



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

Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 8 №5 / 2021

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



ПЕТРУ ПЕРВОМУ
ЕКАТЕРИНА ВТОРАЯ
АВГА 1713



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

Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 8 №5 / 2021

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)	М. А. Карпенко (Санкт-Петербург)
Е. И. Баранова (Санкт-Петербург)	Э. В. Комличенко (Санкт-Петербург)
Е. Р. Баранцевич (Санкт-Петербург)	А. А. Костарева (Санкт-Петербург)
Т. В. Вавилова (Санкт-Петербург)	Д. С. Лебедев (Санкт-Петербург)
А. В. Васильев (Москва)	Ю. Б. Лишманов (Томск)
М. Л. Гордеев (Санкт-Петербург)	О. М. Моисеева (Санкт-Петербург)
Е. Н. Гринёва (Санкт-Петербург)	А. О. Недошивин (Санкт-Петербург)
А. А. Жлоба (Санкт-Петербург)	И. Л. Никитина (Санкт-Петербург)
А. Ю. Зарицкий (Санкт-Петербург)	Е. В. Пармон (Санкт-Петербург)
Э. Э. Звартау (Санкт-Петербург)	Д. В. Рыжкова (Санкт-Петербург)
Д. О. Иванов (Санкт-Петербург)	

**ЧЛЕНЫ МЕЖДУНАРОДНОГО
РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА**

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

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

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

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

Тематическая рассылка по специалистам.

Верстка — Л. П. Попова. Корректурa — А. В. Медведева

18+

Издательство «ФОНД АЛМАЗОВА»

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

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

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

Подписка по каталогу агентства «Роспечать»: подписной индекс 57996

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

Все права защищены. © 2021.

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

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов

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

**EDITOR-IN-CHIEF**

E. Shlyakhto

VICE-EDITORS

A. Konradi

M. Galagudza

TECHNICAL EDITOR

N. Smolina

EDITORIAL BOARD

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

MEMBERS**OF THE INTERNATIONAL
EDITORIAL BOARD**

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

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

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

Periodicity — 6 issues per year. Edition 1100 copies.

Distribution to specialists.

18+

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

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. © 2021.

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

CONTENT

НЕВРОЛОГИЯ

NEUROLOGY

5 Чайковская А. Д., Топузова М. П., Маханова А. М., Михеева А. Г., Короткова Д. С., Пospelova M. L., Панина Е. Б., Вавилова Т. В., Васильева Е. Ю., Симаков К. В., Сергеева Т. В., Алексеева Т. М.
РОЛЬ НЕЙРОН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЕНОЛАЗЫ, ГЛИАЛЬНОГО ФИБРИЛЛЯРНОГО КИСЛОГО БЕЛКА И NR2-АНТИТЕЛ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

21 Марченко Е. В., Александров А. М., Одинцова Г. В., Чухловин А. А.
ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДОВ МОНИТОРИНГА БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ВИСОЧНОЙ ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

ТКАНЕВЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

29 Вахрушев Ю. А., Козырева А. А., Жук С. В., Ротарь О. П., Костарева А. А.
АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ И СПЕКТРА ВАРИАНТОВ В ГЕНЕ ТАЙТИНА В УСЛОВНО ЗДОРОВОЙ РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

38 Мишанин А. И., Панина А. Н., Бобасов Е. Н., Твердохлебов С. И., Головкин А. С.
БИОСОВМЕСТИМОСТЬ СКАФФОЛДОВ ИЗ СМЕСЕЙ И СОПОЛИМЕРОВ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ТЕСТАХ С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

50 Полещенко Я. И., Процак Е. С., Дружининский Д. А., Галагудза М. М., Минасян С. М., Борщев Ю. Ю., Курилов А. Б., Сонин Д. Л.
МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ СЕРДЦА У АСИСТОЛИЧЕСКИХ ДОНОРОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

57 Кузнецов С. И., Киричук О. П., Буркова Н. В., Юрьев Г. О., Даванков В. А., Постнов В. Н., Романчук Е. В., Свиридов Э. Е., Киселева А. Д.
СРАВНЕНИЕ АКТИВАЦИОННЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ГЕМОСОРБЕНТОВ ПО СКОРОСТИ АДГЕЗИИ КЛЕТКИ КРОВИ IN VITRO

5 Chaykovskaya A. D., Topuzova M. P., Makhanova A. M., Mikheeva A. G., Korotkova D. S., Pospelova M. L., Panina E. B., Vavilova T. V., Vasilieva E. Yu., Simakov K. V., Sergeeva T. V., Alekseeva T. M.
ROLE OF NEURON-SPECIFIC ENOLASE, GLIAL FIBRILLAR ACIDIC PROTEIN AND NR2-ANTIBODIES IN EARLY DIAGNOSTIC OF ISCHEMIC STROKE

21 Marchenko E. V., Aleksandrov A. M., Odintsova G. V., Chukhlovina A. A.
DIAGNOSTIC EFFICIENCY OF MONITORING METHODS OF BRAIN BIOELECTRIC ACTIVITY IN TEMPORAL LOBE PHARMACORESISTANT EPILEPSY

CELL, TISSUE, AND THERAPY

29 Vakhrushev Yu. A., Kozyreva A. A., Zhuk S. V., Rotar' O. P., Kostareva A. A.
ASSAY OF FREQUENCY AND SPECTRUM OF GENETIC VARIANTS IN TTN IN HEALTHY RUSSIAN POPULATION

38 Mishanin A. I., Panina A. N., Bolbasov E. N., Tverdokhlebov S. I., Golovkin A. S.
BIOCOMPATIBILITY OF ELECTROSPINNING POLYCAPROLACTONE, POLYLACTIC ACID, THEIR BLENDS AND COPOLYMERS SCAFFOLDS IN IN VITRO TESTS IF MESENCHYME STEM CELLS

