышев С.М., Алексеева Т.М., Хачатрян В.А., Галагудза М.М.

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

Контактная информация

Малышев Станислав Михайлович
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: malyshev_sm@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 11.07.2018
и принята к печати 04.08.2018.

Резюме

Сложность эпилепсии и эпилептического приступа как клинических и патофизиологических понятий находит своё отражение в большом числе предложенных экспериментальных моделей эпилепсии. Их можно разделить на острые и хронические, химические и электрические. В настоящем обзоре рассмотрены некоторые наиболее типичные модели различных типов, используемые на лабораторных крысах. Обобщены результаты применения этих моделей в изучении стимуляции блуждающего нерва как современного метода лечения фармакорезистентной эпилепсии.

Ключевые слова: эпилепсия, эпилептический приступ, экспериментальная модель, стимуляция блуждающего нерва.

Для цитирования:

Малышев С. М., Алексеева Т. М., Хачатрян В. А., Галагудза М. М. Негенетические экспериментальные модели эпилепсии in vivo и стимуляция блуждающего нерва. Трансляционная медицина. 2018; 5 (3): 36–44.

NON-GENETIC IN VIVO EXPERIMENTAL MODELS OF EPILEPSY AND VAGUS NERVE STIMULATION

Malyshev S.M., Alekseeva T.M., Khachatryan W.A., Galagudza M.M.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Stanislav M. Malyshev
Almazov National Medical Research Centre
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341
E-mail: malyshev_sm@almazovcentre.ru

Received 11 July 2018; accepted 04 August 2018.

Abstract

Complexity of epilepsy and a seizure as clinical and pathophysiological entities is reflected in a large number of experimental models of epilepsy. They could be stratified into acute and chronic, chemical and electric. The present review describes some most typical non-genetic models of different kinds used on laboratory rats. Also, the results of application of these models for research of vagus nerve stimulation as a novel treatment of drug resistant epilepsy are summarized.

Key words: epilepsy, seizure, experimental model, vagus nerve stimulation.

For citation:

Malyshev S.M., Alekseeva T.M., Khachatryan W.A., Galagudza M.M. Non-genetic in vivo experimental models of epilepsy and vagus nerve stimulation. *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*. 2018; 5 (1): 36–44 pages. (In Russ.)

Введение

Согласно рабочему определению Международной лиги по борьбе с эпилепсией (International League Against Epilepsy (ILAE)), эпилепсия — это заболевание головного мозга, отвечающее следующим критериям: 1) не менее двух неспровоцированных (или рефлекторных) эпилептических приступов с интервалом более 24 ч; 2) один неспровоцированный (или рефлекторный) приступ и вероятность повторения приступов, близкая к общему риску рецидива (60%) после двух спонтанных приступов, в последующие 10 лет; 3) установленный диагноз эпилептического синдрома [1]. В свою очередь, эпилептический приступ — это возникновение преходящих жалоб и симптомов в результате аномальной избыточной или гиперсинхронной нейрональной активностью в головном мозге [2]. Как видно, эпилепсия описывается исключительно через клиническую феноменологию, в то время как определение приступа содержит также и обобщённое патофизиологическое

обоснование. В связи с этим возникает трудность адекватного воспроизведения различных форм т. н. хронической эпилепсии и острых эпилептических приступов у лабораторных животных, что находит своё отражение в большом количестве предложенных экспериментальных моделей (см. табл. 1, 2).

Термин «острый» в данном случае означает, что эпилептическая активность сохраняется в течение часов и дней после экспозиции, «хронический» — в течение дней и месяцев [3]. С качественной точки зрения различие между этими характеристиками состоит в том, что в первом случае приступы возникают в связи с нанесённым раздражением, во втором — спонтанно, хотя это разграничение условно, особенно в случае киндлинга.

Стимуляция блуждающего нерва (англ. “vagus nerve stimulation”, VNS) относится к паллиативным методам лечения фармакорезистентной эпилепсии. Он используется при неэффективности или невозможности выполнения резекции или деструкции эпилептического очага. Современный этап разви-

Таблица 1. Классификация моделей эпилепсии по типу приступов

Моделируемый тип приступа	Модель
Фокальные	Аппликация металлов (Zn, Co, Al) на кору Каиновая кислота Пилокарпин Киндлинг Тетанотоксин Прямая электрическая стимуляция
Фокальные с трансформацией в билатеральные тонико-клонические судороги (вторично-генерализованные)	Пентилентетразол Пенициллин
Тонико-клонические	Максимальный электрошок Пентилентетразол
Абсансы	Пенициллин Пентилентетразол
Миоклонические	Минимальный электрошок

Таблица 2. Классификация экспериментальных моделей эпилепсии по характеру эффекта

Острые приступы	Хроническая эпилепсия
Пенициллин Пентилентетразол Каиновая кислота Прямая электрическая стимуляция коры Максимальный электрошок Роговичная (корнеальная) стимуляция 6 Гц	Алюминий Кобальт Сульфат цинка Пилокарпин Каиновая кислота Пенициллин Пентилентетразол (химический киндлинг) Киндлинг Максимальный электрошок

тия VNS начался с работ американского нейрофизиолога Jacob Zabara, опубликованных во второй половине 1980-х гг. Он проводил стимуляцию периферических нервов у собак в ответ на автоматически детектируемую эпилептиформную активность на электроэнцефалограмме (ЭЭГ) электрическими импульсами следующих характеристик: сила тока 1-10 мА, ширина 0,1-1,0 мс, частота 20-150 Гц. Zabara использовал при этом модель острого генерализованного тонико-клонического приступа с внутривенным введением 1%-го раствора стрихнина. VNS позволяла не только останавливать, но и предупреждать развитие пароксизма [4].

Несмотря на большое число проведённых за последние 30 лет доклинических и клинических исследований, посвящённых VNS, остаются нерешёнными две принципиальные проблемы, связанные с данным методом: во-первых, неизвестен механизм его противосеизмического действия, во-вторых, не определены предикторы исхода лечения. Критерием эффективности VNS считают снижение частоты эпилептических приступов на 50%

и более. По данным большинства исследователей, эта цель достигается лишь у 50% пациентов, хотя со временем вероятность положительного ответа на стимуляцию растёт [5-7]. Можно предположить, что субоптимальная эффективность метода связана с недостаточно точными показаниями к его применению и/или отсутствием патофизиологически обоснованного протокола комплексного лечения пациентов, включающего как подбор параметров VNS, так и медикаментозное лечение.

Таким образом, сохраняется потребность в дополнительных фундаментальных исследованиях механизмов VNS. В связи с отсутствием всеобъемлющей модели эпилепсии эти исследования следует проводить с использованием различных парадигм, как острых, так и хронических. Целью данной статьи является обзор наиболее широко используемых моделей эпилепсии и эпилептических приступов и их вклада в решение задач, связанных с VNS. Основное внимание будет уделено моделированию эпилепсии на лабораторных крысах (*Rattus norvegicus*) пород Wistar и Sprague Dawley.

Химические модели эпилепсии**Блокаторы GABA_A-рецепторов**

Данная группа агентов используется в первую очередь, но не исключительно, для моделирования острых приступов, чаще всего не сопровождающихся патоморфологически верифицируемым повреждением головного мозга. В типичном случае при системном введении у подопытных животных наблюдают следующую динамику [8]:

1. Застывание;
2. Миоклонические подёргивания;
3. Клонические судороги;
4. Тонико-клонические судороги.

Рассмотрим два примера ГАМКергических моделей эпилепсии, одна из которых основывается на топической аппликации конвульсанта, а вторая — на системном его введении. Приступы при нанесении на кору или интрацеребральном введении солей металлов, хотя и обладают, по всей видимости, схожим патогенезом, проявляются иначе и поэтому будут рассмотрены отдельно.

Пенициллин G [9]. Используется как для местного, так и системного введения. Чаще практикуется топическая аппликация — нанесение тампоном 1,7-3,4 ммоль (или 500 МЕ) раствора пенициллина — либо внутримозговая инъекция с последующей регистрацией электрокортикограммы в месте раздражения [10]. Например, интракортикальное введение 15-30 МЕ приводило к развитию контралатеральных клонических судорог в конечностях через пять минут после выхода из галотанового наркоза; при введении 200 МЕ они дополнялись разгибанием головы и хвоста; инъекция 300 МЕ провоцировала контралатеральные тонико-клонические судороги, иногда (в 20% случаев) с трансформацией в билатеральные [11]. Системное внутривенное введение 1,0-5,0 мг/кг позволяет моделировать хроническую эпилепсию с абсансами и/или тонико-клоническими приступами [12, 13].

Пентилентетразол (PTZ). Данная модель наряду с максимальным электрошоком наиболее часто используется в доклинических испытаниях антиэпилептических препаратов. Тип и тяжесть индуцируемых в ней приступов зависят от дозы и пути введения. Подкожное введение PTZ 70-90 мг/кг вызывает у крыс генерализованные клонические приступы, а 100 мг/кг — тонико-клонические [14]. Более низкие дозы (менее 60 мг/кг) используют для моделирования острых абсансов, а также для химического киндлинга. В последнем случае 37,5 мг/кг PTZ вводят внутривенно один раз в два дня до тех пор, пока в результате не будут воспроизводиться вызванные генерализованные тонико-клонические приступы [15-17].

Аппликации металлов

Нанесение на поверхность коры головного или интрацеребральное введение соединений некоторых металлов (гидроксида алюминия, сульфата цинка, хлорида кобальта) позволяет моделировать эпилепсию в подостром эксперименте. Спонтанные приступы при этом возникают спустя несколько дней, т. е. имеет место латентный период.

Примером модели, относящейся к данной группе, является аппликация кобальтового (кобальт-хлоридного) порошка или проволоочки (1-2 мм длиной) [18, 19]. В высоких дозах (25 мг) кобальт вызывает эпилептический статус через 15 минут и, спустя 3-5 дней, спонтанные приступы. В очаге повреждения снижается синтез ГАМК и глутаматдекарбоксилазы, происходит гибель нейронов. Вероятно, кобальт также влияет на проводимость каналов NMDA-рецепторов [20]. Недостатками данной модели являются высокая смертность животных и сравнительно короткий эпилептогенный эффект (3-4 недели) [21].

Модели хронической височной эпилепсии, основанные на провокации эпилептического статуса

Мезиобазальная височная эпилепсия — наиболее распространённая форма фокальной эпилепсии у взрослых с высоким риском развития фармако-резистентности. Широко используются две экспериментальные химические модели (каинатная и пилокарпиновая), воспроизводящие следующие аспекты данного заболевания [22]:

- Локализация эпилептического очага в мезиобазальных структурах височной доли, входящих также в лимбическую систему: гиппокампе, миндалевидном ядре (амигдале), энторинальной коре;
- Частое присутствие указаний на перенесённое «предрасполагающее» повреждение головного мозга (например, фебрильные судороги);
- Латентный период с момента «предрасполагающего» повреждения до появления приступов;
- Сопутствующий склероз гиппокампа, соответствующий локализации и латерализации эпилептического очага и верифицируемый патоморфологически.

В этих моделях провоцирующим повреждением является эпилептический статус, вызванный системным или интрацеребральным введением химического агента. Как следствие, их использование сопряжено с высокой летальностью лабораторных животных.

Пилокарпин [23]. Введение пилокарпина интраперитонеально (320-400 мг/кг) или, реже, интрагиппокампально (1 мкл, 2,4 мг/мкл) через 5-10 мин приводит к формированию хронической височной

эпилепсии [24]. Поведенческие и электрофизиологические изменения при этом проходят три стадии [25]:

1. Острая стадия: моторные приступы, развивающиеся через 5-10 мин после экспозиции последовательно по стадиям, описанным R. J. Racine (см. ниже), с частотой раз в 5-15 мин. В большинстве случаев эти приступы переходят в эпилептический статус (примерно через 50-60 мин), который может привести к гибели животного. Статус длится около 5-6 ч и, в случае благоприятного исхода, переходит в постиктальную кому, сохраняющуюся в течение 24-48 ч. Этим событиям соответствует замещение высокоамплитудного тета-ритма в гиппокампе быстрой волновой активностью с пиками, распространяющейся по коре. Вероятно, проконвульсантный эффект пилокарпина обусловлен активацией мускариновых рецепторов и, как следствие, повышением возбудимости мембран нейронов.

2. Латентная стадия: длительностью 4-44 дня, характеризуется отсутствием приступов и нормализацией электроэнцефалограммы. Предполагается, что на этом этапе происходит эпилептогенез; в гиппокампе наблюдается снижение концентрации ГАМК и повышение — глутамата [26].

3. Хроническая стадия: появление спонтанных лимбических приступов различной частоты и семиологии.

Предложена следующая классификация экспериментальных лимбических приступов, разработанная специально для химических моделей [22]:

1. Застывание и клонический подергивания вокруг рта;
2. Автоматизмы;
3. Односторонние клонические судороги в грудной конечности;
4. Двусторонние клонические судороги в грудных конечностях;
5. Двусторонние клонические судороги в грудных конечностях с вставанием на тазовые и падением;
6. Тонико-клонические судороги.

Приступы возникают преимущественно в дневное время и у некоторых животных характеризуются кластерностью: приблизительно каждые 5-8 дней наблюдается учащение пароксизмов [27]. При электрофизиологическом исследовании фиксируют разряды эпилептической активности, распространяющиеся из гиппокампа на неокортекс. Выявление приступов 1-го и 2-го типов требует постоянного видеомониторинга.

Необходимо отметить, что в разных лабораториях используют собственные протоколы пилокарпиновой эпилепсии. В зависимости от дозы и пути введения препарата, а также применения с различ-

ными целями дополнительных веществ существенно меняется длительность стадий, вероятность развития эпилептического статуса и летальность. В частности, введение лития позволяет резко снизить дозу пилокарпина, необходимую для индукции статуса [28]. Имеют значение и конституциональные факторы, например, вид, порода, возраст и пол животного. Недостатком этой модели является также то, что в результате введения пилокарпина повреждается не только гиппокамп, но и другие области головного мозга, особенно при длительности эпилептического статуса более 30 мин [22].

Каиновая кислота [29]. Каиновая кислота — агонист ионотропных глутаматных рецепторов КА (GluK), широко представленных в регионе гиппокампа СА3 [30]. Используют интрацеребральное (интрагиппокампальное, интраамигдаллярное) стереотаксическое введение 0,4-2,0 мкг (4-15 мг/кг) каиновой кислоты в физиологическом растворе, что приводит к развитию судорожного статуса через 5-60 минут, затем — повторных судорожных приступов через 5-30 дней. Эпилептическая активность на ЭЭГ возникает через 10 минут после экспозиции. Также возможно системное введение 8-12 мг/кг интраперитонеально. Кроме того, в некоторых исследованиях каиновая кислота вводилась в другие структуры головного мозга (например, в полосатое тело или чёрную субстанцию) либо использовались более низкие дозы конвульсанта с оценкой исключительно острых приступов [3].

Феноменология приступов и стадийность развития хронической эпилепсии в этой модели аналогичны пилокарпиновой. Хотя обе они используются достаточно часто, пилокарпиновая модель обладает некоторыми преимуществами по сравнению с каиновой: более предсказуемой биодоступностью препарата, меньшей летальностью, большей вероятностью индуцирования эпилептического статуса [30, 31]. В то же время, каиновую модель считают более селективной, поскольку для неё менее характерны, хотя и не исключены, экстрактемпоральные повреждения.

Электрические модели эпилепсии

К данной группе следует отнести по меньшей мере три экспериментальных модели, основанных на электрическом раздражении головного мозга животных. Во-первых, для индукции приступов можно использовать как надпороговую (конвульсивные), так и подпороговую силу тока. Последнее характерно для киндлинга. В свою очередь, надпороговые раздражители могут быть применены как ко всему головному мозгу, так и к отдельным его

структурам, что соответствует моделям с электрошоком и с локальной стимуляцией.

Киндлинг — развитие эпилептических приступов в результате многократной электрической или химической стимуляции исходно подпороговой амплитуды [32]. Классический вариант киндлинга основывается на стимуляции различных структур головного мозга, в первую очередь относящихся к лимбической системе, с помощью имплантированных внутречерепных электродов. Индуцируемые приступы, как правило, являются не спонтанными, а вызванными. По мере эпилептизации головного мозга стимулом заданной силы наблюдают возникновение всё более сложных и длительных пароксизмов вплоть до билатеральных тонико-клонических судорог. Эта эволюция отражена в упомянутой выше классификации Racine RJ (1972), описывающей последовательные изменения феноменологии приступов у крыс [33]:

1. Движения рта и лицевой мускулатуры.
2. Кивки головой.
3. Клонические судороги в контралатеральной грудной конечности.
4. Симметричные клонические судороги в грудных конечностях с вставанием на тазовые.
5. Вставание на тазовые конечности и падение.

Необходимо отметить, что данная система создавалась только для оценки электрического киндлинга миндалевидного ядра у взрослых крыс. Между тем, киндлингу с различной скоростью могут подвергаться и другие структуры головного мозга, хотя в большинстве исследований мишенями являются амигдала и гиппокамп [34, 35]. Стимуляция осуществляется при помощи имплантированных внутречерепных электродов электрическими импульсами частотой 60 Гц пачками по 1-2 с. Каждое последующее воздействие производится импульсами возрастающей амплитуды, пока на электроэнцефалограмме не будет зарегистрирован разряд последствия. В качестве подпороговой величины импульса используют среднее между минимальной амплитудой, при которой был зафиксирован разряд последствия, и максимальной амплитудой, при которой ответ получен не был [33].

К преимуществам данной модели относят её воспроизводимость и низкую летальность лабораторных животных. Тот факт, что приступы при киндлинге в основном возникают в ответ на стимуляцию и лишь иногда спонтанно, одновременно является и достоинством, и недостатком: с одной стороны, это позволяет получать приступы тогда, когда это необходимо исследователю, с другой, возникают сомнения по поводу того, насколько

полно эта модель воспроизводит хроническую эпилепсию человека [36]. Также необходимо отметить относительную техническую сложность и длительность подготовительного этапа в данной модели.

Электрошок. Наиболее широко используемой моделью данного типа является максимальный электрошок [37]. Он позволяет моделировать генерализованные тонико-клонические приступы в остром эксперименте. Импульсы переменного тока длительностью 0,6 мс, частотой 50-60 Гц и амплитудой, в 5-10 раз превышающую судорожный порог для данного животного (150 мА у крыс), подаются в течение 0,2 с на транскорнеальные или трансаурикулярные электроды [38, 39]. Сразу после экспозиции у животного развивается тоническая фаза приступа в виде максимального разгибания конечностей и туловища, сменяющаяся через 10-15 с клоническими судорогами длительностью 20-30 с.

При использовании многократной стимуляции низкоамплитудными импульсами (2-3 мА) по аналогичной методике можно вызвать снижение судорожного порога. Такая модификация этой модели по сути является неинвазивным электрическим киндлингом, хотя уступает классическому варианту в репрезентативности [40]. Роговичная стимуляция импульсами низкой частоты (6 Гц) и большей длительности (3 с), предложенная ещё в 1950-х гг., в последние годы стала активно использоваться в качестве «скринингового» метода в доклинических исследованиях противоэпилептических препаратов [41-43]. Индуцируемые в этой парадигме приступы никогда не превышают по тяжести 1-2-ю стадии по Racine и потому ассоциируются с психомоторными приступами у человека. На основе протокола с низкочастотной стимуляцией также предложена киндлинговая модель фармакорезистентной эпилепсии [44].

Фундаментальные исследования стимуляции блуждающего нерва

Влияние VNS на течение экспериментальной эпилепсии изучалось многими авторами [45]. Следует, однако, отметить, что большинство данных публикаций не содержит достаточных описаний стимулирующей системы и, в частности, электродов. В целом, чаще всего применяют специально изготовленные платиноиридиевые электроды с внутренним диаметром 1 мм и расстоянием между катодом и анодом 2-3 мм [46, 47].

Имплантацию электродов как у человека, так и у подопытных животных осуществляют в шейном отделе левого блуждающего нерва. Это правило основано на следующих наблюдениях. Во-первых, как было показано у кошек и крыс, блуждающий

нерв на шейном уровне на 65-80% представлен афферентными волокнами типа С по классификации Erlanger-Gasser [48, 49]. В исследовании с использованием пентилентетразоловой модели было установлено, что эффективность VNS не снижается при обработке ствола блуждающего нерва капсаицином, токсичным для безмиелиновых волокон, и определяется, по всей видимости, проведением по низкопороговым волокнам типов А и В [50]. Следовательно, при VNS амплитуды стимула должно быть достаточно лишь для активации волокон этих типов, а не всего нерва; кроме того, относительно высокая доля афферентных волокон определяется предпочтительность стимуляции именно на шейном уровне. Во-вторых, по данным Randall W. C. и Ardell J. L. (1985, 1986), полученным в опытах на собаках, левый блуждающий нерв содержит эфферентные волокна к атриовентрикулярному узлу, а правый — к синоатриальному, и поэтому правосторонняя стимуляция может сопровождаться более высоким риском брадикардии и асистолии [51, 52]. Вместе с тем, этот взгляд не находит подтверждения в более поздних экспериментах на животных; кроме того, S. E. Krahl et al. (2003) показали, что выбор стороны стимуляции не влияет на её эффективность в отношении подавления приступов [53, 54].

Блуждающий нерв крыс покидает полость черепа через рваное отверстие. До уровня выхода в грудную полость он следует вместе с шейным сегментом симпатического ствола, образуя вагосимпатический ствол. Этот ствол проходит вместе с общей сонной артерией латеральнее трахеи. С целью выделения левого блуждающего нерва выполняют разрез длиной около 1-2 см на вентральной поверхности шеи по срединной линии или слева от неё. Отсепааровывают подъязычные железы и мышцы и, продвигаясь в латеральном направлении, выходят в шейному сосудисто-нервному пучку. Наконец, под увеличением микроскопа препарируют блуждающий нерв на протяжении 10 мм, отделяя его от общей сонной артерии [55]. Далее фиксируют электроды на нерве так, чтобы катод располагался роstralнее анода. Это связано с тем, что при стимуляции анод может блокировать дальнейшее распространение потенциалов действия по нервным волокнам (т. н. анодный блок) [56].

Эффективность VNS, как и любой противоэpileптической терапии, может оцениваться по различным критериям. Стимуляция может предупреждать развитие приступов; прерывать приступы в ходу; снижать их тяжесть, что может быть количественно выражено, например, в стадиях по Racine, и выраженность иктального паттерна (разряда последствий); повышать судорожный

порог и замедлять скорость kindlinga, что было неоднократно показано в различных исследованиях [45]. Например, в работе Raedt R. et al. (2011) с использованием данной модели VNS снижала тяжесть приступов (по шкале Racine) и продолжительность разрядов на ЭЭГ, увеличивала длительность латентного периода [57]. В классических экспериментах Woodbury D. M. и Woodbury J. W. (1990) острые пентилентетразоловые приступы подавлялись в период активной VNS и, наоборот, развивались при её прекращении [58]. Takaya M. et al. (1996), также использовавшие данную модель, показали, что противоэpileптический эффект VNS зависит от общей длительности импульсации и сохраняется в течение некоторого времени после её прекращения [59]. В исследовании Yang H.-J. et al. (2007) на этой же модели VNS подавляла приступы тем эффективнее, чем раньше начиналась стимуляция и чем дольше она продолжалась [60].

Большинство доклинических исследований VNS основаны на острых моделях эpileпсии [45]. Однако данный метод показан для лечения лишь фармакорезистентной эpileпсии, поэтому более релевантными оказываются хронические модели, например, kindling. Необходимо принимать во внимание своеобразие фармакорезистентности как клинического феномена, вероятно, неоднородного в патогенетическом отношении. Учёт этих особенностей в дальнейшем изучении VNS приблизит фундаментальные исследования к реальной клинической ситуации и поможет повысить эффективность метода.

Выводы

На сегодняшний день разработано большое число моделей приобретённой эpileпсии и эpileптического приступа *in vivo*. В целом, можно сказать, что наиболее часто обращаются к пилокарпиновой, каинатной, пентилентетразоловой моделям, а также максимальному электрошоку и kindlingu. Принципиально, что при оценке безопасности и эффективности новых методов лечения эpileпсии используют комбинацию моделей различного типа, что позволяет изучить их влияние на различные аспекты икто- и/или эpileптогенеза и спрогнозировать, при каком виде приступов эта терапия может быть наиболее эффективна. Безусловно, это положение относится и к нейромодуляционному хирургическому лечению, в частности, к VNS. Мультимодальные исследования механизма действия этого метода, биомаркеров, связанных с результатом стимуляции, позволят уточнить показания к его применению, оптимизировать алгоритм комбинированной терапии и, тем самым, повысить его эффективность.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475-482.
2. Fisher R. Operational Classification of Seizure Types by the International League Against Epilepsy. *J Chem Inf Model*. 2013;53(9):1689-1699.
3. Louis ED, Williamson PD, Darcey TM. Experimental models of chronic focal epilepsy: a critical review of four models. *Yale J Biol Med*. 1987;60(3):255-272.
4. Zabara J. Peripherale control of hypersynchronous discharge in epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1985;61(3):S162-S162.
5. Lipatova LV, Skoromets TA, Gromov SA, et al. The experience of the use of vagus nerve stimulation in treatment of drug-resistant epilepsy. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2014;(Suppl. 1):18-21. In Russian. [Липатова Л.В., Скоромец Т.А., Громов С.А., и соавт. Опыт использования стимуляции блуждающего нерва в лечении фармакорезистентной эпилепсии. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2014;(спецвыпуск 1):18-21].
6. Khachatryan WA, Mamatkhanyan MR, Lebedev KE. Vagostimulation in the system of surgical treatment of epilepsy. *Neurosurgery and Neurology of Childhood*. 2012;(2-3):152-161. In Russian. [Хачатрян В.А., Маматханов М.Р., Лебедев К.Э. Вагостимуляция в системе хирургического лечения эпилепсии (обзор литературы). *Нейрохирургия и неврология детского возраста*. 2012;(2-3):152-161].
7. Panebianco M, Rigby A, Weston J, et al. Vagus nerve stimulation for partial seizures. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(4):1-47.
8. Coppola A, Moshé SL. Animal models. *Handb Clin Neurol*. 2012; 107:63-98.
9. Walter AE, Johnson HC. Convulsive factor in commercial penicillin. *Arch Surg*. 1945; 50:69-73.
10. Silfverhuth MJ, Kortelainen J, Ruohonen J, et al. A characteristic time sequence of epileptic activity in EEG during dynamic penicillin-induced focal epilepsy—A preliminary study. *Seizure*. 2011; 20(7):513-519.
11. Collins RC, Kennedy C, Sokoloff L, et al. Metabolic anatomy of focal motor seizures. *Arch Neurol*. 1976;33(8):536-542.
12. Čulić M, Peković S, Stojiljković M, et al. The effect of cortical lesion on systemic penicillin epilepsy in rats. *Neuroscience*. 1992;51(2):439-444.
13. Akdogan I, Adiguzel E, Yilmaz I, et al. Penicillin-induced epilepsy model in rats: Dose-dependant effect on hippocampal volume and neuron number. *Brain Res Bull*. 2008;77(4):172-177.
14. Löscher W, Hönack D, Fassbender CP, et al. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazole seizure models. *Epilepsy Res*. 1991;8(3):171-189.
15. Pavlova TV, Fesenko GN, Guekht AB, et al. Seizure activite in the EEG of rats sensitive and resistant to pentylentetrazol kindling. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. Sechenov Physiology Journal. 2009;95(1):3-10. In Russian. [Павлова Т.В., Фесенко Г.Н., Гехт А.Б. и соавт. Судорожная активность в электроэнцефалограмме крыс, чувствительных и толерантных к пентилентетразоловому киндингу. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*. 2009;95(1):3-10].
16. Mason CR, Cooper RM. A permanent change in convulsive threshold in normal and brain-damaged rats with repeated small doses of pentylentetrazol. *Epilepsia*. 1972;13(5):663-674.
17. Dhir A. Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Curr Protoc Neurosci*. 2012;1(Suppl. 58):1-12.
18. Bonvallet M, Dell P, Hugelin AJ. Olfactory, gustatory, visceral, vagal, visual and auditory projections in the gray formations of the cerebral forebrain of the cat. *J Physiol*. 1952; 44:222-224. In French. [Bonvallet M, Dell P, Hugelin AJ. Projections olfactives, gustatives, viscérales, vagues, visuelles et auditives au niveau des formations grises du cerveau antérieur du chat. *J Physiol*. 1952;44:222-224.]
19. Chang JH, Yang X-F, Zempel JM, et al. The unilateral cobalt wire model of neocortical epilepsy: a method of producing subacute focal seizures in rodents. *Epilepsy Res*. 2004;61(1-3):153-160.
20. Borbély S, Dobó E, Czégé D, et al. Modification of ionotropic glutamate receptor-mediated processes in the rat hippocampus following repeated, brief seizures. *Neuroscience*. 2009;159(1):358-368.
21. Altenmüller D-M, Hebel JM, Rassner MP, et al. Locally Applied Valproate Enhances Survival in Rats after Neocortical Treatment with Tetanus Toxin and Cobalt Chloride. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1-9.
22. Curia G, Longo D, Biagini G, et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods*. 2008;172(2):143-157.
23. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*. 1983;9(3):315-335.
24. Furtado M de A, Braga GK, Oliveira JAC, et al. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia*. 2002;43 Suppl 5:37-39.
25. Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti M da G, et al. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An Acad Bras Cienc*. 2009;81(3):345-365.
26. Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci*. 16(1-2):33-37.
27. Goffin K, Nissinen J, Van Laere K, et al. Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. *Exp Neurol*. 2007;205(2):501-505.
28. Kulkarni SK, George B. Lithium-pilocarpine neurotoxicity: a potential model of status epilepticus. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1995;17(8):551-567.
29. Ben-Ari Y, Lagowska J. Epileptogenic action of intra-amygdaloid injection of kainic acid. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 1978;287(8):813-816.
30. Lévesque M, Avoli M, Bernard C. Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. *J Neurosci Methods*. 2016; 260:45-52.
31. Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res*. 2002;50(1-2):93-103.

32. Goddard GV. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature*. 1967;214(5092):1020-1021.
33. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972;32(3):281-294.
34. Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol*. 1969;25(3):295-330.
35. Gorter JA, van Vliet EA, Lopes da Silva FH. Which insights have we gained from the kindling and post-status epilepticus models? *J Neurosci Methods*. 2016; 260:96-108.
36. Bertram E. The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia*. 2007;48 Suppl 2:65-74.
37. Toman JE, Swinyard EA, Goodman LS. Properties of maximal seizures, and their alteration by anticonvulsant drugs and other agents. *J Neurophys*. 1946; 9:231-239.
38. Löscher W, Fassbender CP, Nolting B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. II. Maximal electroshock seizure models. *Epilepsy Res*. 1991;8(2):79-94.
39. Castel-Branco MM, Alves GL, Figueiredo IV, et al. The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2009; 31(2):101-106.
40. Potschka H, Löscher W. Corneal kindling in mice: behavioral and pharmacological differences to conventional kindling. *Epilepsy Res*. 1999; 37(2):109-120.
41. Toman JEP. Neuropharmacologic considerations in psychic seizures. *Neurology*. 1951;1(6):444-460.
42. Barton ME, Klein BD, Wolf HH, et al. Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy Res*. 2001;47(3):217-227.
43. Metcalf CS, West PJ, Thomson KE, et al. Development and pharmacologic characterization of the rat 6 Hz model of partial seizures. *Epilepsia*. 2017; 58(6):1073-1084.
44. Leclercq K, Matagne A, Kaminski RM. Low potency and limited efficacy of antiepileptic drugs in the mouse 6Hz corneal kindling model. *Epilepsy Res*. 2014;108(4):675-683.
45. Aalbers M, Vles J, Klinkenberg S, et al. Animal models for vagus nerve stimulation in epilepsy. *Exp Neurol*. 2011;230(2):167-175.
46. Handforth A, Kahl SE. Suppression of harmaline-induced tremor in rats by vagus nerve stimulation. *Mov Disord*. 2001;16(1):84-88.
47. McAllen RM, Shafton AD, Bratton BO, et al. Calibration of thresholds for functional engagement of vagal A, B and C fiber groups in vivo. *Bioelectron Med*. 2018;1(1):21-27.
48. Foley JO, DuBois F. Quantitative studies of the vagus nerve in the cat. I. The ratio of sensory to motor fibers. *J Comp Neurol*. 1937; 67:49-97.
49. Higashi H. Pharmacological aspects of visceral sensory receptors. *Prog Brain Res*. 1986; 67:149-162.
50. Kahl SE, Senanayake SS, Handforth A. Destruction of peripheral C-fibers does not alter subsequent vagus nerve stimulation-induced seizure suppression in rats. *Epilepsia*. 2001; 42(5):586-589.
51. Randall WC, Ardell JL, Becker DM. Differential responses accompanying sequential stimulation and ablation of vagal branches to dog heart. *Am J Physiol Circ Physiol*. 1985; 249(1):H133-H140.
52. De Vos CC, Melching L, Van Schoonhoven J, Ardesch JJ, et al. Predicting success of vagus nerve stimulation (VNS) from interictal EEG. *Seizure*. 2011; 20(7):541-545.
53. Kahl SE, Senanayake SS, Handforth A. Right-sided vagus nerve stimulation reduces generalized seizure severity in rats as effectively as left-sided. *Epilepsy Res*. 2003; 56(1):1-4.
54. Stauss HM. Differential hemodynamic and respiratory responses to right and left cervical vagal nerve stimulation in rats. *Physiol Rep*. 2017; 5(7):1-10.
55. Nichols JA, Nichols AR, Smirnakis SM, et al. Vagus nerve stimulation modulates cortical synchrony and excitability through the activation of muscarinic receptors. *Neuroscience*. 2011; 189:207-214.
56. Brindley GS, Craggs MD. A technique for anodally blocking large nerve fibres through chronically implanted electrodes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1980;43(12):1083-1090.
57. Raedt R, Clinckers R, Mollet L, et al. Increased hippocampal noradrenaline is a biomarker for efficacy of vagus nerve stimulation in a limbic seizure model. *J Neurochem*. 2011;117(3):461-469.
58. Woodbury DM, Woodbury JW. Effects of Vagal Stimulation on Experimentally Induced Seizures in Rats. *Epilepsia*. 1990;31(Suppl 2):S7-S19.
59. Takaya M, Terry WJ, Naritoku DK. Vagus nerve stimulation induces a sustained anticonvulsant effect. *Epilepsia*. 1996;37(11):1111-1116.
60. Yang HJ, Peng KR, Hu SJ, et al. Inhibiting effect of vagal nerve stimulation to seizures in epileptic process of rats. *Neurosci Bull*. 2007;23(6):336-340.

Информация об авторах:

Мальшев Станислав Михайлович, аспирант, кафедра неврологии и психиатрии, Институт медицинского образования, ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»;

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

Хачатрян Вильям Арамович, д.м.н., проф., заведующий отделением нейрохирургии детского возраста, ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России;

Галагудза Михаил Михайлович, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России;

Author information:

Stanislav M. Malyshev, MD, postgraduate student, Department of Neurology and Psychiatry, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre;

Tatiana M. Alekseeva, MD, PhD, the Head of the Department of Neurology and Psychiatry, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre;

William A. Khachatryan, MD, PhD, Professor, the Head of the Department of Pediatric Neurosurgery, Almazov National Medical Research Centre;

Mikhail M. Galagudza, MD, PhD, Professor, Associate of the Russian Academy of Science, the Head of the Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre.

МЕТОДЫ ПОДБОРА *IN VITRO* ХИМИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ПАЦИЕНТОВ

Чернов А.Н.¹, Баранцевич Е.П.¹, Калюнов В.Н.², Галагудза М.М.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

²ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск,
республика Беларусь

Контактная информация:

Александр Николаевич Чернов
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: al.chernov@mail.ru

Статья поступила в редакцию 07.06.2018
и принята к печати 01.08.2018.

Резюме

В обзоре рассматриваются методы подбора химио- и биопрепаратов, их комбинаций с использованием 2D и 3D моделей культур клеток для прогнозирования персонифицированного ответа пациентов со злокачественными новообразованиями (рак яичников, желудка, кишечника, легкого, молочной, поджелудочной желез, опухоли головы и шеи) на химиотерапию. Приводятся показатели эффективности (чувствительность, специфичность, пролонгирование общей и безрецидивной выживаемости) методов оценки химиочувствительности на культурах опухолевых клеток при сравнении их с эффективностью химиотерапии пациентов. В статье освещаются преимущества и недостатки описываемых методов и перспективы их дальнейшего применения в клинической практике.