EXPERIMENTAL STUDIES

50 Poleschenko Ya. I., Protsak E. S., Druzhininsky D. A., Galagoudza M. M., Minasian S. M., Borshchev Yu. Yu., Kurilov A. B., Sonin D. L.
METHODOLOGY OF ASYSTOLIC DONOR HEART'S CONDITION STUDY IN AN EXPERIMENT USING SMALL LABORATORY ANIMALS

57 Kuznetsov S. I., Kirichuk O. P., Burkova N. V., Yuriev G. O., Davankov V. A., Postnov V. N., Romanchuk E. V., Sviridov E. E., Kiseleva A. D.
COMPARISON OF THE ACTIVATION CAPABILITIES OF HEMOSORBENTS BY ADHESION RATE OF BLOOD CELLS IN VITRO

РОЛЬ НЕЙРОН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЕНОЛАЗЫ, ГЛИАЛЬНОГО ФИБРИЛЛЯРНОГО КИСЛОГО БЕЛКА И NR2-АНТИТЕЛ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

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

Контактная информация:
Чайковская Александра Дмитриевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: mumu6394@gmail.com

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

² Санкт-Петербургское государственное бюджетное
учреждение здравоохранения «Городская больница Святой
преподобномученицы Елизаветы», Санкт-Петербург, Россия

Статья поступила в редакцию 01.11.2021
и принята к печати 16.11.2021.

Резюме

Актуальность. Применение панели биомаркеров ишемического инсульта (ИИ) может способствовать более точной и быстрой диагностике и определению оптимального подхода к ведению пациентов. **Цель.** Уточнить значения нейрон-специфической енолазы (НСЕ), глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) и антител к NR2-субъединице NMDA-рецептора (NR2-антитела) в остром периоде ИИ в динамике, сравнить с показателями пациентов без ИИ, оценить взаимосвязь с тяжестью неврологических нарушений и краткосрочным исходом, установить чувствительность и специфичность панели биомаркеров. **Материалы и методы.** Обследованы 63 пациента с ИИ и 31 человек (11 с хронической ишемией мозга (ХИМ) и 20 здоровых добровольцев) в качестве группы сравнения. **Результаты.** Значения НСЕ и ГФКБ у группы ИИ в начале заболевания превышали пороговые значения и значительно снижались к 10-14 дню, а значения NR2-антител в начале заболевания были ниже, чем в группах сравнения и повышались к 10-14 дню заболевания. У пациентов с неблагоприятным краткосрочным исходом ИИ был отмечен более высокий уровень НСЕ, ГФКБ и NR2-антител. Панель данных биомаркеров обладает более высокой чувствительностью и специфичностью по сравнению с использованием их по отдельности. **Заключение.** Исследованные вещества могут применяться в качестве панели биомаркеров при ИИ для диагностики, контроля степени повреждения мозга, оценки состояния пациента в динамике и прогнозирования краткосрочного исхода заболевания.

Ключевые слова: биомаркеры, глиальный фибриллярный кислый белок, инсульт, нейрон-специфическая енолаза, NR2-антитела.

Для цитирования: Чайковская А.Д., Топузова М.П., Маханова А.М. и др. Роль нейрон-специфической енолазы, глиального фибриллярного кислого белка и NR2-антител в ранней диагностике ишемического инсульта. *Трансляционная медицина.* 2021; 8 (5):5-20. DOI 10.18705/2311-4495-2021-8-5-5-20

ROLE OF NEURON-SPECIFIC ENOLASE, GLIAL FIBRILLAR ACIDIC PROTEIN AND NR2-ANTIBODIES IN EARLY DIAGNOSTIC OF ISCHEMIC STROKE

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

Corresponding author:
Chaykovskaya Alexandra D.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: mumu6394@gmail.com

¹Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

²Saint Martyr Elizabeth Sity Hospital, Saint Petersburg, Russia

Received 01 November 2021; accepted
16 November 2021.

Abstract

Background. Application of a biomarker panel during the acute period of the ischemic stroke (IS) can contribute to a more accurate and prompter diagnostics and verification of the optimal approach to a patients' management. **Objective.** We aimed to clarify values of neuron-specific enolase (NSE), glial fibrillar acidic protein (GFAP) and antibodies for NMDA receptor's NR2-subunit (NR2-antibodies) in the acute period of IS, to compare with such values in patients without IS, to assess their relationship with severity of neurological deficit and short-term outcome and also to establish sensitivity and specificity of the biomarker panel. **Design and methods.** 63 patients with IS and 31 people (11 with chronic brain ischemia and 20 healthy individuals) as controls were included. **Results.** NSE and GFAP values in IS group exceeded reference values at the onset of disease, lowering significantly by 10-14 day, while NR2-antibodies' values were lower at the onset of the disease compared with controls, rising by 10-14 day. In patients with unfavourable short-term outcome higher levels of NSE, GFAP and NR2-antibodies were found. A panel of such biomarkers has higher sensitivity and specificity than each of them individually. **Conclusion.** Researched substances can be used in a biomarker panel for IS diagnostics, brain damage monitoring, patient's condition evaluation and short outcome prognosing.