Ключевые слова: методы *in vitro* подбора химиопрепаратов, злокачественные опухоли, химиопрепараты, прогнозирование *in vitro* индивидуального ответа на химиотерапию, преимущества и недостатки методов *in vitro*

Для цитирования:

Чернов А.Н., Баранцевич Е.П., Калюнов В.Н., Галагудза М.М. Методы подбора *in vitro* химиопрепаратов для индивидуальной химиотерапии злокачественных новообразований пациентов. Трансляционная медицина. 2018; 5 (1): 45–65.

THE METHODS OF *IN VITRO* SELECTION OF CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS FOR INDIVIDUAL CHEMOTHERAPY OF MALIGNANT TUMORS IN PATIENTS

Chernov A.N.¹, Barantsevich E.P.¹, Kalunov V.N.², Galagudza M.M.¹

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Corresponding author:

Aleksandr N. Chernov
Almazov National Medical Research Centre
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341
E-mail: al.chernov@mail.ru

Received 07 June 2018; accepted 01 August 2018.

Abstract

The review considers methods for selecting chemo- and biopreparations, their combinations using 2D and 3D cell culture models to predict a personalized response of patients with malignant neoplasms (ovarian, stomach, intestine, lung, lacteal, pancreas, head and neck cancer) to chemotherapy. Performance indicators (sensitivity, specificity, prolongation of total and disease-free survival) of chemosensitivity assessment methods in cultures of tumor cells are analyzed on the basis of their comparison with the effectiveness of chemotherapy of patients. The article highlights the advantages and disadvantages of the methods described, the prospects for their further application in clinical practice.

Key words: *in vitro* methods of selection of chemotherapeutic drugs, malignant tumors, chemotherapeutic drugs *in vitro* prediction of an individual response to chemotherapy, advantages and disadvantages of the *in vitro* methods

For citation:

Chernov A.N., Barantsevich E.P., Kalunov V.N., Galagudza M.M. The methods of *in vitro* selection of chemotherapeutic drugs for individual chemotherapy of malignant tumors in patients. *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*. 2018; 5 (1):45–65. (In Russ.)

Принятые сокращения: РТ — пролиферативный тест; EDRA — оценка чрезмерной лекарственной устойчивости; CFA — колониеформирующий анализ; DiSC — дифференциальное окрашивание на цитотоксичность; ATP assay — оценка жизнеспособности клеток по уровню аденозинтрифосфорной кислоты; HTDA — определение лекарственной чувствительности стволовых опухолевых клеток человека; CD-DST — тест восприимчивости к химиопрепаратам культур, инкорпорированных в коллаген-геле; CAM assay — тест адгезии клеток к матриксу; FMCA — флуоресцентный микроанализ культуры на цитотоксичность; SRB — тест с сульфородаминон Б; МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид тест, HTCA — клоногенный анализ опухоли человека; СНТКА — капиллярный клоногенный анализ опухоли человека; MiCK — анализ

кинетики, индуцированного химиопрепаратами апоптоза в микрокультурах клеток; FCCA — определение химическочувствительности проточной цитометрией; DIMSCAN — полуавтоматическая система обработки флуоресцентных микроскопических цифровых изображений; SCE — обмен сестринскими хроматидами; s-FSC — метод управления системой обратной связи; EVA/PCD — внеорганизменный анализ программированной клеточной гибели; HDRA — метод определения лекарственного ответа гистокультур клеток; 2treat test — метод культивирования опухолевых сфероидов; 3D-TGA — 3D модель опухолевого роста; PFS — безрецидивная и OS — общая выживаемость.

В настоящее время злокачественные новообразования по распространенности, инвалидизации и смертности вышли на второе место после патоло-

гии сердечно-сосудистой системы [1]. По прогнозам Международного агентства по изучению рака (Globocan) и ВОЗ в мире к 2035 г. ежегодная первичная заболеваемость раком возрастет более чем на 70% по сравнению с 2012 г. (14,1 млн. случаев) [2, 3]. По данным тех же организаций в 2015 г. от онкологических заболеваний в мире умерло 8,8 млн. человек, что составило 13% в структуре общей смертности населения планеты [2]. По официальной статистике за 2015 г. в Российской Федерации впервые выявлен 589 341 случай заболеваемости злокачественными новообразованиями и 296 476 смертельных случаев [4].

Развитие онкологии, молекулярной биологии и генетики дало возможность учитывать молекулярно-генетические индивидуальные особенности организма пациента при терапии злокачественных новообразований. Учет этих особенностей позволяет преодолеть общую и перекрестную многофакторную медикаментозную опухолевую резистентность, являющуюся причиной образования вторичных неоплазий, их поликлональной прогрессии и повышения злокачественности [5, 6, 7].

Основными направлениями терапии онкологических заболеваний являются хирургическая резекция, лучевая и полихимиотерапия. Вследствие диффузного характера роста опухолей, их метастазирования и диссеминации раковых клеток, актуальным является совершенствование радиационной и химиотерапии. Однако, применение последней сопряжено с рядом проблем. Развитие множественной общей, перекрестной и плейотропной лекарственной устойчивости злокачественных новообразований, связанной с экспрессией генов и мембранных белков-транспортёров, сопряжено с выведением химиопрепаратов из опухолевых клеток. Низкая проницаемость гематоэнцефалического и гемитестикулярного барьеров [8]. Слабое накопление химиопрепаратов в клетках неоплазий [9]. Индивидуальная выраженность побочных эффектов химиотерапии, включающих интоксикацию, нарушение общего тканевого метаболизма, дерегуляцию эндокринного аппарата, подавление иммунитета, развитие инфекционных осложнений, что в совокупности нередко приводит к инвалидизации пациентов и является главным фактором, препятствующим увеличению терапевтической дозы химиопрепаратов [10]. Отсутствие унифицированных схем применения химиотерапевтических средств [1, 11].

Для повышения эффективности химиотерапии используются методы оценки *in vitro* химиочувствительности неопластических клеток, применяемые в сочетании с другими исследованиями (цитоморфологическим, биохимическим, иммуногистохимическим, молекулярно-генетическим) [12].

Культуральная система не в полной мере воспроизводит условия целостного организма, что надлежит учитывать при интерпретации полученных данных [11]. Отсутствие микроокружения, формирования опухолевой васкуляризации, нарушение межклеточных контактов, отсутствие барьерной функции, иммунной системы способствуют не полному соответствию восприимчивости опухолей к химиопрепаратам, применяемым *in vitro* и результатам, наблюдаемым *in vivo* [13]. Кроме того, химиопрепараты способны вступать во взаимодействие друг с другом, что инициирует развитие синергических, аддитивных и антагонистических эффектов [14].

Тем не менее, благодаря применению культур клеток, представляется возможным установить прямое цитотоксическое действие химиопрепарата или его комбинации (терапевтический индекс) по оценке гибели и/или пролиферативной активности раковых клеток. Использование культуры опухолевых клеток позволяет провести мониторинг химиочувствительности и исследовать механизмы общей медикаментозной и перекрестной резистентности неоплазий в ходе их прогрессии и на разных этапах химиотерапии у больных [11]. Применение моделей *in vitro* позволяет провести скрининг потенциальных и новых противоопухолевых веществ с целью прогнозирования эффективности их применения и исключения неэффективных соединений [11]. Тестирование комбинаций химиотерапевтических средств на культурах клеток дает возможность изучить их аддитивные, синергические или антагонистические эффекты, выбрать наиболее рациональную схему терапии применительно не только к гистологическому типу новообразования, степени его злокачественности, цитологическому, генно-биохимическому статусу, но и индивидуальной чувствительности пациентов [11]. Использование культуральных систем позволяет идентифицировать группу пациентов с повышенным риском рецидива, учитывая клиническую картину, цитологические, иммунохимические, биохимические и молекулярно-генетические показатели [15]. Перечисленные обстоятельства инициировали создание множества методов определения лекарственной чувствительности, устойчивости опухолевых клеток и прогноза их реакции на химиотерапию.

Методы оценки *in vitro* персонифицированной чувствительности неопластических клеток к химиопрепаратам

Будучи отличными по принципиальным подходам, ориентирам и технологиям исполнения, методы, тем не менее, включают одни и те же ба-

зовые принципы: выделение клеток из образцов опухолей, инкубацию посевов с химиопрепаратами, оценку выживаемости, митотического, клонотического потенциала, ферментативной активности и интерпретацию полученных данных.

Методы оценки химиочувствительности опухолевых клеток с использованием 2D моделей

Пролиферативный тест (proliferative test — PT) показывает степень снижения митотического индекса по включению меченных аминокислот и оснований (^3H -тимидин, ^3H -уридин, ^3H -лейцин, ^3H -метионин, ^{125}I -метионин, ^{125}I -бромдексиуридин) во вновь синтезируемую цепь ДНК в пролиферирующих клетках при сцинтилляционном подсчете импульсов на β - и γ -счетчиках с использованием автордиографии, абсорбционного ридера или точного цитофлуориметра [16]. Поскольку только делящиеся клетки захватывают метку, то здесь фиксируются инверсионные отношения между поглощением радиоактивности и чувствительностью к химиопрепаратам (табл. 1) [17].

Одним из вариантов данного метода является оценка чрезмерной лекарственной устойчивости (extreme drug resistance assay — EDRA). В этом тесте также применяется ^3H -тимидин, но образцы не требуют суспензии одиночных клеток. Измельченную ткань опухолей с помощью ДНКазы и коллагеназы I типа выращивают на агарозном геле и инкубируют с одним или несколькими химиопрепаратами в течение 3–5 сут в дозах 5–80 раз превышающих физиологические. После чего на 48 ч добавляют ^3H -тимидин, радиоактивность которого оценивают через равные промежутки времени. Только жизнеспособные, сверхустойчивые к химиопрепаратам клетки захватывают метку. Следовательно, степень поглощения ^3H -тимидина прямо коррелирует с резистентностью к химиопрепаратам. Интерпретация результатов уникальна тем, что данный показатель выявляется как противоположный химиочувствительности. По сути метод задуман как средство достижения максимально возможной (более 90%-ной) отрицательной прогностической значимости, которая подтверждает правильность выбранного протокола и минимизирует использование потенциально неэффективных цитостатических средств [18, 19, 20, 21]. Оценка устойчивости к 4-гидроксициклофосфамиду (4-HC) и доксорубину культур клеток рака молочной железы от 103 пациентов с помощью метода EDRA позволила выявить её корреляцию с безрецидивной (PFS, progression-free survival) и общей (OS, overall survival) выживаемостью пациентов. Период безрецидивной выживаемости был досто-

верно ($P=0,022$) короче (48 мес.) в группе пациентов ($n=55$), опухолевые клетки которых *in vitro* проявляли чрезмерную или умеренную устойчивость к химиопрепаратам в сравнении с группой больных ($n=41$), в которой раковые клетки имели низкие значения химиоустойчивости (100 мес.). Общая выживаемость пациенток в группе с чрезмерной и умеренной лекарственной резистентностью была достоверно ($P=0,011$) короче, чем в группе с низкой *in vitro* химиоустойчивостью раковых клеток (табл. 1) [18].

50%-ное ингибирование индекса пролиферации, оцениваемое по иммуногистохимическому окрашиванию антителами на маркер Ki-67 и уровень экспрессии киназы ERK (extracellular signal-regulated kinase), фосфо-ERK (pERK), положено в основу определения чувствительности клеток сквамозоклеточной карциномы головы и шеи к 8 таргетным препаратам (цетуксимаб, эрлотиниб, афатиниб, сорафениб, маситиниб, тиванин, понатиниб, рапамицин). Установлена корреляция между уровнем пролиферации, экспрессией pERK/ERK в опухолевых клетках и их чувствительностью к таргетным препаратам [22].

В тесте адгезии клеток к матриксу (cell adhesive matrix — CAM assay) неопластические клетки культивируют 14 сут на покрытых фибронектином или фибринопептидами чашках Петри, затем обрабатывают химиопрепаратами и фиксируют с целью оценки выживаемости. Такой анализ позволяет с 60%-ной точностью предсказать ответ пациентов на химиотерапию [23].

Модель, разработанная Elprana D. et al. (1989), включает выращивание фрагментов сквамозоклеточной карциномы головы и шеи пациента во взвешенном состоянии в тестовой трубке, заполненной ростовой средой с химиопрепаратами (цисплатин, 5-фторурацил). У пациентов, получавших комбинацию препаратов, наблюдалась полная ремиссия в течение 4 мес. [24].

На количественном учете флуоресценции основывается флуоресцентный микроанализ культуры на цитотоксичность (fluorescent microculture cytotoxicity assay — FMCA). В этом методе на клетки линий глиом и первичных опухолей человека воздействуют тельцами (бусинками) и противоопухолевыми препаратами, меченными витальным красителем — гидроэтидином. Жизнеспособные и мертвые клетки подсчитывают с использованием флуоресцентного микроскопа (табл. 1) [25]. Существует и другая модификация метода, в которой первичные культуры клеток (рака желудка, яичников, колоректального рака и хронического лимфоцитарного лейкоза) окрашивают флуоресцеин

Таблица 1. Показатели эффективности методов оценки химиочувствительности на культурах опухолевых клеток

Метод	Тип опухоли	Количество пациентов	Показатель	Источник
Тесты с использованием 2D моделей опухолей				
Пролиферативный тест по включению 3Н-тимидина	рак яичников	25	чувствительность 60%, специфичность 100%	Hetland T. E. et al., 2012, [49]
	рак яичников	108	чувствительность 85%, специфичность 72%	Khoo S. K. et al., 1986, [10]
EDRA	рак яичников и уретры	51	чувствительность 75%, специфичность 100%, достоверная корреляция метода с PFS и OS	Matsuo K. et al., 2010, [96]
	рак молочной железы	103	достоверная корреляция метода с PFS (P=0,0393) и OS (p=0,0327) пациентов.	Mehta R. S. et al., 2001, [18]
Сульфородамин Б	рак яичников	28	чувствительность 62,5%, специфичность 89,5%	Arienti C. et al., 2013, [97]
АТР-ТСА/EDRA	рак яичников	30	чувствительность 96%, специфичность 26,3%	Hetland T.E. et al., 2012, [49]
АТР-ТСА	рак яичников	80	чувствительность 88,6%, специфичность 77,8%, достоверная корреляция со стадией опухоли и степенью злокачественности	Zhang J. et al., 2015, [98]
	глиома	30	чувствительность 70–90%, специфичность 90–100%	Linz U. et al., 2014, [51]
	рак молочной железы	496	показатели эффективности теста в зависимости от соединения 25,2–97,4%	Gwe Ahn S. et al., 2014, [99]
	рак яичников	61	чувствительность 60%, специфичность 79%	Neubauer H. et al., 2008, [100]
АТР-ТСА	карцинома яичников	100	чувствительность 53-83%, специфичность 90%	Andreotti P.E. et al., 1995, [101]
	рак желудка	36	чувствительность 46,2%, специфичность 95,7%	Kim J.H. et al., 2010, [102]
	рак поджелудочной железы	57	одногодичные и 3-летние показатели PFS в чувствительной к гемцитабину группе (57,4% и 0%) отличались (P<0,017) от устойчивых пациентов (25,3% и 3,6% соответственно).	Park J.S. et al., 2016, [53]
CFA	рак легкого	326	чувствительность 60%, специфичность 91%	Kitten C. M. et al., 1983, [103]
	глиома	470	чувствительность 60%, специфичность 100%	Alonso K, 1984, [8]
	различная этиология	1500	чувствительность 57%, специфичность 92%	Bertelsen C. A. et al., 1984, [104]
	различная этиология	2300	чувствительность 69%, специфичность 91%	Fiebig H. H. et al., 2004, [38]
CD-DST	злокачественная плевральная мезотелиома	26	чувствительность 100%, специфичность 36%, нет достоверной корреляции с клиническим ответом	Higashiyama M. et al., 2008, [105]
	немелкоклеточный рак легкого	80	чувствительность 100%, специфичность 64,7%-72,7%, достоверная корреляция с общей выживаемостью	Kawamura M. et al., 2007, [106]
	различная этиология	554	чувствительность 100%, специфичность 80%	Kobayashi H. et al., 1997, [107]

Метод	Тип опухоли	Количество пациентов	Показатель	Источник
ChemoFX	рак яичников	262	показатель эффективности теста 78,2%. PFS и OS достоверно коррелировали с результатами теста, отнесенными как чувствительные	Tian C. et al., 2014, [108]
	сквамозоклеточная карцинома	285	чувствительность 87% специфичность 58%	Grigsby P.W. et al., 2013, [109]
	рак яичников	147	увеличение выживаемости пациентов в чувствительной против устойчивой групп	Herzog T. J. et al., 2010, [110]
	опухоли желудочно-кишечного тракта (рак желудка, кишечника, яичников, саркомы, мезотелиома, аденокарцинома)	27	чувствительность 63%, нет достоверных отличий (P=0,101 и P=0,403, соответственно) между OS, PFS пациентов в группах, получавших химиотерапию согласно результатам <i>in vitro</i> и в группе без оценки химиочувствительности на культуре клеток	Bhagwandin S. et al., 2015, [65]
FMCA	рак яичников	116	чувствительность 76%, специфичность 42%, нет достоверной корреляции между FMCA и ответом пациентов	von Heideman A. et al., 2014, [111]
MTT	рак желудка	353	показатель эффективности теста 88,2%, достоверная корреляция между данными теста и OS	Wu B. et al., 2008, [112]
	колоректальный рак	200	продолжение выживаемости пациентов в чувствительной против устойчивой групп	Kabeshima Y. et al., 2002, [113]
	рак яичников	120	продолжение выживаемости пациентов в чувствительной против устойчивой групп	Xu X. et al., 2013, [114]
	рак яичников	120	специфичность 83%	Taylor C.G. et al., 2001, [115]
MiCK	рак яичников	104	показатель эффективности теста 71,4%	Salom E. et al., 2012, [39]
Тесты с использованием 3D моделей опухолей				
HDRA	рак яичников	104	PFS достоверно коррелирует с устойчивостью к карбоплатину	Jung P.S. et al., 2013, [116]
	колоректальный рак	324	чувствительность 72,7%, специфичность 54,7%	Yoon Y. S. et al., 2012, [117]
	сквамозоклеточная карцинома головы и шеи	57	чувствительность 79%, специфичность 71%	Pathak K.A. et al., 2007, [118]
EVA/PCD	немелкоклеточный рак легкого	31	показатель эффективности теста 87,8% достоверное (в 2 раза) продолжение OS, PFS пациентов	Nagourney R. A. et al., 2012, [82]
CTR-Test	глиома	11	чувствительность 63,4%, специфичность 95%	Linz U. et al., 2014, [51]
Онкобиограм	различные типы тканей	329	чувствительность 77%	Udelnow A. et al., 2013, [47]
Онкограм	колоректальный рак	19	чувствительность 84,6%, специфичность 33,3%	Bounaix Morand du Puch C. et al., 2016, [119]
Сфероиды	рак молочной железы	78	чувствительность 95,5%, специфичность 80,4%	Halfter K. et al., 2015, [120]
3D-гистокультуральный	рак желудка	100	нет достоверного увеличения выживаемости в чувствительной против устойчивой групп	Kodera Y. et al., 2006, [121]