Key words: biomarkers, glial fibrillar acidic protein, neuron-specific enolase, NR2-antibodies, stroke

For citation: Chaykovskaya AD, Topuzova MP, Makhanova AM, et al. Role of neuron-specific enolase, glial fibrillar acidic protein and NR2-antibodies in early diagnostic of ischemic stroke. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2021;8(5):5-20. (In Russ.) DOI 10.18705/2311-4495-2021-8-5-5-20

Список сокращений:

ГИ — геморрагический инсульт, ГФКБ — глиальный фибриллярный кислый белок, ИИ — ишемический инсульт, НСЕ — нейрон-специфическая енолаза, СК — сыворотка крови, ТИА — транзиторная ишемическая атака, ХИМ — хроническая ишемия мозга, ЦНС — центральная нервная система, ЦСЖ — цереброспинальная жидкость, NR2-антитела — антитела к NR2-субъединице NMDA-рецептора.

Введение

Инсульт продолжает оставаться важнейшей медико-социальной проблемой, что обусловлено его высокой долей в структуре заболеваемости и смертности населения, значительными показателями временных трудовых потерь и первичной инвалидности. По данным Министерства здравоохранения Российской Федерации, в 2016 г. в России cerebrovasкулярные заболевания были диагностированы в 950,9 случаях на 100 тыс. насе-

ления в возрасте 18 лет и старше, из них примерно у четверти — ишемический инсульт (ИИ) [1]. По экспертным оценкам Всемирной организации здравоохранения, инсульт занимает второе место в мире среди причин смертности. В острый период инсульта летальность достигает 35 %, и к первому году с момента развития заболевания умирают 50 % больных. При этом в Российской Федерации отмечается снижение смертности от cerebrovasкулярных заболеваний на протяжении последнего десятилетия. С 2008 по 2016 гг. смертность от инсульта в Российской Федерации снизилась на 45 % и составила 123 случая на 100 тыс. населения.

Исход такого заболевания, как инсульт, во многом зависит от того, насколько быстро и точно был поставлен верный диагноз и назначены соответствующее лечение и маршрутизация пациента. С этой целью в медицинских организациях разработан соответствующий диагностический и лечебный алгоритм, включающий методы клинического обследования, нейровизуализации, мониторинг функций жизненно важных органов, ультразвуковые, электрофизиологические и лабораторные методы диагностики. Однако выполнение данного диагностического алгоритма занимает значительное время, включает в себя необходимость транспортировки пациента по различным отделениям, что не всегда возможно, и влечет большие финансовые затраты для службы здравоохранения, а его результаты не всегда однозначны. При этом ряд патологических состояний, таких как энцефалопатия различного генеза, метаболические расстройства, нейроинфекции и опухоли мозга, могут ошибочно диагностироваться как инсульт [2]. Ведется поиск возможного усовершенствования диагностики инсульта, и решением данной проблемы может стать определение сывороточных биомаркеров — веществ, способных отражать повреждение вещества мозга. Этот метод лабораторной диагностики является относительно малоинвазивным, быстрым и недорогим, не требует перемещений пациента и в перспективе может дать дополнительные данные, которые позволили бы уточнить наличие инсульта, его вариант и подтип, обеспечить мониторинг в динамике, предположить краткосрочный исход заболевания и на основании всех имеющихся данных способствовать индивидуализированному подходу к лечению пациента с инсультом. В рамках данной статьи проанализированы значения трех биомаркеров: нейрон-специфической енолазы (НСЕ), глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) и антител к NR2-субъединице NMDA-рецептора (NR2-антитела), как по отдельности, так и в составе панели.

НСЕ является изоферментом гликолитического фермента енолазы [3-5]. В норме она находится в цитоплазме нейронов и клеток нейроэндокринного происхождения, и лишь незначительное количество может присутствовать в периферической крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) [5-6]. У здоровых людей концентрация НСЕ в сыворотке крови (СК) составляет в среднем $8,7 \pm 3,9$ нг/мл, в ЦСЖ — $17,3 \pm 4,6$ нг/мл. НСЕ выделяется в системный кровоток после различных повреждений центральной нервной системы (ЦНС), включая инсульт, травматическое или гипоксическое повреждение [7-11]. Также ее повышение отмечается при развитии опухолей нейроэндокринного происхождения [5]. В исследованиях, где НСЕ изучалась при остром ИИ, ее повышение было отмечено как при крупных, так и при небольших инфарктах и даже транзиторных ишемических атаках (ТИА) [12], также отмечались корреляции уровней НСЕ и объема инфарктной ткани [13-15]. В большинстве проанализированных источников пик концентрации НСЕ при ИИ отмечался в первые 72 часа [3, 16-19]. Были обнаружены корреляции между пиковыми уровнями НСЕ и тяжестью неврологического дефицита [5, 20-23]. При измерении НСЕ в динамике у пациентов с неблагоприятным неврологическим исходом было отмечено более высокое и длительное высвобождение НСЕ [24-26]. Касательно различий в уровнях НСЕ при ишемическом и геморрагическом инсульте (ГИ) данные литературы противоречивы [27-28].

ГФКБ представляет собой мономерный белок цитоскелета, присутствующий в астроцитах и в эпендимальных клетках головного мозга. ГФКБ обнаруживается в белом и, в меньшей степени, сером веществе ЦНС и считается мозгоспецифичным [29-30]. В норме ГФКБ практически не обнаруживается в СК или ЦСЖ и быстро высвобождается в них при повреждении ткани ЦНС [30]. Исследования показывают, что ГФКБ стремительно нарастает в первые 72-96 часов после ИИ [31-37], и первые 24-48 часов после ГИ [32-33, 35, 38]. Имеются данные о том, что при ИИ концентрации данного биомаркера значимо выше, чем при ТИА, тогда как при ТИА они не отличались от здорового контроля [39]. Также отмечена взаимосвязь ГФКБ с объемом очага инсульта, но она более очевидна в случаях ГИ [33, 40, 41], нежели при ИИ [31, 34-36]. Повышенные уровни ГФКБ коррелируют с тяжестью неврологического дефицита при ИИ и ГИ [36, 39, 40, 42], в том числе повышаясь далее при ухудшении состояния [31, 32], и с неблагоприятным клиническим исходом [31, 32, 37]. В ряде исследований были

описаны значимо более высокие уровни ГФКБ при ГИ относительно ИИ [33, 35, 38, 41].