Метод	Тип опухоли	Количество пациентов	Показатель	Источник
3D-гистокультуральный анализ	рак яичников	104	достоверное пролонгирование выживаемости пациентов в чувствительной против устойчивой группах	Jung P.S. et al., 2013, [122]
	колоректальный рак	29	достоверное пролонгирование выживаемости пациентов в чувствительной против устойчивой группах	Furukawa T. et al., 1995, [123]
Сочетания методов, метаанализ				
Различные методы	ретроспективные исследования, различная этиология	2300	чувствительность 69%, специфичность 91%	von Hoff D. D. et al., 1990, [32]
Различные методы	ретроспективные исследования, различная этиология	4092	чувствительность 71,7%, специфичность 90,3%	Blumenthal R.D. et al., 2007, [124]
Различные методы	ретроспективные исследования, различная этиология	1945	чувствительность 80%, специфичность 87,4%	Weisenthal L. M. et al., 2002, [125]
Различные методы	рак яичников	1101	чувствительность 93%, специфичность 46,6%	Kubota T. et al., 2006, [126]
Метаанализ, различные	аденокарцинома, саркома S180, меланома FIII, множественная меланома, карцинома рака яичников, карцинома легкого	1500	чувствительность 80-100%, специфичность 50-80%	Volm M. et al., 2015, [127]

Примечание: во всех приведенных исследованиях использованы первичные культуры клеток, полученные из опухолей пациентов

диацетатом после 3-х сут воздействия препаратов (5-фторурацил, цисплатин, оксалиплатин, ирино-текан, митомицин С, доксорубин, доцетаксел, бортезомиб, сорафениб, сунитиниб и рапамицин) и регистрируют интенсивность флуоресценции, пропорциональную численности жизнеспособных клеток с помощью флуоресцентного микропланшетного ридера Fluoroscan 2 [26]. Это позволяет ускорить скрининг потенциальных противоопухолевых препаратов с помощью прямой оценки количественной флуоресценции минуя процедуру стинцилляционного подсчета.

К разряду косвенных индикаторов чувствительности клеток можно отнести тест с сульфородамино Б (sulforhodamine B assay — SRB) [27]. Он нацелен на верификацию белкового синтеза в результате применения флуоресцентного красителя — сульфородамина Б (SRB), который с высоким сродством связывается с остатками основных аминокислот белков. Затем проводят фиксацию образовавшихся комплексов трихлоруксусной кислотой и колориметрическое определение общего белка, соответствующее количеству жизнеспособных клеток. Кислота способствует связыванию SRB в клетках. В щелочных условиях краситель экс-

трагируют и после солюбилизации измеряют спектрофотометрически [28]. Метод демонстрирует высокую чувствительность, стабильность конечного результата в монослойных и в суспензионных культурах и не требует дорогостоящих реактивов. Единственное препятствие состоит в необходимости внесения тетрахлоруксусной кислоты. Эта стадия критическая, так как не вполне аккуратное добавление кислоты способствует перемещению клеток до фиксации, порождая возможные артефакты, которые способны отразиться на результатах измерений (табл. 1).

Метод тетразолиевого окрашивания (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide — MTT) дает количественное представление об индексе цитотоксичности (ИЦ). Он основан на способности митохондриальных лактат- и сукцинатдегидрогеназ жизнеспособных клеток конвертировать растворимые натриевые соли тетразолия [2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий]-5-карбоксинилина (ХТТ) или 3-[(4,5-диметил-2-тиазол-2,5-дифенил тетразолий) бромид (MTS) в нерастворимый продукт — фармазан в присутствии феназинмоносульфата (PMS). С помощью солюбилизаторов его кристал-

лы переводят в растворимую окрашиваемую форму, оптическая плотность которой улавливается спектрофотометром при длине волн 540-690 нм. Реагируют только жизнеспособные, метаболически активные клетки. Превышение химиопрепаратами эффекта 50%-го торможения роста свидетельствует о восприимчивости клеток к данному препарату. MTS соль лучше растворима и не токсична, в отличие от ХТТ, поэтому ее применение является предпочтительным. Чувствительность метода лежит в диапазоне от 1000 до 50 000 клеток/лунку (табл. 1) [16, 29, 30]. Интерес представляет исследование китайских ученых, которые применили МТТ тест и атомную абсорбционную спектрофотометрию для оценки чувствительности к 5-фторурацилу, доксорубину, цисплатину, карбоплатину, митомицину и концентрации меди, цинка, селена и марганца в первичных культурах гепатоклеточной карциномы пациентов. Учеными установлена отрицательная корреляция между уровнями селена, марганца и чувствительностью раковых клеток к карбоплатину и доксорубину соответственно [31]. Таким образом, содержание микроэлементов селена, меди, марганца и цинка в клетках рака печени оказывает влияние на их чувствительность к химиопрепаратам.

Колониеформирующий анализ (colony formation assay — CFA) основывается на клоногенных свойствах стволовых клеток, т.е. их способности в течение 7-21 сут образовывать колонии в монослое [32]. Поскольку некоторые химиопрепараты продолжительно влияют на митотическую активность, целесообразным представляется дополнительный анализ размеров колоний посредством абсорбции ими 1%-го раствора красителя кристаллического фиолетового. Подсчет проводят с помощью камеры Горяева. Эффективным признается химиопрепарат, если после его воздействия жизнеспособными остаются 30% и менее колоний по сравнению с необработанными контролями. Клинические испытания показывают, что примерно половина пациентов, чьи клетки *in vitro* демонстрируют чувствительность к химиопрепаратам, проявляют клинический ответ на те же самые цитостатические средства, а лица, у которых клетки устойчивы к химиопрепаратам крайне редко отвечают на них (табл.1) [33, 34, 35, 36, 37, 38, 39]. Fiebig H. N. et al. (2004) показали, что ответы на химиопрепараты опухолей человека, развивающихся как ксенографты у иммунодефицитных мышей, установленные как чувствительные и резистентные, дают корреляцию равную соответственно 62% и 92% [38]. В 80 предпринятых сравнениях совпадение прогнозирования *in vitro* с клиническим ответом для чувстви-

тельных и нечувствительных опухолей составило 90% и 97% соответственно. Однако, по другим данным, CFA прогнозирует резистентность к химиопрепаратам у 90% пациентов и чувствительность только у 40-70% пациентов [40]. Таким образом, метод обладает высокой прогностической ценностью для оценки химиочувствительности стандартных и экспериментальных противоопухолевых средств.

Модификацией CFA является клоногенный анализ опухоли человека (human tumour cloning assay — HTCA), разработанный Hamburger A. W. и Salmon S. E (1977). В основу метода положено выращивание на мягком агаре в течение 14-21 сут колоний опухолевых клеток, которые обрабатывают химиопрепаратами и оценивают их численность. Поскольку опухолевые клетки человека, обработанные хромомицином A_3 или абрином, не способны расти в культурах, то их используют для верификации [34].

В капиллярном клоногенном анализе опухоли человека (capillary human tumour clonogenic cell assay — CHTCA), разработанном Maurer H. R. et al. (1981), используют выращивание колоний раковых клеток в капиллярных трубках с двухслойным агаром при добавлении препаратов. Затем колонии переносят на предметные стекла, где их подсчитывают. Ali-Osman F. et al. оптимизировали HTCA, показав, что он будет иметь лучшие показатели успешного образования колоний и эффективности прикрепления клеток при их выращивании в капиллярах, чем в чашках Петри, используемых в методе HTCA (77% для CHTCA против 53% для HTCA) [41].

Вариантом CFA является метод оценки лекарственной чувствительности стволовых опухолевых клеток человека (human tumor stem cell drug sensitivity assay — HTDA или cancer stem cells sensitivity assay — STELLA). В данной технологии используют 51-суточные колонии раковых стволовых клеток, которые предварительно фенотипируют антителами против CD133, CD166, OCT3/4 (octamer-binding transcription factor $3/4$), ALDH-1 (aldehyde dehydrogenase 1), CD90 и подвергают 96 ч экспозиции с химио- или таргетными препаратами (адриамицин, афатиниб, винорелбин, гемцитабин, доцетаксел, ифосфамид, карбоплатин, кризотиниб, нилотиниб, оксалиплатин, паклитаксел, пеметрексед, сорафениб, сунитиниб, темозоломид, топотекан, трастузумаб, 5-фторурацил, цетуксимаб, циклофосфамид, эпирубицин, эрлотиниб, этопозид) с целью оценки их эффективности, прогнозирования влияния на опухоли у пациентов и выбора подходящих терапевтических средств для конкретного

пациента. Противоопухолевый эффект препаратов определяют по индексу ингибирования формирования колоний или в результате окрашивания оранжевым акридиновым и бромистым этидием. Количественную оценку проводят с помощью конфокального микроскопа [42].

Дифференцированное окрашивание клеток на цитотоксичность (differential staining cytotoxicity assay — DiSC) основано на неодинаковом поглощении красителей гематоксилина–эозина нормальными и опухолевыми жизнеспособными клетками, а также прочного зеленого (fast green) погибшими, в зависимости от степени проницаемости их мембран. Интактная плазмолемма препятствует поглощению красителей. Таким образом, удается идентифицировать процент погибших клеток при влиянии химиопрепаратов в диапазоне трех 10-кратных концентраций. Лекарственную восприимчивость измеряют по соотношению выживших клеток в обработанных цитостатическими препаратами посевах к их количеству в необработанных контролях, которое должно составлять не менее 80% жизнеспособных клеток [32, 43, 44]. Эффективным считается химиопрепарат, который в средней концентрации подавляет более чем на 50% жизнеспособность опухолевых клеток по сравнению с контрольными посевами [45].

В микроядерном тесте культивируют клетки первичных опухолей в монослое, обрабатывают их химиопрепаратами или облучением и затем проводят иммуногистохимическое окрашивание для обнаружения микроядер в делящихся клетках. Однако, не было установлено достоверной корреляции между химиочувствительностью раковых клеток в тесте и клиническим ответом опухолей пациентов на химиотерапию [46].

Метод оценки *in vitro* химиочувствительности первичных культур неопластических клеток с использованием гистocyтoлогического окрашивания по Романовскому-Гимзе применен у 514 пациентов с раком молочной железы, желудка, почки, щитовидной и поджелудочной желез, колоректальным раком и злокачественной меланомой. При сравнении химиочувствительности культур раковых клеток с клиническим ответом опухолей пациентов на химиотерапию удалось достичь достоверного ($P=0,0063$) пролонгирования показателей общей (OS) выживаемости пациентов в группах «чувствительных *in vitro*» по отношению к группе «резистивных *in vitro*» опухолей [47].

Оценка выживаемости клеток по уровню аденозинтрифосфорной кислоты — АТФ (adenosine triphosphate cell viability assay — ATP assay или adenosine triphosphate-based chemotherapy response

assay — ATP-CRA) способствует количественному подсчету выживших клеток при обработке химиопрепаратами (табл. 1). Погибшие клетки вследствие утраты целостности мембран, демонстрируют значительное уменьшение количества АТФ. После воздействия химиопрепаратов клетки лизируют, а их цитоплазматические компоненты солюбилизируют в условиях, не затрагивающих ферментативного метаболизма АТФ. В лизат вносят АДФ и фермент — люцеферин/люцеферазу, которая катализирует распад АТФ до АДФ или АМФ и люцеферина с испусканием света. Интенсивность свечения пропорциональна метаболической активности субстрата и улавливается люцинометром или β -счетчиком. Этот метод позволяет преодолеть ограничения других способов, предоставляя возможность тестировать множество образцов опухолей. Уменьшение АТФ указывает на лекарственную чувствительность, а отсутствие снижения — на устойчивость к химиопрепаратам. Этот анализ пригоден для измерения выживаемости культур с низкой плотностью клеток [47, 48, 49, 50, 51, 52]. Используя данный тест, корейские ученые оценили *in vitro* чувствительность к гемцитабину первичных культур клеток рака поджелудочной железы и обнаружили достоверную корреляцию между химиочувствительностью и возникновением раннего рецидива у 57 пациентов после хирургической резекции и адъювантной химиотерапии. На основе данных ATP-CRA, все пациенты были разделены на 2 группы — «чувствительные» ($n=24$) и «резистентные» ($n=33$) к гемцитабину. Одногодичные и 3-летние показатели PFS в «чувствительной» к препарату группе (57,4% и 0,0%) достоверно ($P<0,017$) отличались от значений в группе «устойчивых» пациентов (25,3% и 3,6% соответственно) [53].

Ряд иных способов опирается на такие критерии как активность ацетилхолинэстеразы, люцеферазы, топоизомеразы-II или секрецию лактатдегидрогеназы, ацетилхолинэстеразы, сукцинатдегидрогеназы и др. [28, 40].

Анализ кинетики, индуцированного химиопрепаратами апоптоза в микрокультурах клеток (Microculture kinetic drug induced apoptosis assay — MiCK). Метод применяется в США для определения наиболее эффективных химиопрепаратов по профилю чувствительности к ним раковых клеток, полученных от пациентов в тканевых, костномозговых и жидкостных образцах. Опухолевый материал экспонируют *in vitro* с разовыми дозами химиопрепаратов. Результаты помогают клиницистам сориентироваться в наиболее предпочтительных химиопрепаратах до начала тера-

пии у конкретного пациента (табл. 1). Данный тест не инвазивен, выполняется на малом объеме опухолевой ткани, жидкости или образцах костного мозга. Метод пока не вошел в рутинную клиническую практику. Хотя ряд публикаций констатировали определенную корреляцию между результатами, полученными *in vitro* и *in vivo* в плане повышения нормы ответа на продиктованную им схему лечения по сравнению с эмпирической [25, 39, 54]. Статистически значимого пролонгирования PFS и OS у онкологических пациентов пока не получено.

Проточно-цитометрическое определение химиочувствительности (flow cytometric chemosensitivity assay — FCCA) выполнено на 30 детях с острым лимфобластоидным лейкозом. Данный метод позволяет количественно оценить число жизнеспособных клеток в суспензии по результатам их флуоресценции при окрашивании флуоресцеиндиацетатом и пропилий иодидом в изотоническом растворе после 1-4 ч экспозиции с химиопрепаратами. Эта технология позволяет быстро и точно определить концентрацию живых клеток в суспензии, отличать жизнеспособные от мертвых клеток, а также бласты при лейкозе от нормальных лейкоцитов в клинических образцах [16, 55, 56].

Проточная цитометрия и оценка пролиферации жизнеспособных моноклеарных клеток периферической крови по включению в их ДНК флуоресцентного аналога тимидина — 5-этил-2'-деоксиуридин (EdU), меченного азидом Alexa Fluor 488, положены в основу CD анализа деления клеток (CD cell division assay) с целью определения их чувствительности к этопозиду, доксорубину, цитарабину, митомицину C, ингибиторам ДНК-зависимой протемкиназы — Nu7441 и ATM — Ku55933. Продолжительность CD анализа составляет 3 сут, что позволяет быстро и надежно оценивать цитостатическое воздействие химиопрепаратов на лимфоциты человека и идентифицировать группу наиболее чувствительных онкогематологических пациентов до назначения противоопухолевой терапии [57].

Оценка чувствительности первичных культур клеток хронического лимфоцитарного лейкоза к комбинациям кладрибин + мафосфамид и флударабин + мафосфамид выполнена с использованием сочетания проточной цитометрии (определение жизнеспособных и апоптотических клеток), иммуноблоттинга (оценка экспрессии белка PARP-1 и скорость апоптоза) и дифференциальной сканирующей калориметрии (изменение конформации хроматина и скорости апоптоза). Комбинированное применение методов позволяет получить достоверную корреляцию между химиочувствительностью

in vitro клеток лейкоза и клиническим ответом пациентов спустя шесть курсов химиотерапии (через 6 мес) [58].

Тест определения лекарственной чувствительности культур, инкорпорированных в коллаген-геле (collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test — CD-DST). Он способен количественно оценивать чувствительность клеток из биопсийных образцов к противоопухолевым препаратам без контаминации культур фибробластами (табл. 1) [17, 40, 59, 60, 61]. Исследователи из университета Сиги (Япония), используя метод CD-DST, определили скорость ответа на терапию (RR), PFS и OS у 38 пациентов с колоректальным раком (grade IV). Были сформированы 2 группы пациентов, в первой больные получали терапию химиопрепаратами, подобранную с использованием CD-DST, во второй — лечение проводилось без предварительного применения CD-DST. Медианы PFS и OS в первой группе составили соответственно 696,5 и 1023,4 сут против 297,5 и 518,5 сут во второй ($P=0,0326$, $P=0,0061$) [60].

Полуавтоматическая система обработки флуоресцентных микроскопических цифровых изображений (semiautomatic fluorescence-based digital image microscopy system — DIMSCAN) основана на регистрации флуоресценции флуоресцеиндиацетата (FDA), избирательно накапливающихся в живых клетках и химического тушения свечения эозина Y погибшими клетками [62]. Метод включает в себя ряд преимуществ. Во-первых, он позволяет сканировать 96-луночный планшет в течение 6 мин даже с единичными флуоресцирующими клетками в каждой лунке. Во-вторых, чувствительность метода лежит в диапазоне 4-5 порядков (от единичных до миллиона клеток), что дает возможность корректно тестировать комбинации лекарственных средств и оценивать их синергические, аддитивные и антагонистические эффекты. Таким образом, эту систему целесообразно использовать для выявления противоопухолевой активности комбинаций химиопрепаратов в предклинических испытаниях [62].