NR2-антитела образуются при массивных повреждениях ЦНС с нарушением целостности гематоэнцефалического барьера при высвобождении в кровотоки фрагментов NMDA-рецепторов. Они присутствуют у пациентов с различными неврологическими заболеваниями как в СК, так и в ЦСЖ [43]. В среднем их концентрация в СК здоровых добровольцев составляет 0,33 нг/мл (0,021,15 нг/мл). Повышение уровня NR2-антител в крови по сравнению со здоровым контролем было обнаружено в большинстве проанализированных исследований как при ишемическом поражении мозга (в том числе ТИА) [44-49], так и при геморрагическом [44, 47, 50]. При этом максимальная концентрация при ИИ и при ГИ появлялась в период до 12 часов от начала симптомов [44-47, 51]. Данные исследований свидетельствуют о взаимосвязи уровня NR2-антител с объемом очага при инсульте [44-46, 50], значимые различия в концентрациях данного биомаркера проявляются также в зависимости от локализации зоны инфаркта [45, 46, 50]. Были описаны зависимости уровня данного биомаркера в динамике от тяжести инсульта и степени восстановления нарушенных функций [44]. В ряде работ, исследовавших отдельно NR2-антитела в контексте дифференциро-

вания ИИ, ГИ и ТИА, были получены разные выводы [44, 46, 47].

Таким образом, среди описанных выше веществ ни одно не представляет собой «идеальный биомаркер», который бы выполнял диагностическую, дифференциальную, мониторинговую и прогностическую функцию для ИИ. Эта проблема может быть решена путем применения их в совокупности. При применении панели, состоящей из НСЕ, ГФКБ и NR2-антител, могут стать возможными достижение высокого уровня специфичности и чувствительности в отношении ИИ в остром периоде заболевания, дифференциация ИИ с ГИ и клинически схожими состояниями, наблюдение за восстановлением функций, коррекция терапии при ухудшении состояния пациента, а также прогнозирование исходов заболевания и оценка реабилитационного потенциала. Целью данного исследования является уточнение значений НСЕ, ГФКБ и NR2-антител в остром периоде инсульта в динамике, сравнение их показателей с таковыми у контрольных групп, оценка взаимосвязи уровней вышеупомянутых биомаркеров с тяжестью неврологического дефицита и краткосрочным исходом заболевания, а также сравнительная оценка чувствительности и специфичности биомаркеров и их панели.

Таблица 1. Общая характеристика пациентов

Показатель		Основная группа с ИИ (n=63)	Группа сравнения с ХИМ (n=11)	Группа здоровых добровольцев (n=20)
Возраст, годы (M ± m)		70,79±12,28	65,81±3,31	33,75±2,40
Пол, n (%)	Женщины	61,90	63,64	80,00
	Мужчины	38,10	36,36	20,00
ИИ в анамнезе, n (%)	Первичный	69,84	-	-
	Повторный	30,16	-	-
Пораженный сосудистый бассейн, n (%)	Каротидный	84,13	-	-
	Вертебрально-базиллярный	15,87	-	-
Этиология ИИ по критериям TOAST, n (%)	Атеротромботический	12,70	-	-
	Кардиоэмболический	31,75	-	-
	Лакунарный	3,17	-	-
	Неуточненный	52,38	-	-
Размер очага по данным МСКТ/МРТ, n (%)	Не обнаружен	61,91	-	-
	Малый (0-2 см)	15,87	-	-
	Средний (2-5 см)	11,11	-	-
	Крупный (более 5 см)	11,11	-	-

Материалы и методы

Для данного исследования в качестве основной группы было обследовано 63 пациента (24 мужчины, 39 женщин) в остром периоде ИИ, диагноз был подтвержден клинически и нейровизуализационно с помощью компьютерной (МСКТ) или магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга. В качестве групп сравнения был обследован 31 человек: 11 пациентов (4 мужчины, 7 женщин) с хронической ишемией мозга (ХИМ) и 20 человек (4 мужчины, 16 женщин) в качестве здоровых добровольцев.

Образцы крови для определения уровней биомаркеров у пациентов с ИИ были получены дважды: в первые 72 часа от развития симптомов (точка 1) и на 10-14 день заболевания (точка 2). У пациентов с ХИМ и у здоровых добровольцев образцы крови были получены один раз. Уровни биомаркеров определяли на автоматическом электрохемилюминесцентном анализаторе Cobas e 411 (Roche Diagnostics GmbH, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителя, референсные значения считали для НСЕ < 16,30 нг/мл, для ГФКБ < 0,25 нг/мл, для NR2-антител $\leq 2,0$ нг/мл. Общая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Тяжесть неврологических нарушений у пациентов с ИИ оценивали по шкале инсульта Национального института здоровья (NIHSS), краткосрочный результат оценивали по модифицированной шкале Rankin (mRS) и индексу повседневной активности и независимости жизнедеятельности Barthel при поступлении (первые 72 часа) и в динамике (на 10-14 день). Подтипы ИИ определяли согласно классификации, основанной на этиологии Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ STATISTICA 10.0 и IBM SPSS Statistics 21. При сравнении двух групп применяли непараметрические критерии Манна-Уитни и Вилкоксона. Для определения зависимости между признаками использовали корреляционный анализ Спирмена. Для оценки чувствительности и специфичности изучаемых биомаркеров был использован ROC-анализ и расчет площади под графиком (AUC score). Результаты представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В основной группе концентрация НСЕ в точке 1 значительно превышала референсные значения (16,3 нг/мл) и значимо уменьшалась в динамике ($29,2 \pm 3,9 \rightarrow 17,5 \pm 0,9$; $p = 0,003$) к 10-14 дню. У 42 (67 %) человек уровень НСЕ был повышен