Шведские ученые из Каролинского университета-клиники разработали тест для оценки чувствительности клеток первичных образцов хронического лимфоцитарного лейкоза к 31 малым молекулам и 29 химиопрепаратам на основе флуоресцентной цифровой сканирующей системы. Клетки культивируют в 384-луночных планшетах и подвергают 3 сут воздействию препаратами. После чего оценивают численность жизнеспособных и погибших клеток по окрашиванию их флуоресцентным красителем VitaDye и анализу цифровых

изображений, полученных на флуоресцентном сканере. Наибольшим цитотоксическим воздействием на клетки хронического лимфоцитарного лейкоза обладали ингибиторы белков survivin (YM-155), bcl-2 (ABT-199, ABT-737) и CDK (dinaciclib). Далее проводят цитогенетический анализ клеток хронического лимфоцитарного лейкоза, чтобы выявить хромосомные aberrации (делеция 17p и мутация TP53), в наибольшей степени коррелирующие с химиочувствительностью клеток [63].

В тесте ChemoFx оценку индивидуальной чувствительности к препаратам опухолевых жизнеспособных клеток проводят при их окрашивании красителем DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) и автоматическом подсчете на счетчиках клеток (табл. 1). С использованием этого метода изучена восприимчивость к сунитинибу клеток рака молочной железы, полученных от 39 пациенток. Данный тест позволил соотнести образцы опухолей с ответом на терапию 7,6% — ответившие, 20,5% — имели промежуточную реакцию и 71,7% — не отвечали на лечение [64]. В другом исследовании ChemoFx был применен для оценки чувствительности первичных культур клеток рака желудка, кишечника, яичников, саркомы, мезотелиомы, аденокарциномы, полученных от 27 пациентов, к митомину C, цисплатину и доксорубину. Однако, не было установлено достоверных отличий по показателям OS ($P=0,101$) и PFS ($P=0,403$) между группами пациентов, получавших химиотерапию согласно результатам *in vitro* и без предварительной оценки химиочувствительности на культуре клеток. Химиочувствительность *in vitro* не коррелировала с типом опухоли или применением предоперационной системной химиотерапии, но коррелировала ($P=0,003$) с проведением гипертермической интраперитонеальной химиотерапии [65].

Технология сканирования клеток (CellScan technology) с использованием лазерного сканирующего цитометра позволяет выявлять антипролиферативные и противоопухолевые свойства новых химических соединений по спектроскопическому и флуоресцентному измерению выживаемости и апоптоза опухолевых клеток [66].

Анализ эксклюзии красителя (dye exclusion assay) [67]. Этот метод основан на принципе непроницаемости цитоплазматической мембраны нетрансформированных клеток для витальных красителей и утрате этой способности погибшими клетками в результате дезинтеграции плазмалеммы. Поэтому жизнеспособные клетки после воздействия химиопрепаратов остаются не окрашенными, а погибшие — захватывают краситель и окрашиваются в соответствующий цвет. Таким

образом, удастся подсчитать численность жизнеспособных и погибших клеток, и по их соотношению судить о степени цитотоксичности испытуемых химиопрепаратов [28, 45, 56, 67, 68]. При данном способе тестирования применяются различные красители: прочный зеленый, кристаллический фиолетовый, нейтральный красный, эозин, нигрозин Б, акридиновый оранжевый, трипановый синий [56]. Метод эксклюзии красителя относительно скор, прост, малозатратен, обходится небольшим количеством клеток и гарантирует достаточную результативность при соблюдении ряда условий [45, 56, 69].

Метод ChemoID, разработанный американскими учеными из медицинского центра при университете Миссиссипи, позволяет провести определение химиочувствительности раковых стволовых клеток и клеток глиобластомы для индивидуализации выбора химиотерапии у пациентов [70]. Тест ChemoID включает комбинирование методов оценки химиочувствительности опухолевых клеток по их жизнеспособности при окрашивании трипановым синим, флуоресцентно-мечеными антителами к маркерам CD133, CXCR4, CD44, Oct3/4, Nanog и WST8 анализа (Water-soluble tetrazolium salts analysis). Флуоресценцию регистрируют на проточном цитометре. К 7 сут культурам клеток добавляют на 2 сут химиопрепараты в 3 концентрациях или их комбинации, а восприимчивость оценивают с помощью WST8 анализа. Чувствительность ChemoID составила 100% для раковых стволовых и опухолевых клеток, а специфичность 97% и 89% соответственно. Данный тест дает возможность по определению времени возникновения рецидива, PFS и OS изучить ответ глиобластомы пациентов на химиотерапию. Оценка *in vitro* чувствительности раковых стволовых клеток к темозоломиду с применением ChemoID позволяет в 2 раза увеличить 12-мес выживаемость пациентов. Медиана возникновения рецидива составила 20 мес для пациентов, у которых в ChemoID тесте погибло более 40% раковых стволовых клеток по сравнению с 3 мес для больных, имеющих меньший процент погибших клеток. Таким образом, ChemoID дает возможность 2,2 раза повысить ответ опухоли у пациентов на химиотерапию по сравнению с группой больных, терапию которым назначают без применения данного метода [70].

Система xCELLigence позволяет определить цитостатическое, цитотоксическое и митогенное воздействие таргетных препаратов (эрлотиниба) и химиопрепаратов (цисплатина), в режиме реального времени с 15 мин интервалом в течение 90 ч. Препараты добавляют через 1 сут к клеткам

аденокарциномы легкого человека, выделенных из злокачественной легочной эффузии. Это дает возможность построить динамические кривые и определить латентный период действия препарата на рост клеток [71].

Воздействие химиопрепаратов повреждает ДНК, активирует ее репарацию и обмен сестринскими хроматидами (sister chromatid exchange — SCE) с помощью гомологичной рекомбинации. Репарационная способность ДНК и генотоксическое воздействие препаратов у каждого пациента индивидуальны, в силу чего может наблюдаться корреляция между частотами SCE и индивидуальной репарационной способностью. Метод SCE основан на дифференциальном окрашивании сестринских хроматид, преимущественно лимфоцитов, которые культивируют с 5-бромдезоксимурином (5-BrdU). При этом во 2-м делении хромосомы имеют одно плечо с исходной цепью ДНК и другое плечо с включенным 5-BrdU. В результате репликации ДНК, цепи, содержащие 5-BrdU, имеют разрывы и окрашиваются, что позволяет определять кариотипы в 1-м, 2-м и последующих делениях клеток после культивирования [72].

Метод управления системой обратной связи (streamlined feedback system control — s-FSC) применяют для выбора *in vitro* оптимальных комбинаций лекарственных препаратов при их воздействии на жизнеспособность клеточной линии аденокарциномы почки 786-О. Метод основан на использовании линейного регрессионного анализа второго порядка и состоит из трех последовательных этапов. На первой стадии оценивают ингибирование жизнеспособности клеток при воздействии лекарственных препаратов в 91 комбинации. На втором этапе анализируют комбинации четырех химиопрепаратов, проявивших наибольшую эффективность на первом этапе поиска. На последней стадии осуществляют проверку взаимодействия выбранных комбинаций соединений (акситиниб, эрлотиниб, дазатиниб и AZD4547). Эти сочетания препаратов ингибируют жизнеспособность 90% клеток 786-О аденокарциномы почки [73].

В основе метода оценки индивидуального ответа на химиотерапию 5-фторурацилом, доксорубицином и циклофосфамидом 7-ми сут первичной культуры клеток рака молочной железы положена оптимизация получения срезов опухоли, состава и циркуляции культуральной среды. Данный тест включает избыточное удаление жировой ткани, получение 2 мм срезов опухоли и 6-часовое их культивирование с вращением на шейкере в условиях CO₂-инкубатора в среде, содержащей химиопрепараты. Затем срезы фиксируют в формалине, заливают в парафи-

новые блоки и окрашивают гематоксилином-эозином и антителами к цитокератину (PanCytokeratin), а также проводят оценку гибели и пролиферации клеток соответственно с помощью TUNEL анализа и по включению EdU. Определяют количество EdU- и цитокератин-положительных клеток и абберантную морфологию их ядер с целью выявления гибели клеток (кариолизис, пикноз, кариоррексис и апоптоз) как маркера чувствительности опухолевых образцов на химиотерапию. Применяют 7 разведений окрасок для гистохимии, анализа гибели и пролиферации клеток, чтобы разделить чувствительные и резистивные образцы опухоли [74].

Исследователи из Калифорнийского университета разработали на основе сочетания технологий микролуночного чипа и молекулярной визуализации быстрый (в течение 4 ч) и высокопроизводительный тест для оценки *in vitro* чувствительности клеток рака шейки матки (HeLa) и мочевого пузыря (5637) к химиопрепаратам (цисплатин и паклитаксел). Химиочувствительность раковых клеток определяют при снижении ими внутриклеточного поглощения (2-[N-(7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил) амино]-2-дезоксид-Д-глюкозы, 2-NBDG) по регистрации интенсивности флуоресценции с помощью программы CellProfiler 2.0 на флуоресцентном микроскопе. Преимуществами данного теста являются не продолжительный период культивирования и быстрота оценки химиочувствительности раковых клеток, которая была сопоставима с МТТ, проточной цитометрией и окрашиванием ядер йодидом пропидия [75].

Комбинирование методов оценки химиочувствительности по EC50 (концентрация агента, вызывающего ингибирование на 50% роста клеток) первичных культур клеток аденокарциномы из злокачественной плевральной эффузии немелкоклеточного рака легкого при помощи колориметрического WST-1 теста и генотипирования с использованием секвенирования следующего поколения позволяет целенаправленно и индивидуально подобрать химиопрепараты и провести стратификацию пациентов на подгруппы [76].

Технология Chemocellomics представляет собой высокопроизводительную матрицу для суспензионных микрочастиц и включает химический синтез, иммобилизацию химиопрепарата, прикрепление и рост клеток на микрочипе. Этот тест позволяет оценивать воздействие лекарственных препаратов на первичных культурах опухолевых клеток пациентов в микроколичествах [9].

Сочетание методов определения индекса пролиферации и геномного секвенирования мутаций использовано американскими учеными из Гарвардской

медицинской школы для оценки индивидуального ответа на противоопухолевые препараты культур циркулирующих *ex vivo* клеток метастатического рака молочной железы пациентов и клеточных линий (BRx-07, BRx-33, BRx-BRx-42, BRx-50, BRx-61, BRx-68). Индекс пролиферации и дифференцировку раковых клеток изучают соответственно по окрашиванию на Ki-67 и эпителиальный цитокератин, CD45 маркер. Чувствительность и устойчивость к химиопрепаратам (паклитаксел, капецитабин, доксорубин), биопрепаратам (фулвестрант, олапариб) и их комбинациям изучают по оценке IC50. Выполняют геномное секвенирование циркулирующих клеток линий рака молочной железы, что позволяет выявить мутации в генах PIK3CA (catalytic subunit alpha phosphatidylinositol-3-kinase, H1047R, G1049R), эстрогенового рецептора (ESR1, estrogen Receptor 1, Y537S), рецептора 2 фактора роста фибробластов (FGFR2, fibroblast growth factor receptor 2), белка p53 (TP53), KRAS, E-кадгерина (CDH1.) Сопоставление профилей генетических мутаций и химиочувствительности дает возможность провести персонализированный подбор препаратов у пациентов [77].

Методы оценки химиочувствительности опухолевых клеток с использованием 3D моделей

Кроме методов, разработанных на основе 2D технологии культивирования, в последнее время создаются методы оценки индивидуальной химиочувствительности раковых клеток пациентов с применением 3D моделей. В качестве таких модельных систем используются экспланты опухолевой ткани [78], сфероиды, сокультивирование неопластических клеток со стромальными фибробластами и моноцитами [79], органоиды [80] для имитирования микроокружения опухоли *in vivo* [81].

Внеорганизменный анализ программированной клеточной гибели (*ex vivo* analysis of programmed cell death — EVA/PCD) выявляет маркеры апоптотической и неапоптотической гибели клеток (табл. 1). Операционный опухолевый материал дезагрегируют с помощью ДНКазы или коллагеназы IV типа до кластеров (50-100 клеток), которые образуют сфероид. Поскольку клетки в них не пролиферируют, сфероиды создают условия, наиболее приближенные к существующим для опухолей в организме человека. После суточной экспозиции опухолевых сфероидов с испытуемыми химиопрепаратами к ним добавляют смесь красителей, состоящую из нигрозина Б, прочного зеленого и, фиксированных глутаральдегидом, эритроцитов. Образцы окрашивают гематоксилином и эозином. Гибель

оценивают при подсчете клеток, дифференциально окрашиваемых сообразно целостности их мембран [28, 82, 83]. Поскольку образование сфероидов классическим путем достаточно сложная и трудоемкая процедура, а некоторые опухоли вообще их не образуют, предлагается выращивание культур клеток в полупроницаемых полимерных микрокапсулах на основе альгината и L-полилизина [84].

Метод определения лекарственного ответа гистокультур клеток (histoculture drug response assay — HDRA) основан на степени ингибирования митоза. Для этого метода применяют фрагменты опухолевой ткани размером 1-2 мм (экспланты), которые культивируют на коллагеновой подложке, что позволяет сохранять межклеточные контакты и поддерживать трехмерную архитектуру опухоли. Спустя 24 ч после посева, экспланты инкубируют 3-7 сут с химиопрепаратами и заливают парафином. Критерием оценки цитотоксичности химиопрепаратов служит степень подавления митотической активности клеток, которая оценивается по снижению радиоактивности метки или уменьшению поглощения 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (MTT тест, табл. 1) [20, 21, 47, 85, 86, 87, 88].

Шведская биотехнологическая компания OncoTheis разработала 3D тестовую модель OncoCilAir™ с целью оценки химиочувствительности клеток рака легкого. В этой модели совместно культивируют клетки бронхов и опухолевые клетки из хирургических образцов пациентов, чтобы воссоздать модель легкого человека. После дифференцировки культуры сокультивируют с кусочками ткани респираторного эпителия, чтобы воссоздать структуру функциональных легочных узелков. То есть в этой модели учитываются взаимоотношения опухоль-строма. Тест OncoCilAir позволяет оценивать хроническую (3 мес) цитотоксичность, устойчивость, побочные эффекты химиопрепаратов, а также реконструировать различные молекулярные субтипы аденокарциномы легкого в результате присутствия мутаций EGFRdel19, KRAS и эффективно проводить стратификацию пациентов. Наличие мутаций позволяет определять чувствительность раковых клеток к эрлотинибу (тарцева), гефитинибу (иресса) и использовать данный тест в качестве платформы для разработки препаратов [89].

Исследователи из Германии создали на основе одиночных сфероидов 3D модель для оценки индивидуальной реакции на химиотерапию у пациентов со сквамозоклеточной карциномой головы и шеи [90]. Сфероиды получали из FaDu, Cal27, UPCI-SCC-154, P1Ca клеточных линий и первичной культуры клеток образцов опухолей пациен-

тов, и затем выращивали в «висячих каплях» или прикрепленными к ультратонкому культуральному планшету. Для получения сфероидов из клеточных линий авторы использовали суспензию одиночных (в количестве 1000-5000) клеток и 3D культуральную платформу. К сфероидам добавляют на 1 сут цисплатин или 5-фторурацил и затем культивируют в их течение 15 сут. Колориметрически определяют пролиферацию и жизнеспособность с применением WST-8 теста, маркера Ki-67 и иммуоферментного анализа (табл. 1). Инкубация сфероидов с химиопрепаратами достоверно уменьшает их размер на всем протяжении эксперимента [90]. Pozzi V. et al. (2015) при 14-28 сут культивировании клеточных линий и первичных культур клеток сквамозоклеточной карциномы головы и шеи получили сквамосферы (squamospheres), т.е. сфероиды, которые могут быть применены для изучения химиочувствительности раковых и стволовых клеток [91].

Метод культивирования опухолевых сфероидов (2treat test) основан на измерении их объёма после воздействия химиопрепаратов или комбинаций с помощью стандартного ДНК микрочипового сканера. Этот тест используют для индивидуального подбора наиболее эффективных схем химиотерапии у пациентов с колоректальным раком [92].

В 3D модели опухолевого роста (three dimensional tumour growth assay — 3D-TGA), в которой эпителиальные клетки рака пищевода совместно культивируют до 3 нед с мезенхимальными стволовыми клетками на экстракте Cultrex® модифицированной базальной мембраны с добавлением глюкозы и поддержанием pH, но без сыворотки (табл. 1). На данной модели Saunders J. H. et al. (2017) оценили воздействие химиопрепаратов и ингибитора деацетилазы гистонов — панобиностата на жизнеспособность раковых клеток по окрашиванию трипановым синем и в результате анализа экспрессии эпителиального маркера EpCam на проточном цитометре. Стволовые клетки конститутивно экспрессируют красный флуоресцентный белок — mCherry в 3D-TGA модели, флуоресценцию которого оценивают с помощью ридера на 3-и и 7-е сут. На 7-е сут кластеры клеток экстаргируют и окрашивают антителами с помощью красителей к Trefoil factor 3, AlexFluor 488 и Prolog Gold Anti-fade DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) [93].

Для оценки различий между пациентами в чувствительности к 83 противоопухолевым препаратам неопластических клеток рака ободочной и прямой кишки разработана модель органоидов. Она обнаружила полное совпадение мутаций в органоидах с мутациями в опухоли пациентов в результате секвенирования геномной ДНК. Применение ука-

занной модели позволит выявить новую подгруппу пациентов, содержащих мутации гена *RNF43* (ring finger protein 43), кодирующего белок поркупин. Использование препаратов, ингибирующих данный протеин, дает возможность проводить терапию данной группы онкологических пациентов [80].

CANScript технология прогнозирования персонализированного клинического ответа на комбинации противоопухолевых препаратов (доцетаксел, цисплатин и 5-фторурацил, цетуксимаб и pFOLFIRI) испытана на культурах клеток рака кишечника и сквамозоклеточной карциномой головы и шеи, полученных от 109 пациентов. В основе CANScript положено использование эксплантатов опухолей, культивируемых в окружающем стромальном матриксе с аутологичной сывороткой пациентов. Затем проводят патологический и морфологический анализы, оценку пролиферации и гибели клеток. Полученные данные обрабатывают с помощью компьютерного алгоритма CANScript для прогнозирования ответа опухолей пациентов на химиотерапию с 100%-ной чувствительностью и 75–91,67% специфичностью [94].