в первые 72 часа ИИ, у 43 (68 %) было отмечено снижение уровня к 10-14 дню, при этом референсных значений уровень НСЕ достиг только у 21 (33 %) пациента. У 20 (32 %) человек наблюдалось повышение уровня НСЕ в динамике. ГФКБ в точке 1 также был обнаружен в значительном количестве, в 28 (44,4 %) случаях превышая пороговое значение (0,25 нг/мл), и уменьшался в динамике, снижаясь до порогового уровня ($0,39 \pm 0,1 \rightarrow 0,26 \pm 0,005$; $p = 0,034$). У восьми (12,7 %) пациентов наблюдалось повышение уровня в динамике. Среднее количество NR2-антител в первые 72 часа референсных значений (2,0 нг/мл) в общей выборке не превысило ($1,06 \pm 0,2$), в динамике к 10-14 дню было отмечено некоторое увеличение данного показателя ($1,2 \pm 0,2$; $p = 0,293$).

Количество НСЕ в группе ХИМ было ниже, чем в основной группе в точке 1, однако уровень значимости достигнут не был ($20,50 \pm 2,9$ нг/мл, $p = 0,447$). В группе здоровых добровольцев уровень НСЕ был значимо ниже, чем в группе ИИ в точке 1 ($15,47 \pm 1,4$ нг/мл, $p = 0,002$). ГФКБ в группе ХИМ составил $0,26 \pm 0,005$, что ниже, чем в группе ИИ в точке 1. В этой группе ГФКБ значимо отличался от такового в группе с ИИ в точке 2 ($p = 0,035$). В группе здоровых добровольцев уровень ГФКБ ($0,27 \pm 0,003$ нг/мл) значимо отличался от такового в группе с ИИ в точке 2 ($p = 0,0006$). Уровни ГФКБ в группах ХИМ и здоровых добровольцев не отличались значимо от уровней данного биомаркера в основной группе в точке 2 ($p = 0,377$ и $p = 0,393$ соответственно) и друг от друга ($p = 0,114$). Анализ значений NR2-антител показал, что в точке 1 у группы ИИ их уровень составил $1,06 \pm 0,2$, что ниже, чем в динамике ($1,16 \pm 0,2$) и значимо ниже, чем в группах ХИМ и здоровых добровольцев ($1,12 \pm 0,1$, $p = 0,03$ и $1,42 \pm 0,2$, $p = 0,0002$), тогда как между группами сравнения и значениями в точке 2 статистически значимых различий не имелось. Значения НСЕ, ГФКБ и NR2-антител у пациентов с ИИ в динамике, пациентов с ХИМ и группы здоровых добровольцев представлены на рисунке 1, а значения p для них — в таблице 2.

В основной группе пациентов с ИИ тяжесть неврологической симптоматики по шкале NIHSS значимо уменьшалась к 10-14 дню: $7,9 \pm 0,8 \rightarrow 4,0 \pm 0,5$; $p = 0,0000001$; снижалась степень инвалидизации по шкале Рэнкин: $3,6 \pm 0,1 \rightarrow 2,6 \pm 0,1$; $p = 0,0000001$; также возрастал индекс повседневной активности Barthel: $49,8 \pm 3,8 \rightarrow 76,0 \pm 3,4$; $p = 0,0000001$.

Все пациенты в зависимости от степени тяжести неврологических нарушений (NIHSS) были условно разделены на две группы: 1-я (средняя и тя-

желая степень тяжести) — 7 и более баллов, 2-я (легкая степень) — 0-6 баллов. Сравнение уровней НСЕ, ГФКБ, NR2-антител в данных группах в динамике представлено в таблице 3 и на рисунке 2. У пациентов, имевших более тяжелую симптоматику в первые 72 часа, концентрация НСЕ была выше, достигая уровня значимости различий в ди-

намике ($p = 0,034$). В случаях с более тяжелой неврологической симптоматикой к 10-14 дню заболевания концентрация НСЕ была достоверно выше как в первые 72 часа ($p = 0,041$), так и в динамике ($p = 0,005$). Уровень НСЕ значимо уменьшался в динамике у пациентов 2-й группы ($p = 0,013$). Концентрация ГФКБ в группе с тяжелым неврологиче-

Таблица 2. Уровни значимости различий (p) НСЕ, ГФКБ и NR2-антител у пациентов с ИИ в динамике, пациентов с ХИМ и в группе здоровых добровольцев

Биомаркер	Группы сравнения	ИИ в точке 1	ИИ в точке 2	ХИМ/ИИ
НСЕ	ХИМ	0,447	0,412	0,223
	здоровых добровольцев	0,002	0,215	
	ИИ в точке 1 / ИИ в точке 2	0,003		
ГФКБ	ХИМ	0,377	0,035	0,114
	здоровых добровольцев	0,393	0,0006	
	ИИ в точке 1 / ИИ в точке 2	0,034		
NR2- антител	ХИМ	0,03	0,69	0,302
	здоровых добровольцев	0,0002	0,003	
	ИИ в точке 1 / ИИ в точке 2	0,293		

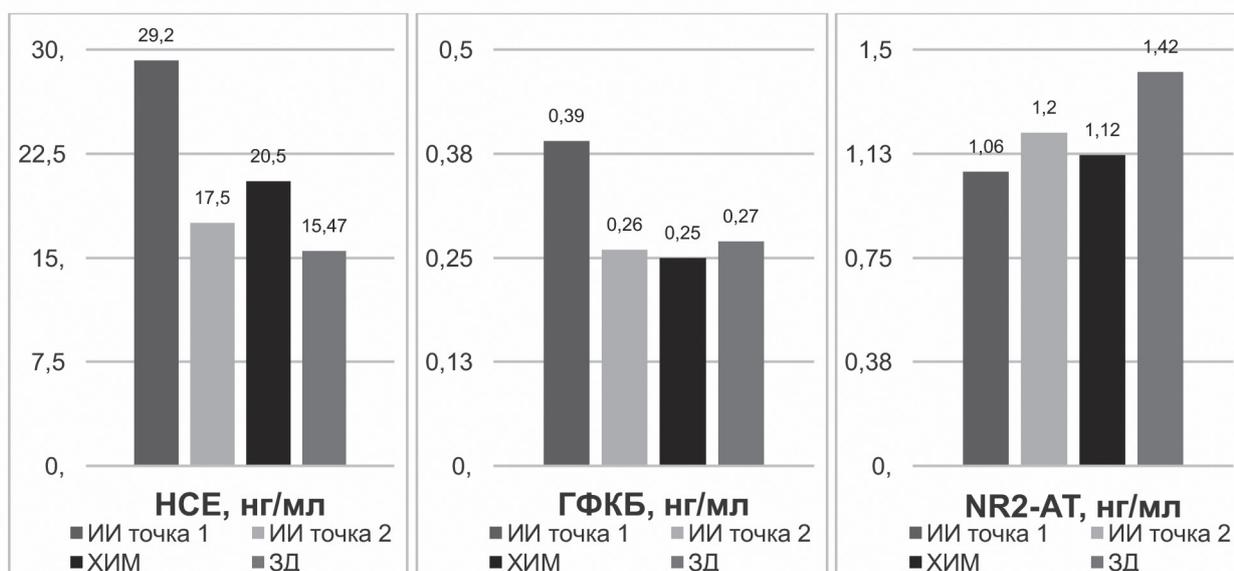


Рис. 1. Значения НСЕ, ГФКБ и NR2-антител у пациентов с ИИ в динамике, пациентов с ХИМ и в группе здоровых добровольцев (ЗД)

ским дефицитом была достоверно выше в первые трое суток по сравнению с таковой у пациентов, имеющих легкую степень неврологических нарушений ($p = 0,027$). К тому же те пациенты, которые к 10-14 дню по-прежнему имели высокий балл по шкале NIHSS, имели и более высокий уровень ГФКБ в первые 72 часа ($p = 0,003$). Достоверных различий уровней NR2-антител между группами пациентов в зависимости от степени неврологического дефицита не было обнаружено.

Для оценки краткосрочного исхода к 10-14 дню ИИ пациентов ранжировали в зависимости от балла по шкале Rankin: благоприятный исход (mRS

0-2) и неблагоприятный исход (mRS 3-6) (рис. 3, табл. 4). Полученные данные показывают достоверно более высокий уровень НСЕ в точке 2 у пациентов, имевших неблагоприятный исход к 10-14 дню, по сравнению с пациентами с благоприятным исходом. Кроме того, в группе с неблагоприятным исходом, хоть и прослеживалось значимое уменьшение уровней НСЕ, ГФКБ в динамике, но достижение референсных значений не наблюдалось.

При проведении корреляционного анализа выявлены значимые взаимосвязи между уровнями НСЕ, ГФКБ, NR2-антител и тяжестью неврологических нарушений при ИИ, степенью инвалидизации и кра-