Стекланный микрожидкостный чип, в котором поддерживается непрерывная смена среды, моделируя циркуляцию кровотока и диффузию питательных веществ *in vivo*, использован для оценки чувствительности фрагментов сквамозоклеточной карциномы головы и шеи или метастатических лимфатических узлов к 5-фторурацилу, цисплатину или их комбинации. Пролиферацию и апоптотическую гибель клеток оценивают спустя 7 сут вне чипа-матрицы по изменению концентрации лактатдегидрогеназы, WST-1 и цитохрома с. Окрашку образцов гематоксилин-эозином проводят, чтобы документировать сходство архитектуры опухоли *in vitro* с неоплазией, растущей в организме. Указанный метод может быть применен для разработки персонализированных схем химиотерапии у пациентов [95]. Основные показатели эффективности представленных методов и их корреляция с клиническим ответом представлены в таблице 1.

Ограничения методов оценки *in vitro* химиочувствительности на культурах клеток опухолей

Кроме достоинств, рассмотренные методы не лишены технических и теоретических проблем. Точность МТТ подвержена существенному влиянию лабораторных условий и, прежде всего, pH экстрагирующего буфера, так как его смещение на 5 единиц в сторону увеличения порождает ложные сигналы, а модификация состава ведет полному растворению визуализируемых зёрен фармазана [37]. МТТ

обычно выполняют в темноте, так как его реагенты чувствительны к свету, что предвносит некоторое неудобство в проведение эксперимента. Более того, МТТ дает сопоставляемые показатели при наличии в образцах не менее 80% бластных клеток. Если их оказывается меньше, данные сильно искажаются из-за присутствия неопухолевых клеток, способных поглощать тетразолий. Результат признается надежным, когда в контроле сохраняется 70% жизнеспособных клеток на 4 сут культивирования [45]. Большее их количество искажает результаты наблюдений [43]. Диапазон чувствительности МТТ составляет 2 порядка, что ограничивает его использование для оценки синергических эффектов комбинаций химиопрепаратов. Наконец, для МТТ пригодны только адгезионные культуры, причем определенные условия культивирования подбираются для каждой клеточной линии индивидуально. Также МТТ не может применяться для клеток с низким уровнем метаболизма, как, например, тимоцитов или селезеночных макрофагов, которые очень слабо восстанавливают МТТ. Серьезную опасность предвносит ориентация данного метода на сукцинатдегидрогеназу, которая подвергается конкурентному типу торможения. Известно множество соединений, способных конкурировать с этим ферментом за активные центры. Показано, что клетки в состоянии метаболизировать тетразолий до фармазана в безклеточном окружении, что влияет на интерпретацию результатов [128]. Способствует распространению метода его автоматизация [45].

Хотя DiSC анализ (в отличие от МТТ) позволяет использовать материал со значительной примесью нормальных клеток (однако не более 30%) и оценивать эффекты химиопрепаратов в популяциях смешанных клеток, он остается трудоёмким, относительно субъективным и требовательным к уровню квалификации персонала [45, 88].

Проблемность колониеформирующего анализа (CFA) сводится к следующим моментам. При нем, как и в других методах, нарушаются межклеточные взаимоотношения. Имеется вероятность того, что опухолевые клетки в большинстве не пролиферируют (G_0), тогда как делятся колониеобразующие клетки. Не исключено, что колониеобразующие клетки могут оказаться не подлинно стволовыми. CFA в состоянии оценивать численность погибших клеток в узком диапазоне (2 порядка), тогда как клинические ответы требуют, чтобы гибель клеток находилась в широком диапазоне. Это обстоятельство способствует испытанию нереально низких концентраций химиопрепаратов, чтобы избежать ложноположительного результата. Кроме того, выполнение CFA продолжительно по време-

ни (2-4 недели), которое требуется для формирования максимального количества колоний [40]. Рост колоний клеток вносит значительные вариации в результаты их подсчета от одного исследователя к другому отчасти из-за неоднозначности критериев, какие и сколько из них являются оправданными [45]. По выращиванию колоний нельзя оценить изменчивость химическочувствительности субпопуляций опухолевых клеток [40]. Только от 246 пациентов со злокачественными опухолями из 470 (41%) удалось получить клоногенные культуры, пригодные для оценки множественной лекарственной чувствительности к 604 препаратам по причине не одинакового опухолевого роста и других проблем [35]. В целом, метод трудоемкий по подсчетам и неспособен варьировать условия культуральной среды, что удорожает его стоимость. Использование CFA ограничивается плохой клоногенной способностью многих клеточных линий, например, бластных клеток крови [36].

В АТФ анализе нельзя в культуре отличить нормальные от опухолевых клеток. Причем популяция в них должна содержать не менее 70% неопластических клеток для валидации сигнала при отсутствии нормальных клеток, содержащих АТФ [28]. Количество АТФ быстро уменьшается АТФазой в погибших клетках. Однако, АТФ анализ может быть выполнен на опухолевых клетках, полученных из биопсии, плевральной и асцитной жидкости [129].

Красители йодид пропидия и флуоресцеиндиацилат для FCCA являются поздними индикаторами гибели клеток, а феномен наложения флуоресцентных сигналов при тестировании комбинаций препаратов не позволяет изучать явления синергизма и антагонизма [16].

Создание сфероидов при проведении внеорганического анализа программированной клеточной гибели (EVA/PCD) является достаточно сложной и трудоемкой задачей, а некоторые клеточные линии вообще не образуют их в суспензии [84].

Метод висячей капли обладает высокой производительностью, автоматизацией, позволяет получить сфероиды одинаковой морфологии и размера, причем каждый сфероид содержится в одной капле, однако, он сопряжен с риском растворения сфероидов [90]. Культивирование клеток на чашках с очень слабой адгезивностью (ULA, ultra-low attachment culture plates) обеспечивает высокую производительность получения сфероидов, автоматизацию (роботы или планшетные ридеры), легкость взятия образцов, однако, оно сочетается с большим, неопределенным количеством образовавшихся сфероидов в каждой лунке, причем их морфология и размеры различаются в широком диапазоне [90].

Метод оценки лекарственной чувствительности стволовых опухолевых клеток человека (HTDA или STELLA) требует длительного времени (51 сут, диапазон 37–95 сут) выполнения и на сегодняшний день существуют очень мало исследований, в которых грамотно проведена вся процедура [42].

Многие методы требуют стадии отмывания от избытка добавляемых веществ. Эти этапы могут быть трудновыполнимыми для суспензионных или плохо адгезионных клеточных культур.

Применение методов в клинической практике

Некоторые методы уже применяются на коммерческой основе. Дифференцированное окрашивание клеток на цитотоксичность (DiSC) применяют в Weisenthal Cancer Group, Huntington Beach, CA, США. Внеорганизменный анализ программированной клеточной гибели (EVA/PCD™) используется в Rational Therapeutics, Long Beach CA, США. С помощью флуоресцентного микроанализа культур на цитотоксичность (FMCA), тимидинового теста (пролиферативный тест, PT), определения лекарственного ответа гистокультур (HDRA) назначают химиотерапию у пациентов в AntiCancer Inc., San Diego, CA, США и SRL Inc., Tokyo, Япония. ChemoFX® тест применяется в Helomics Corp., Pittsburgh, PA, США, а CorrectChemo® — в Diatech Oncology, Franklin, TN, США. Оценку чрезмерной лекарственной устойчивости (EDRA) используют для назначения пациентам химиотерапии в EDRA®, Exiqon Diagnostics, Tustin, CA, США и TherapySelect, Heidelberg, Германия. Сферотест (SpheroTest®) применяют для подбора препаратов у пациентов в SpheroTec, Martinsried, Германия, а онкограм — в Oncomedics, Limoges, Франция.

Заключение

Методы индивидуальной оценки лекарственной чувствительности и устойчивости пока не используются широко в повседневной медицинской практике. Их преимущества в прогнозировании ответа опухолей на терапию, как и предпочтительность продиктованных *in vitro* персонифицированных режимов перед конвенциональными активно обсуждаются. Одни авторы показали преимущества методов индивидуального определения химиочувствительности перед стандартной химиотерапией, и, опираясь на высокую корреляцию ответов на культурах клеток с клиническими (реакция опухолей, состояние пациентов, протяженность периодов безрецидивной и общей выживаемости), высказались в поддержку развития методов [16, 25, 47, 50]. Другие исследователи не смогли выявить преимуществ методов инди-

видуальной оценки химиочувствительности перед протокольными, и заняли отрицательную позицию [19, 49, 51, 82, 130]. Третьи ученые выявили лишь частичные преимущества в персонифицированном тестировании восприимчивости неопластических клеток к химиопрепаратам и заняли промежуточную позицию [25, 49]. Многие работы из выше цитированных выполнены безупречно.

Однако, нередко наблюдения по сопоставлению результатов *in vitro* и *ex vivo* были малочисленны, а если и имели представительную выборку, то не были грамотно спланированы. Порой в них отсутствуют сведения о длительности безрецидивного и общего выживания пациентов, его качестве, неблагоприятных побочных реакциях, а также не фигурируют рандомизированные сравниваемые группы [131]. Отсюда проистекает известная сдержанность в общей оценке проблемы. В 2012 г. появился обширный системный обзор [131] членов рабочей группы Американской ассоциации по клинической онкологии (American Society of Clinical Oncology — ASCO), который посвящен критическому анализу преимуществ методов определения *in vitro* химиотерапии перед групповой. Резюмирующая часть содержит формулировку: «the use chemotherapeutic agents for individual patients is not recommended outside» — «использование химиотерапевтических препаратов для индивидуализации терапии пациентов не рекомендуется объективной реальностью» пока не будет проверено медицинской практикой. В том же осторожном ракурсе позиционируется Национальная всеобщая раковая сеть США (National Comprehensive Cancer Network — NCCN) — клинико-практическая руководящая и направляющая организация. Она признает, что в ряде учреждений научно-лабораторного профиля идентификация лекарственной устойчивости проводится в порядке дополнения к отбору среди находящихся в обращении химиопрепаратов для оптимизации лечения.

Однако следует отметить, что химиочувствительность опухолевых клеток, которая зависит от многих генетических и эпигенетических факторов на уровнях клетки и организма, может выступать в качестве интегративного прогностического показателя ответа опухоли конкретного пациента на проводимую химиотерапию. Данный показатель следует иметь в виду при планировании, проведении и интерпретации результатов комбинированной и комплексной терапии.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

1. Merabishvili VM. Oncological statistics (traditional methods, new information technologies): Guidelines for physicians. Part I. SPb.: Costa, 2015. p. 223. In Russian. [Мерабишвили В. М. Онкологическая статистика (традиционные методы, новые информационные технологии): Руководство для врачей. Издание второе, дополненное. Часть I. СПб: Коста, 2015. с. 223].
2. International agency for research of cancer (Globocan) [Electronic resource]: The World of Health Organization, 2012. — Mode of access: <http://www.globocan.iarc.fr>. (23.03.2018).
3. World health organization [Electronic resource]: World health organization, 2017. Mode of access: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en>. (25.04.2018).
4. Malignant tumors in Russia in 2015 (morbidity and mortality). eds by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. M.: MNIOI named. P.A. Herzen. 2017. p. 250. In Russian. [Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена. 2017. с. 250].
5. Chekhun VF. From System biology of cancer to methodology of personalized treatment. *Oncology*. 2012; 14 (2): 84–88. In Russian. [Чехун В. Ф. От системной биологии рака до методологии персонализированного лечения. *Онкология*. 2012; 14 (2): 84–88].
6. Oktay MH, Hui P. Molecular pathology as the driving force for personalized oncology. *Expert Rev. Mol. Diagnostics*. 2012; 12: 811–813.
7. Strese S, Fryknäs M, Larsson R. et al. Effects of hypoxia on human cancer cell line chemosensitivity. *BMC Cancer*. 2013; 13: 331.
8. Alonso K. Human tumor stem cell assay. A prospective clinical trial. *Cancer*. 1984; 54: 2475–2479.
9. Broder GR, Birtwell SW, Hagel G, et al. Multiplex bioassays using a suspension array platform; towards the high throughput screening of drugs targeting cancer stem cells. In: 4-th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2010): Groningen, The Netherlands, San Diego, Calif, Red Hook, NY: Chemical and Biological Microsystems Society; Printed from e-media with permission by Curran Associates Inc, 2010; 185–1387.
10. Khoo SK, Hurst T, Webb MJ, et al. Short-term in vitro chemosensitivity testing of tumours of the ovary, cervix and uterus. Measurement of DNA metabolism by ³H-thymidine incorporation. *Aust N Z J. Obstet. Gynaecol*. 1986; 26: 288–294.
11. Svirnovski AI. Leukemia therapy personalization: role of some laboratory technologies. *Medical News*. 2013; 9: 6–11. In Russian. [Свирновский А.И. Персонализация терапии лейкозов: роль некоторых лабораторных технологий. *Мед. новости*. 2013; 9: 6–11].
12. Lv SQ, Kim YH, Giulio F, et al. Genetic alterations in microRNAs in medulloblastomas. *Brain Pathol*. 2012; 22: 230–239.
13. Ferriss JS, Rice LW. The role of in vitro directed chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 2010; 3: 49–54.
14. Pastwa E, Poplawski T, Lewandowska U, et al. Wortmannin potentiates the combined effect of etoposide and cisplatin in human glioma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2014; 53: 423–431.
15. Yung WK. *In vitro* chemosensitivity testing and its clinical application in human gliomas. *Neurosurg. Rev*. 1989; 12: 197–203.
16. Galderisi F, Stork L, Li J, Mori M, et al. Flow cytometric chemosensitivity assay as a predictive tool of early clinical response in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer*. 2009; 53: 543–550.
17. Zhai L, Li S, Li X. et al. The nuclear expression of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) in invasive primary breast tumors is associated with chemotherapy sensitivity. *Pathol. Res. Pract*. 2015; 211: 130–137.
18. Mehta RS, Bornstein R, Yu IR, et al. Breast cancer survival and in vitro tumour response in the extreme drug resistance assay. *Breast Cancer Res. Treat*. 2001; 66: 225–237.
19. Tiersten AD, Moon J, Smith HO, et al. Chemotherapy resistance as a predictor of progression-free survival in ovarian cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy and surgical cytoreduction followed by intraperitoneal chemotherapy: a Southwest Oncology Group Study. *Oncology*. 2009; 77: 395–399.
20. Lee JH, Um JW, Lee JH, et al. Can immunohistochemistry of multidrug-resistant proteins replace the histoculture drug response assay in colorectal adenocarcinomas? *Hepatogastroenterology*. 2012; 59: 1075–1078.
21. Lee SW, Kim YM, Kim MB, et al. In vitro chemosensitivity using the histoculture drug response assay in human epithelial ovarian cancer. *Acta Medica Okayama*. 2012; 66: 271–277.
22. Donnadieu J, Lachaier E, Peria M, et al. Short-term culture of tumour slices reveals the heterogeneous sensitivity of human head and neck squamous cell carcinoma to targeted therapies. *BMC Cancer*. 2016; 16: 273.
23. Baker FL, Spitzer G, Ajani JA, et al. Drug and radiation sensitivity measurements of successful primary monolayer culturing of human tumor cells using cell-adhesive matrix and supplemented medium. *Cancer Res*. 1986; 46: 1263–1274.
24. Elprana D, Schwachöfer J, Kuijpers W, et al. Cytotoxic drug sensitivity of squamous cell carcinoma as predicted by an in vitro testing model. *Anticancer Res*. 1989; 9: 1089–1094.
25. Strickland SA, Raptis A, Hallquist A. Correlation of the microculture-kinetic drug-induced apoptosis assay with patient outcomes in initial treatment of adult acute myelocytic leukemia. *Leuk. Lymph*. 2013; 54: 528–534.
26. Hultman B, Mahteme H, Sundbom M, et al. Benchmarking of gastric cancer sensitivity to anti-cancer drugs ex vivo as a basis for drug selection in systemic and intraperitoneal therapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2014; 33: 110.
27. Skehan P, Storeng R, Scudiero D. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst*. 1990; 82: 1107–1112.
28. Nagourney RA. *Ex vivo* programmed cell death and the prediction of response to chemotherapy. *Current Treat. in Options Oncol*. 2006; 7: 103–110.
29. Shen W, Hu J-A, Zheng J-Sh. Mechanism of temozolomide-induced antitumor effects on glioma cells. *J. of Intern. Medical Res*. 2014; 42: 164–172.
30. Zhao Z, He H, Wang C, et al. Downregulation of Id2 increases chemosensitivity of glioma. *Tumour Biol*. 2015; 36: 4189–4196.