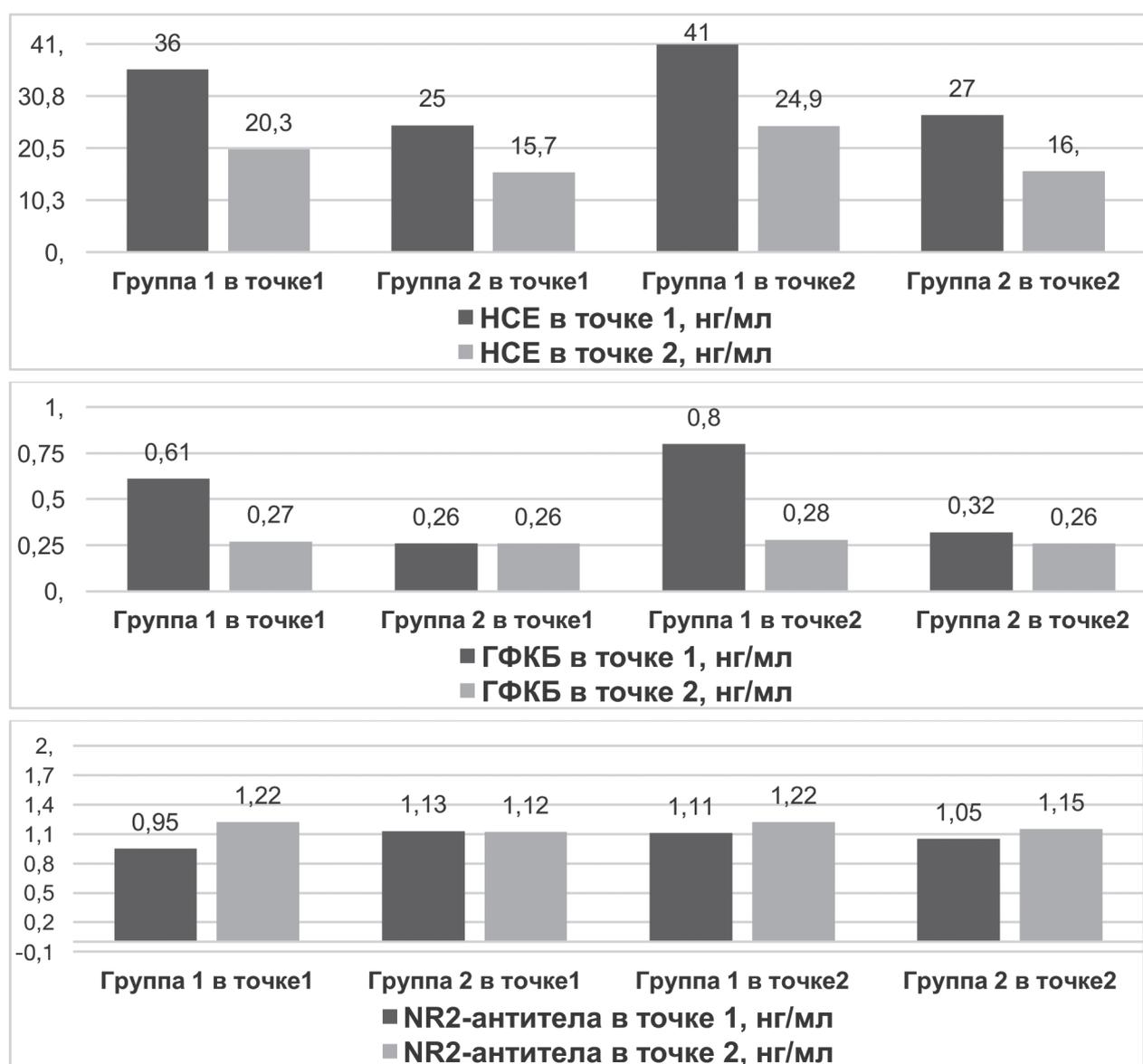


Рис. 2. Значения уровней НСЕ, ГФКБ, NR2-антител в динамике в зависимости от степени тяжести ИИ

Примечание: Группа 1 (средняя и тяжелая степень тяжести неврологических нарушений по NIHSS) — 7 и более баллов, группа 2 (легкая степень тяжести неврологических нарушений по NIHSS) — 0-6 баллов.

Таблица 3. Динамика уровней НСЕ, ГФКБ, NR2-антител в зависимости от степени тяжести ИИ и уровни значимости различий (p)

Биомаркер, M ± m (нг/мл)		Группа 1 (точка 1), n = 24 (38,1 %), NIHSS 14,0 ± 1,2	Группа 2 (точка 1), n = 39 (61,9 %), NIHSS 4,1 ± 0,2	Р	Группа 1 (точка 2), n = 12 (19,0%), NIHSS 10,7 ± 1,1	Группа 2 (точка 2), n = 51 (81,0 %), NIHSS 2,6 ± 0,2	Р
НСЕ	Точка 1	36,0 ± 9,1	25,0 ± 2,9	0,804	40,9 ± 11,6	27,0 ± 4,1	0,041
НСЕ	Точка 2	20,3 ± 1,7	15,7 ± 1,0	0,034	24,9 ± 3,0	16,0 ± 0,8	0,005
ГФКБ	Точка 1	0,61 ± 0,19	0,26 ± 0,00	0,027	0,80 ± 0,35	0,32 ± 0,05	0,003
ГФКБ	Точка 2	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,00	0,860	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,00	0,665
NR2-антитела	Точка 1	0,95 ± 0,10	1,13 ± 0,30	0,147	1,11 ± 0,21	1,05 ± 0,22	0,310
NR2-антитела	Точка 2	1,22 ± 0,25	1,12 ± 0,30	0,302	1,22 ± 0,21	1,15 ± 0,25	0,128
Р	НСЕ	0,097	0,003		0,163	0,013	
	ГФКБ	0,073	0,963		0,143	0,323	
	NR2-антитела	0,319	0,984		0,575	0,809	

Примечание: Группа 1 (средняя и тяжелая степень тяжести неврологических нарушений по NIHSS) — 7 и более баллов, группа 2 (легкая степень тяжести неврологических нарушений по NIHSS) — 0-6 баллов.

Таблица 4. Уровни значимости различий (p) НСЕ, ГФКБ и NR2-антител в зависимости от краткосрочного исхода к 10-14 дню заболевания

Биомаркер, M ± m (нг/мл) Благоприятный 29 (46)		Краткосрочный исход на 10-14 день, n (%)		Р
		Неблагоприятный 34 (54)		
НСЕ	Точка 1	24,0 ± 3,6	33,9 ± 6,7	0,271
	Точка 2	15,2 ± 0,9	19,5 ± 1,5	0,021
ГФКБ	Точка 1	0,27 ± 0,01	0,51 ± 0,79	0,107
	Точка 2	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,216
NR2-антитела	Точка 1	0,88 ± 0,07	1,23 ± 0,36	0,380
	Точка 2	0,89 ± 0,07	1,40 ± 0,38	0,218
Р		НСЕ — 0,019 ГФКБ — 0,250 NR2-антитела — 0,961	НСЕ — 0,043 ГФКБ — 0,086 NR2-антитела — 0,733	

Примечание: благоприятный исход — 0-2 балла по шкале Rankin, неблагоприятный исход — 3-6 баллов по шкале Rankin

ткосрочным исходом (табл. 5). Анализируя данные этой таблицы, можно сделать вывод, что чем выше уровень НСЕ и ГФКБ в первые 72 часа ИИ, тем больше тяжесть неврологической симптоматики и хуже восстановление повседневной активности к 10-14 дню. Выделение подгрупп по TOAST при проведе-