31. Liu Z, Yang W, Long G, et al. Trace elements and chemotherapy sensitivity. *Biol. Trace Elem. Res.* 2016; 173: 283–290.
32. von Hoff DD, Sandbach JF, Clark GM, et al. Selection of cancer chemotherapy for a patient by an *in vitro* assay versus a clinician. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990; 82: 110–116.
33. Puck TT, Marcus PI, Cieciura SJ. Clonal growth of mammalian cells *in vitro*; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *J. Exp. Med.* 1956; 103: 273–283.
34. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumour stem cells. *Science.* 1977; 197: 461–463.
35. von Hoff DD, Clark GM, Stogdill BJ, et al. Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res.* 1983; 43: 1926–1931.
36. Weisenthal LM, Lippman ME. Clonogenic and nonclonogenic *in vitro* chemosensitivity assays. *Cancer Treat. Rep.* 1985; 69: 615–632.
37. Wolff JE, Trilling T, Mölenkamp G, et al. Chemosensitivity of glioma cells *in vitro*: a metaanalysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1999; 125: 481–486.
38. Fiebig HH, Maier A, Burger AM. Clonogenic assay with established human tumour xenografts. *Eur. J. Cancer.* 2004; 40: 802–820.
39. Salom E, Penalver M, Homesley H, et al. Correlation of pretreatment drug induced apoptosis in ovarian cancer cells with patient survival and clinical response. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 162.
40. Miyazaki R, Anayama T, Hirohashi K, et al. *In vitro* drug sensitivity tests to predict molecular target drug responses in surgically resected lung cancer. *PLoS One.* 2016; 11: e0152665.
41. Maurer HR, Ali-Osman F. Tumour stem cell cloning in agar-containing capillaries. *Naturwissenschaften.* 1981; 68: 381–383.
42. D'Arcangelo M, Todaro M, Salvini J, et al. Cancer stem cells sensitivity assay (STELLA) in patients with advanced lung and colorectal cancer: a feasibility study. *PLoS One.* 2015; 10: e0125037.
43. Kirkpatrick DL, Duke M, Goh TS. Chemosensitivity testing of fresh human leukemia cells using both a dye exclusion assay and a tetrazolium dye (MTT) assay. *Leuk. Res.* 1990; 14: 459–466.
44. Bosanquet AG, Bell PB, Burlton AR, et al. Correlation of bcl-2 with P-glycoprotein expression in chronic lymphocytic leukaemia and other haematological neoplasms but of neither marker with *ex vivo* chemosensitivity or patient survival. *Leuk. Lymphoma.* 1996; 24: 141–147.
45. Weisenthal LM, Marsden JA, Dill PL, Macaluso CK. A novel dye exclusion method for testing *in vitro* chemosensitivity of human tumours. *Cancer Res.* 1983; 43: 749–757.
46. Champion AR, Hanson JA, Venables SE, et al. Determination of radiosensitivity in established and primary squamous cell carcinoma cultures using the micronucleus assay. *Eur. J. Cancer.* 1997; 33: 453–462.
47. Udelnow A, Schönfelder M, Würl P, et al. *In vitro* chemosensitivity assay guided chemotherapy is associated with prolonged overall survival in cancer patients. *Pol. Przegląd Chirurg.* 2013; 85: 340–347.
48. Ge WQ, Pu JX, Zheng SY. Clinical application of the adenosine triphosphate-based response assay in intravesical chemotherapy for superficial bladder cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012; 13: 689–692.
49. Hetland TE, Kærn J, Skrede M, et al. Predicting platinum resistance in primary advanced ovarian cancer patients with an *in vitro* resistance index. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2012; 69: 1307–1314.
50. Hur H, Kim NK, Min BS, et al. Can a biomarker-based scoring system predict pathologic complete response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer? *Dis. Colon Rectum.* 2014; 57: 592–601.
51. Linz U, Ulus B, Neuloh G, et al. Can *in-vitro* chemoresponse assays help find new treatment regimens for malignant gliomas? *Anticancer Drugs.* 2014; 25: 375–384.
52. Kwon HY, Kim IK, Kang J, et al. *In vitro* adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay (ATP-CRA) as a predictor of clinical response to fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in stage II colorectal cancer. *Cancer Res. Treat.* 2016; 48: 970–977.
53. Park JS, Kim JK, Yoon DS. Correlation of early recurrence with *in vitro* adenosine triphosphate based chemotherapy response assay in pancreas cancer with postoperative gemcitabine chemotherapy. *J. Clin. Lab. Anal.* 2016; 30: 804–810.
54. Bosserman L, Prendergast F, Herbst R, et al. The microculture-kinetic (MiCK) assay: the role of a drug-induced apoptosis assay in drug development and clinical care. *Cancer Res.* 2012; 72: 3901–3905.
55. Yokosuka T, Goto H, Fujii H, et al. Flow cytometric chemosensitivity assay using JC-1, a sensor of mitochondrial transmembrane potential, in acute leukemia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2013; 72: 1335–1342.
56. Avelar-Freitas BA, Almeida VG, Pinto MC, et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2014; 47: 307–315.
57. Mathew ST, Johansson P, Gao Y, et al. A flow cytometry assay that measures cellular sensitivity to DNA-damaging agents, customized for clinical routine laboratories. *Clin. Biochem.* 2016; 49: 566–572.
58. Rogalińska M, Błoński JZ, Góralski P, et al. Relationship between *in vitro* drug sensitivity and clinical response of patients to treatment in chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Oncol.* 2015; 46: 1259–1267.
59. Higashiyama M, Okami J, Maeda J, et al. Differences in chemosensitivity between primary and paired metastatic lung cancer tissues: *in vitro* analysis based on the collagen gel droplet embedded culture drug test (CD-DST). *J. Thorac. Dis.* 2012; 4: 40–47.
60. Takebayashi K, Mekata E, Sonoda H, et al. Clinical potential of the anticancer drug sensitivity test for patients with synchronous stage IV colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2013; 72: 217–222.
61. Sakuma K, Tanaka A, Mataga I. Collagen gel droplet-embedded culture drugsensitivity testing in squamous cell carcinoma cell lines derived from human oral cancers: Optimal contact concentrations of cisplatin and fluorouracil. *Oncol. Lett.* 2016; 12: 4643–4650.
62. Keshelava N, Frgala T, Krejsa J, et al. DIMSCAN: a microcomputer fluorescence-based cytotoxicity assay for preclinical testing of combination chemotherapy. *Methods Mol. Med.* 2005; 110: 139–153.
63. Sylvan SE, Skribek H, Norin S, et al. Sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to small targeted therapeutic molecules: an *in vitro* comparative study. *Exp. Hematol.* 2016; 44: 38–49.
64. Suchy SL, Hancher LM, Wang D, et al. Chemoresponse assay for evaluating response to sunitinib in

- primary cultures of breast cancer. *Cancer Biol. Ther.* 2011; 11: 1059–1064.
65. Bhagwandin S, Naffouje S, Salti G. Utility of chemoresponse assay in patients undergoing cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Ann. Surg. Oncol.* 2015; 22: 2573–2577.
 66. Fischer-Fodor E, Moldovan N, Virag P, et al. The CellScan technology for *in vitro* studies on novel platinum complexes with organoarsenic ligands. *Dalton Trans.* 2008; 45: 6393–400.
 67. Giasson J, Chen Y. Mysterious stones. *Clin. Chem.* 2014; 60: 274–275.
 68. Chou CW, Wang CC, Wu CP, et al. Tumor cycling hypoxia induces chemoresistance in glioblastoma multiforme by upregulating the expression and function of ABCB1. *Neurooncol.* 2012; 14: 1227–1238.
 69. Tsaousis KT, Kopsachilis N, Tsiniopoulos IT, et al. Time-dependent morphological alterations and viability of cultured human trabecular cells after exposure to Trypan blue. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2013; 41: 484–490.
 70. Howard CM, Valluri J, Alberico A, et al. Analysis of chemopredictive assay for targeting cancer stem cells in glioblastoma patients. *Transl. Oncol.* 2017; 2: 241–254.
 71. Ruiz C, Kustermann S, Pietilä E, et al. Culture and drug profiling of patient derived malignant pleural effusions for personalized cancer medicine. *PLoS One.* 2016; 11: e0160807.
 72. Mourelatos D. Sister chromatid exchange assay as a predictor of tumor chemoresponse. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2016; 803–804: 1–12.
 73. Weiss A, Berndsen RH, Ding X, et al. A streamlined search technology for identification of synergistic drug combinations. *Sci Rep.* 2015; 5: 14508.
 74. Naipal KA, Verkaik NS, Sánchez H, et al. Tumor slice culture system to assess drug response of primary breast cancer. *BMC Cancer.* 2016; 16: 78.
 75. Wang MS, Luo Z, Nitin N. Rapid assessment of drug response in cancer cells using microwell array and molecular imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014; 406: 4195–4206.
 76. Roscilli G, De Vitis C, Ferrara FF, et al. Human lung adenocarcinoma cell cultures derived from malignant pleural effusions as model system to predict patients chemosensitivity. *J. Transl. Med.* 2016; 14: 61.
 77. Yu M, Bardia A, Aceto N, et al. Cancer therapy. *Ex vivo* culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science.* 2014; 345: 216–220.
 78. Karekla E, Liao WJ, Sharp B, et al. *Ex vivo* explant cultures of non-small cell lung carcinoma enable evaluation of primary tumor responses to anticancer therapy. *Cancer Res.* 2017; 77: 2029–2039.
 79. Yamazoe H, Hagihara Y, Kobayashi H. Multicomponent coculture system of cancer cells and two types of stromal cells for *in vitro* evaluation of anticancer drugs. *Tissue Eng. Part C Methods.* 2016; 22: 20–29.
 80. van de Wetering, Francies HE, Bounova G, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell.* 2015; 161: 933–945.
 81. Xu Z, Gao Y, Hao Y, et al. Application of a microfluidic chip-based 3D co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer. *Biomaterials.* 2013; 34: 4109–4117.
 82. Nagourney RA, Blitzer JB, Shuman RL, et al. Functional profiling to select chemotherapy in untreated, advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2012; 32: 4453–4460.
 83. Kiyohara Y, Yoshino K, Kubota S, et al. Drug screening and grouping by sensitivity with a panel of primary cultured cancer spheroids derived from endometrial cancer. *Cancer Sci.* 2016; 107: 452–460.
 84. Tsoy AM, Zaytseva-Zotova DS, Edelweiss EF, et al. Microencapsulated multicellular tumor spheroids as a novel *in vitro* model for drug screening. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* 2010; 4: 243–250. In Russian. [Цой А.М., Зайцева-Зотова Д.С., Эдельвейс Э.Ф. и др. Микрокапсулированные мультিকлеточные опухолевые сфероиды: получение и использование в качестве модели *in vitro* для тестирования лекарств. *Биомед. химия.* 2010; 56(6): 674–685].
 85. Leighton JA. Sponge matrix method for tissue culture; formation of organized aggregates of cells *in vitro*. *J. Natl. Cancer Inst.* 1951; 12: 545–561.
 86. Sherwin RP, Richters A, Yellin AE, et al. Histoculture of human breast cancers. *J. Surg. Oncol.* 1980; 13: 9–20.
 87. Kato R, Hasegawa K, Achiwa Y, et al. Predicting nedaplatin sensitivity of cervical cancer using the histoculture drug response assay. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2011; 32: 381–386.
 88. Su Y. Cancer chemosensitivity testing review. *J. Cancer Ther.* 2014; 5: 672–679.
 89. Mas C, Boda B, Caul Futy M, et al. Establishment of a tumour-stroma airway model (OncoCilAir) to accelerate the development of human therapies against lung cancer. *Altern. Lab. Anim.* 2016; 44: 479–485.
 90. Hagemann J, Jacobi C, Hahn M, et al. Spheroid-based 3D cell cultures enable personalized therapy testing and drug discovery in head and neck cancer. *Anticancer Res.* 2017; 37: 2201–2210.
 91. Pozzi V, Sartini D, Rocchetti R, et al. Identification and characterization of cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cell. Physiol. Biochem.* 2015; 36: 784–798.
 92. Horizon 2020 newsroom editor. Better combination therapies for colorectal cancer patients. <http://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/en/news/better-combination-therapies-colorectal-cancer-patients>. (14 Sep 2015).
 93. Saunders JH, Onion D, Collier P, et al. Individual patient oesophageal cancer 3D models for tailored treatment. *Oncotarget.* 2017; 8: 24224–24236.
 94. Majumder B, Baraneedharan U, Thiagarajan S, et al. Predicting clinical response to anticancer drugs using an *ex vivo* platform that captures tumour heterogeneity. *Nat. Commun.* 2015; Vol. 6: 6169.
 95. Hattersley SM, Sylvester DC, Dyer CE, et al. A microfluidic system for testing the responses of head and neck squamous cell carcinoma tissue biopsies to treatment with chemotherapy drugs. *Ann. Biomed. Eng.* 2012; 40: 1277–1288.
 96. Matsuo K, Bond VK, Im DD, et al. Prediction of chemotherapy response with platinum and taxane in the advanced stage of ovarian and uterine carcinosarcoma: a clinical implication of *in vitro* drug resistance assay. *Am. J. Clin. Oncol.* 2010; 33: 358–363.
 97. Arienti C, Tesei A, Verdecchia GM, et al. Role of conventional chemosensitivity test and tissue biomarker expression in predicting response to treatment of peritoneal carcinomatosis from colon cancer. *Clin. Colorectal Cancer.* 2013; 12: 122–127.

98. Zhang J, Li H. Heterogeneity of tumor chemosensitivity in ovarian epithelial cancer revealed using the adenosine triphosphate tumor chemosensitivity assay. *Oncol. Lett.* 2015; 9: 2374–2380.
99. Gwe Ahn S, Ah Lee S, Woo LH, et al. *In vitro* chemoresponse assay based on the intrinsic subtypes in breast cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2014; 44: 624–631.
100. Neubauer H, Stefanova M, Solomayer E, et al. Predicting resistance to platinum-containing chemotherapy with the ATP tumor chemosensitivity assay in primary ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2008; 28: 949–955.
101. Andreotti PE, Cree IA, Kurbacher CM, et al. Chemosensitivity testing of human tumours using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 1995; 55: 5276–5282.
102. Kim JH, Lee KW, Kim YH, et al. Individualized tumor response testing for prediction of response to paclitaxel and cisplatin chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *J. Korean Med. Sci.* 2010; 25: 684–690.
103. Kitten CM, von Hoff DD, Bennett EV Jr, et al. The human tumor clonogenic assay in the treatment of patients with lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* 1983; 36: 408–410.
104. Bertelsen CA, Sondak VK, Mann BD, et al. Chemosensitivity testing of human solid tumors. A review of 1582 assays with 258 clinical correlations. *Cancer.* 1984; 53: 1240–1245.
105. Higashiyama M, Oda K, Okami J, et al. *In vitro* chemosensitivity test using the collagen gel droplet embedded culture drug test (CD-DST) for malignant pleural mesothelioma: Possibility of clinical application. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2008; 14: 355–362.
106. Kawamura M, Gika M, Abiko T, et al. Clinical evaluation of chemosensitivity testing for patients with unresectable non-small cell lung cancer (NSCLC) using collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST). *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2007; 59: 507–513.
107. Kobayashi H, Tanisaka K, Doi O, et al. An *in vitro* chemosensitivity test for solid human tumors using collagen gel droplet embedded cultures. *Int. J. Oncol.* 1997; 11: 449–455.
108. Tian C, Sargent DJ, Krivak TC, et al. Evaluation of a chemoresponse assay as a predictive marker in the treatment of recurrent ovarian cancer: Further analysis of a prospective study. *Br. J. Cancer.* 2014; 111: 843–850.
109. Grigsby PW, Zigelboim I, Powell MA, et al. *In vitro* chemoresponse to cisplatin and outcomes in cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 2013; 130: 188–191.
110. Herzog TJ, Krivak TC, Fader AN, et al. Chemosensitivity testing with ChemoFx and overall survival in primary ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2010; 203: e1–6.
111. von Heideman A, Tholander B, Grundmark B, et al. Chemotherapeutic drug sensitivity of primary cultures of epithelial ovarian cancer cells from patients in relation to tumour characteristics and therapeutic outcome. *Acta Oncol.* 2014; 53: 242–250.
112. Wu B, Zhu JS, Zhang Y, et al. Predictive value of MTT assay as an *in vitro* chemosensitivity testing for gastric cancer: one institution's experience. *World J. Gastroenterol.* 2008; 14: 3064–3068.
113. Kabeshima Y, Kubota T, Watanabe M, et al. Clinical usefulness of chemosensitivity test for advanced colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2002; 22: 3033–3037.
114. Xu X, Dai H, Zhao Y, et al. *In vitro* chemosensitivity assay of ascites in epithelial ovarian cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2013; 34: 559–564.
115. Taylor CG, Sargent JM, Elgie AW, et al. Chemosensitivity testing predicts survival in ovarian cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2001; 22: 278–282.
116. Jung PS, Kim DY, Kim MB, et al. Progression-free survival is accurately predicted in patients treated with chemotherapy for epithelial ovarian cancer by the histoculture drug response assay in a prospective correlative clinical trial at a single institution. *Anticancer Res.* 2013; 33: 1029–1034.
117. Yoon YS, Kim CW, Roh SA, et al. Applicability of histoculture drug response assays in colorectal cancer chemotherapy. *Anticancer Res.* 2012; 32: 3581–3586.
118. Pathak KA, Juvekar AS, Radhakrishnan DK, et al. *In vitro* chemosensitivity profile of oral squamous cell cancer and its correlation with clinical response to chemotherapy. *Indian J. Cancer.* 2007; 44: 142–146.
119. Bounaix Morand du Puch C, Nouaille M, Giraud S, et al. Chemotherapy outcome predictive effectiveness by the Oncogramme: Pilot trial on stage-IV colorectal cancer. *J. Transl. Med.* 2016; 14: 10.
120. Halfter K, Ditsch N, Kolberg HC, et al. Prospective cohort study using the breast cancer spheroid model as a predictor for response to neoadjuvant therapy — The SpheroNEO study. *BMC Cancer.* 2015; 15: 519.
121. Kodera Y, Ito S, Fujiwara M, et al. *In vitro* chemosensitivity test to predict chemosensitivity for paclitaxel, using human gastric carcinoma tissues. *Int. J. Clin. Oncol.* 2006; 11: 449–453.
122. Jung PS, Kim DY, Kim MB, et al. Progression-free survival is accurately predicted in patients treated with chemotherapy for epithelial ovarian cancer by the histoculture drug response assay in a prospective correlative clinical trial at a single institution. *Anticancer Res.* 2013; 33: 1029–1034.
123. Furukawa T, Kubota T, Hoffman RM. Clinical applications of the histoculture drug response assay. *Clin. Cancer Res.* 1995; 1: 305–311.
124. Blumenthal RD, Goldenberg DM. Methods and goals for the use of *in vitro* and *in vivo* chemosensitivity testing. *Mol. Biotechnol.* 2007; 35: 185–197.
125. Weisenthal LM, Nygren P. Current status of cell culture drug resistance testing (CCDRT). 2002. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/237347352>. (08.12.2015).
126. Kubota T, Weisenthal L. Chemotherapy sensitivity and resistance testing: to be “standard” or to be individualized, that is the question. *Gastric. Cancer.* 2006; 9: 82–87.
127. Volm M, Efferth T. Prediction of cancer drug resistance and implications for personalized medicine. *Front Oncol.* 2015; 5: 282.
128. Peng TC, Wang CC, Kao TW, et al. Relationship between hyperuricemia and lipid profiles in US adults. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015: 127596.
129. Chen F, Cushion MT. Use of an ATP bioluminescent assay to evaluate viability of *Pneumocystis carinii* from rats. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 2791–2800.
130. Huh WK, Cibull M, Gallion HH, et al. Consistency of *in vitro* chemoresponse assay results and population clinical response rates among women with endometrial carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2011; 21: 494–499.

131. Burstein HJ, Mangu PB, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on the use of chemotherapy sensitivity and resistance assays. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 3328–3330.

Информация об авторах:

Чернов Александр Николаевич, научный сотрудник отдела микробиологии, клеточных технологий и молекулярной биологии Центра доклинических и трансляционных исследований Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»;

Баранцевич Елена Петровна, д.м.н., заведующая НИО микробиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»;

Калюнов Владимир Николаевич, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»;

Галагудза Михаил Михайлович, д.м.н., член-корреспондент РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»;

Author information:

Aleksandr N. Chernov, researcher, the department of microbiology, Almazov National medical research centre;

Elena P. Barantsevich, Dr. Sci., head of the department of microbiology, Almazov National medical research centre;

Vladimir N. Kalunov, Dr. Sci., Prof., leading researcher, laboratory of neurophysiology, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus;

Mikhail M. Galagudza, Dr. Sci., Prof., head of the Experimental medicine Institute, Almazov National medical research centre.

ПОВТОРНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ФЕТОСКОПИЧЕСКОЙ ЛАЗЕРНОЙ КОАГУЛЯЦИИ АНАСТОМОЗОВ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ РЕЦИДИВЕ ФЕТО-ФЕТАЛЬНОГО ТРАНСФУЗИОННОГО СИНДРОМА

Михайлов А.В.^{1,2,3}, Романовский А.Н.^{1,2}, Овсянников Ф.А.⁴, Каштанова Т.А.¹, Кянксеп И.В.¹,
Кянксеп А.Н.^{1,5}, Кузнецов А.А.^{1,3}, Шлыкова А.В.^{1,2}, Мовчан В.Е.^{1,2}

¹ Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Родильный дом 17», Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. Алмазова», Санкт-Петербург, Россия

⁵ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация

Романовский Артем Николаевич
СПбГБУЗ «Родильный дом 17»
ул. Леснозаводская, д. 4/1, Санкт-Петербург, Россия, 193174
Email: artemrom@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 19.06.2018
и принята к печати 01.08.2018.

Резюме

Рецидив фето-фетального трансфузионного синдрома (ФФТС) после проведения фетоскопической лазерной коагуляции (ФЛК) анастомозов плаценты является неблагоприятным осложнением. Повторно-рождающей 34 лет в связи с ФФТС II стадии при сроке 22 2/7 недели в клинике СПбГБУЗ «Родильный дом 17» была выполнена ФЛК 8 артерио-венозных анастомозов плаценты с последующей амниоредукцией 1000 мл. При сроке 24 6/7 недели был выявлен рецидив ФФТС, с формированием выраженного многоводия у плода-реципиента и ангидрамниона у донора, в связи с чем при сроке 25 1/7 недель выполнена повторная ФЛК с коагуляцией 5 резидуальных анастомозов и амниоредукцией в объеме 2000 мл. На 5 сутки была отмечена нормализация количества околоплодных вод обоих плодов. При сроке 32 0/7 недели самостоятельно вступила в роды и была родоразрешена через естественные родовые пути, вес плодов составил 1560 и 1600 г, оценка по шкале Апгар 8/9 баллов у обоих новорожденных. Респираторная терапия после перевода детей в ОРИТН продолжалась в течение 7 часов у второй новорожденной, и в течение 13 часов у первой новорожденной девочки. В динамике признаков дыхательной недостаточности не отмечалось. Разницы в показателях красной крови не отмечалось. Данный клинический случай подтверждает возможность эффективной коррекции рецидива ФФТС с помощью повторной ФЛК. Расширение показаний к повторной ФЛК представляет собой резерв для улучшения показателей выживаемости плодов при ФФТС.

Ключевые слова: Фето-фетальный трансфузионный синдром, фетоскопическая лазерная коагуляция анастомозов плаценты, рецидив фето-фетального трансфузионного синдрома, резидуальные анастомозы.

Для цитирования: Михайлов А.В., Романовский А.Н., Овсянников Ф.А. и соавт. Повторное применение фетоскопической лазерной коагуляции анастомозов плаценты при рецидиве фето-фетального трансфузионного синдрома. Трансляционная медицина. 2018; 5 (3): 66–69.

EXPERIENCE OF REPEATED FETOSCOPIC LASER COAGULATION OF PLACENTAL ANASTOMOSES IN CASE OF RECURRENCE OF TWIN-TO-TWIN TRANSFUSION SYNDROME

Mikhailov A.V.^{1,2,3}, Romanovsky A.N.^{1,2}, Ovsyannikov P.A.⁴,
Kashtanova T.A.¹, Kyanksep I.V.¹, Kyanksep A.N.^{1,5},
Kuznetsov A.A.^{1,3}, Shlykova A.V.^{1,2}, Movchan V.E.^{1,2}

Corresponding author:

Artem N. Romanovsky
Maternity Clinic №17
Lesnozavodskaya str. 4/1, Saint Petersburg,
Russia, 193174
Email: artemrom@yandex.ru

¹ Saint Petersburg State “Maternity Clinic №17”, Saint Petersburg, Russia

² North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

³ Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

⁴ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

⁵ Federal state budgetary institution of higher professional education “Saint Petersburg State Pediatric Medical University” of the ministry of healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

Received 19 June 2018; accepted 01 August 2018.

Abstract

Recurrence of twin-to-twin transfusion syndrome (TTTS) after fetoscopic laser coagulation (FLC) of placental anastomoses is unfavorable complication. Multiparous woman 34 years old in TTTS stage 2 was performed FLC of 8 arteriovenous anastomoses of the placenta followed by amnioreduction of 1000 ml on the gestational age of 22 weeks and 2 days. At gestational age of 24 weeks 6 days was revealed a recurrence of the TTTS, with considerable polyhydramnion of recipient and anhydramnion of the donor, a repeated FLC of 5 residual placental anastomoses was performed and amnioreduction of 2000 ml at 25 weeks 1 day of gestation. On the fifth day was normalized the amount of amniotic fluid of both fetuses. At 32 weeks of gestation spontaneously was began the birth, the weights of newborns were 1560 and 1600 g, both had Apgar score 8/9. Respiratory therapy continued for 7 hours at the second newborn and for 13 hours at the first newborn girl after transferring to the ICU. The signs of the respiratory failure were not observed. There were no differences between complete blood counts. This clinical case confirms the possibility of effective correction of recurrence TTTS with the help of repeated FLC of placental anastomoses.

Key words: twin-to-twin transfusion syndrome, fetoscopic laser coagulation of placental anastomoses, recurrence of twin-to-twin transfusion syndrome, residual anastomoses

For citation: Mikhailov A.V., Romanovsky A.N., Ovsyannikov P.A. Experience of repeated fetoscopic laser coagulation of placental anastomoses in case of recurrence of twin-to-twin transfusion syndrome. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2018; 5 (1): 66–69. (In Russ.)

Фетоскопическая лазерная коагуляция анастомозов плаценты по мнению большинства исследователей является оптимальным методом лечения фето-фетального трансфузионного синдрома (ФФТС) при сроке 18-26 недель беременности. Несмотря на впечатляющие успехи в лечении ФФТС, достигнутые в последние 20 лет, фетоскопическая лазерная коагуляция по-прежнему считается слож-

ным фетоскопическим вмешательством с высоким риском развития послеоперационных осложнений, таких как преждевременное излитие околоплодных вод, ятрогенная септостомия (разрыв межамниотической мембраны), рецидив ФФТС, ятрогенный синдром анемии-полицитемии, гибель одного плода из двойни, синдром “зеркала” (синдром Бал-лантайна) [1,2,3,4,5,6,7,8].

Рецидив ФФТС после проведения фетоскопической лазерной коагуляции анастомозов плаценты является частым (18 %) и неблагоприятным осложнением, резко ухудшающим перинатальные исходы. Долгое время единственным методом коррекции этого состояния считалось применение серийных амниоредукций [1,9,10].

Описание клинического случая. Повторнородящая 34 лет была направлена в СПбГБУЗ “Родильный дом 17” при сроке 22 недели в связи с ФФТС II стадии, а также истмико-цервикальной недостаточностью, корригированной применением серкляжного пессария. При осмотре диагноз был подтвержден, в связи с чем при сроке 22 2/7 недели была выполнена фетоскопическая лазерная коагуляция 8 артерио-венозных анастомозов плаценты с последующей амниоредукцией 1000 мл, плацента локализовалась по передней стенке матки. При динамическом наблюдении при сроке 24 6/7 недели был выявлен рецидив ФФТС, с повторным формированием выраженного многоводия у плода-реципиента (максимальный вертикальный карман 110 мм) и ангидрамниона у донора, а также нарушением плодов-плацентарной гемодинамики II степени обоих плодов, в связи с чем при сроке 25 1/7 недель была выполнена повторная фетоскопическая лазерная коагуляция 5 резидуальных анастомозов и амниоредукцией в объеме 2000 мл. На 5 сутки была отмечена нормализация гемодинамики обоих плодов, при сохранении ангидрамниона плода-донора, на 5 сутки выявлена нормализация количества околоплодных вод обоих плодов. В дальнейшем беременная наблюдалась амбулаторно в динамике каждые 2 недели. При сроке 32 0/7 недели у пациентки развилась спонтанная родовая деятельность и учитывая окончание первого периода родов на момент поступления в родильное отделение, а также удовлетворительное состояние плодов, была родоразрешена через естественные родовые пути, вес плодов составил 1560 и 1600 г, оценка по шкале Апгар 8/9 баллов у обоих новорожденных. Респираторная терапия после перевода детей в ОРИТН продолжалась в течение 7 часов у второй новорожденной, и в течение 13 часов у первой новорожденной девочки. В динамике признаков дыхательной недостаточности не отмечалось, дети находились на самостоятельном дыхании. При обследовании после рождения в клиническом анализе крови разницы в показателях красной крови не отмечалось. Энтеральное питание было начато с первых суток жизни. На 5 сутки жизни для дальнейшего выхаживания, новорожденные были переведены в стационар.

Обсуждение и выводы. Рецидивирование ФФТС после выполнения фетоскопической лазерной коагуляции связано с резидуальными анастомозами,

которые представляют собой анастомозы, не выявленные во время операции вследствие их малого диаметра, особенностей локализации, компрессии при выраженном многоводии или реваскуляризованные после недостаточной коагуляции. Рецидив может развиваться как сразу после операции фетоскопической лазерной коагуляции, так и спустя несколько недель [1,5,6,10,11]. Некоторые исследователи предполагают, что причиной рецидива ФФТС могут быть артерио-артериальные и вено-венозные анастомозы, которые после проведения фетоскопической лазерной коагуляции могут становиться односторонними, чаще обеспечивая сброс крови в направлении от реципиента к донору [10,11,12]. Рецидивирование ФФТС представляет собой сложную проблему, подходы к коррекции которой пока окончательно не определены. Выполнение повторной лазерной коагуляции длительное время считалось сложным вмешательством в силу вероятного ухудшения визуализации после первичной фетоскопической лазерной коагуляции. Однако в последние годы повторная фетоскопическая лазерная коагуляция все чаще предлагается в качестве оптимального метода лечения рецидива [13].

Данный клинический случай подтверждает возможность эффективной коррекции рецидива ФФТС с помощью повторной фетоскопической лазерной коагуляции. С нашей точки зрения, в случае отсутствия при предыдущем вмешательстве документированного в протоколе кровотечения из коагулируемых анастомозов и наличия выраженного многоводия у плода-реципиента, повторная фетоскопическая лазерная коагуляция целесообразна в качестве метода выбора. Кроме того, в данной клинической ситуации после повторного вмешательства отмечена нормализация плодов-плацентарной гемодинамики обоих плодов, а также отсутствие признаков синдрома анемии-полицитемии после родоразрешения через естественные родовые пути. Заключение. Расширение показаний к повторной фетоскопической лазерной коагуляции представляет собой резерв для улучшения показателей выживаемости плодов при ФФТС.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

1. Habli M, Bombrys A, Lewis D et al. Incidence of complications in twin-twin transfusion syndrome after selective fetoscopic laser photocoagulation: a single-center experience. Am. J. Obstet. Gynecol. 2009; 201: 417.e1-7.
2. Mikhailov AV, Romanovsky AN, Shlykova AV et al. Specific complications of monochorionic multiple

pregnancy — twin-twin transfusion syndrome and anemia-polycythemia syndrome. *Obstet Gynecol.* 2016; 2: 18-23. In Russian [Михайлов А.В., Романовский А.Н., Шлыкова А.В., Кузнецов А.А. Специфические осложнения монохориального многоплодия — фето-фетальный трансфузионный синдром и синдром анемии-полицитемии. *Акушерство и гинекология Санкт-Петербурга.* 2017; 2: 18-23].

3. Mikhailov A., Romanovsky A. Multiple pregnancy under ultrasound umbrella. *Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology.* 2011; 5 (3): 219-230.

4. Mikhailov AV, Romanovsky AN, Kashtanova TA et al. Experience of laser coagulation of vascular placental anastomoses in twin-twin transfusion syndrome. *Vestnik Rossijskoi voenno-medicinskoi akademii.* 2016; 3 (55): 47-50. In Russian [Михайлов А.В., Романовский А.Н., Каштанова Т.А., Новикова А.В., Шлыкова А.В., Потанин С.А., Кузнецов А.А. Опыт применения лазерной коагуляции сосудистых анастомозов плаценты при фето-фетальном трансфузионном синдроме. *Вестник Российской военно-медицинской академии.* 2016; 3 (55): 47-50].

5. Mikhailov AV, Romanovsky AN, Shlykova AV et al. Laser coagulation of vascular placental anastomoses in twin-twin transfusion syndrome. *Tavrisheskiy medico-biologicheskij vestnik.* 2016; 19(2): 167-171. In Russian [Михайлов А.В., Романовский А.Н., Шлыкова А.В., Кузнецов А.А., Каштанова Т.А., Новикова А.В., Потанин С.А. Применение лазерной коагуляции сосудистых анастомозов плаценты при фето-фетальном трансфузионном синдроме. *Таврический медико-биологический вестник.* 2016; 19 (2): 167-171].

6. Ovsyannikov FA, Romanovsky AN. Current treatment of twin-twin transfusion syndrome. *Translyatsionnaya meditsina.* 2017; 4(4): 36-42. In Russian [Овсянников Ф.А., Романовский А.Н. Современные подходы к лечению фето-фетального трансфузионного синдрома. *Трансляционная медицина.* 2017; 4 (4): 36-42].

7. Khalek N, Johnson MP, Bebbington MW. Fetoscopic laser therapy for twin-to-twin transfusion syndrome. *Seminars in Pediatric Surgery.* 2013; 22: 18-23.

8. WAPM consensus group on Twin-to-Twin Transfusion, Baschat A, Chmait RH, Deprest J et al. Twin-to-twin transfusion syndrome (TTTS). *J Perinat Med.* 2011; 39(2):107 — 112.

9. Quintero RA, Ishii K, Chmait RH et al. Sequential selective laser photocoagulation of communicating vessels in twin-twin transfusion syndrome. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2007; 20(10):763-8.

10. Chmait RH, Assaf SA, Benirschke K. Residual vascular communications in twin-twin transfusion syndrome treated with sequential laser surgery: frequency and clinical implications. *Placenta.* 2010; 31: 611-614.

11. De Lia J, Fisk N, Hecher K et al. Twin-to-twin transfusion syndrome — debates on the etiology, natural history and management. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2000; 16(3): 210-213.

12. Roberts D. Interventions for twin-twin transfusion syndrome: a Cochrane review. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008; 31(6): 701-11.

13. Chmait RH, Korst LM, Llanes A et al. Perioperative characteristics associated with preterm birth in twin-twin transfusion syndrome treated by laser surgery. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2013; 209: 264.e1-8.

Информация об авторах:

Михайлов Антон Валерьевич, д.м.н., профессор, главный врач СПб ГБУЗ «Родильный дом №17», заве-

дующий кафедрой репродуктивного здоровья женщин СЗГМУ им. И.И. Мечникова, главный акушер-гинеколог Санкт-Петербурга, главный акушер-гинеколог Министерства Здравоохранения РФ в СЗФО;

Романовский Артем Николаевич, врач родильного отделения СПб ГБУЗ «Родильный дом №17», ассистент кафедры репродуктивного здоровья женщин СЗГМУ им. И.И. Мечникова;

Каштанова Татьяна Александровна, заведующая отделением пренатальной диагностики СПб ГБУЗ «Родильный дом №17»;

Овсянников Филипп Андреевич, к.м.н, врач акушер-гинеколог ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Кянксеп Инна Викторовна, врач отделения пренатальной диагностики СПб ГБУЗ «Родильный дом №17»;

Кянксеп Алексей Николаевич, заместитель главного врача по неонатологии СПб ГБУЗ «Родильный дом №17», ассистент кафедры неонатологии и неонатальной реаниматологии ФП и ДПО ГБОУ ВПО СПбГПМУ Минздрава России;

Кузнецов Александр Александрович, врач родильного отделения СПб ГБУЗ «Родильный дом №17», аспирант кафедры акушерства и гинекологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова;

Шлыкова Анна Вячеславовна, врач родильного отделения СПб ГБУЗ «Родильный дом №17», заочный аспирант кафедры акушерства и гинекологии С.Н. Давыдова СЗГМУ им. И.И. Мечникова;

Мовчан Вероника Евгеньевна, клинический ординатор кафедры акушерства и гинекологии им. С.Н. Давыдова СЗГМУ им. И.И. Мечникова;

Author information:

Anton V. Mikhailov, MD, PhD, prof., director and chief of Maternity Clinic №17, chief of department of women's reproductive health of Mechnikov NW State Medical University, chief obstetrician-gynecologist of St. Petersburg and NW Region of Russian Federation;

Artem N. Romanovsky, MD, maternity department doctor of Maternity Clinic №17, assistant of department of women's reproductive health of Mechnikov NW State Medical University;

Tatiana A. Kashtanova, MD, chief of department of prenatal diagnostics of Maternity Clinic №17;

Fillip A. Ovsyannikov, PhD, obstetrician-gynecologist, Almazov National Medical Research Centre;

Inna V. Kyanksep, MD, doctor of department of prenatal diagnostics of Maternity Clinic №17;

Alexey N. Kyanksep, MD, subchief of Maternity Clinic №17 in neonatology, assistant of department of neonatology and neonatological reanimatology of St. Petersburg state pediatric medical university;

Alexander A. Kuznetsov, MD, maternity department doctor of Maternity Clinic №17, PhD student of obstetrics and gynecology department of academician I.P. Pavlov first Saint Petersburg state medical university;

Anna V. Shlykova, MD, maternity department doctor of Maternity Hospital №17, PhD student of obstetrics and gynecology department of S.N. Davydov of Mechnikov NW State Medical University;

Veronika E. Movchan, resident of obstetrics and gynecology department of S.N. Davydov of Mechnikov NW State Medical University.