нии корреляционного анализа показало у пациентов с атеротромботическим подтипом инсульта более сильную взаимосвязь уровня НСЕ в первые 72 часа ИИ с краткосрочным исходом и уровня NR2-антител с тяжестью неврологической симптоматики в начале заболевания. У пациентов с крупным оча-

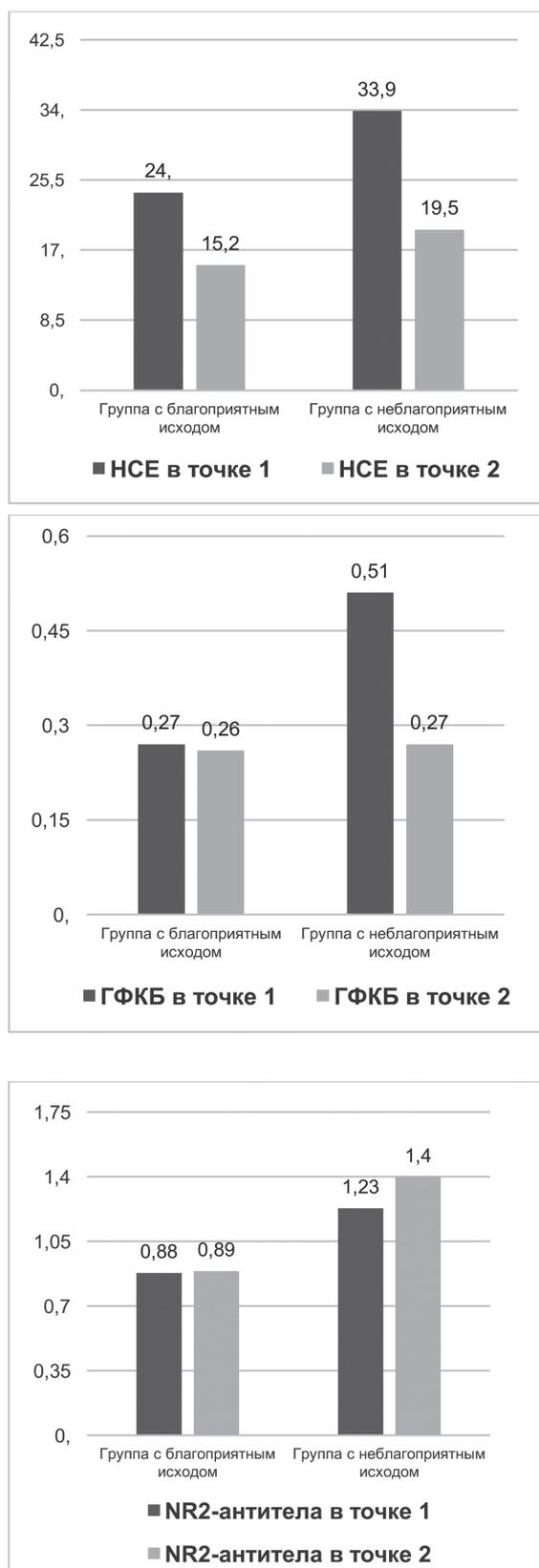


Рис. 3. Уровни HSE, ГФКБ и NR2-антител в зависимости от краткосрочного исхода к 10-14 дню заболевания

Примечание: благоприятный исход — 0-2 балла по шкале Rankin, неблагоприятный исход — 3-6 баллов по шкале Rankin

гом ишемии по данным МСКТ/МРТ головного мозга также была отмечена более сильная взаимосвязь между уровнями HSE в первые 72 часа и тяжестью неврологического дефицита, неблагоприятным краткосрочным исходом.

Для оценки чувствительности и специфичности каждого из вышеописанных биомаркеров в отдельности и панели биомаркеров был проведен ROC-анализ с построением кривых (рис. 4) и расчетом AUC score, результаты расчетов представлены в таблице 6. Сравнение проводилось для уровней биомаркеров в основной группе пациентов с ИИ в первые 72 часа заболевания и каждой из контрольной группы, отдельно и в совокупности. Ожидаемо, во всех случаях AUC score панели биомаркеров оказался выше, чем у каждого отдельно взятого биомаркера в соответствующих условиях. Наиболее высоким оказался этот показатель у панели биомаркеров при сравнении основной группы с здоровыми добровольцами. Среди отдельных биомаркеров наибольшим AUC score обладала HSE также при сравнении групп с ИИ и здоровых добровольцев.

Обсуждение

В проведенном нами исследовании уровень HSE в СК пациентов с ИИ в первые 72 часа заболевания превышал референсные значения и значительно уменьшался в динамике к 10-14 дню, что согласовывается с результатами других исследователей [24-28]. ГФКБ определялся в значительном количестве в первые 72 часа от начала ИИ, в большинстве случаев превышая пороговое значение (0,25 нг/мл), и уменьшался в динамике, снижаясь до порогового уровня. Работы, в которых исследовалась динамика значений данного биомаркера, также отмечали пик его концентрации в первые трое суток [32-37]. Был отмечен более низкий уровень NR2-антител в первые 72 часа инсульта, чем в динамике или у групп ХИМ и здоровых добровольцев, что может свидетельствовать о снижении иммунного ответа в остром периоде заболевания; при этом в литературе приводятся данные о повышении уровня NR2-антител в СК при ИИ в течение первых суток с последующим постепенным снижением, однако отмечается выраженная зависимость от преморбидного фона [44-49]. Между уровнем NR2-антител у группы ХИМ и у группы ИИ в начале заболевания нами были обнаружены значимые отличия, как и между уровнем данного биомаркера у здоровых добровольцев и у группы ИИ в начале заболевания и в динамике, что также подтверждает данные о его специфичности для острого ИИ [45].

Таблица 5. Значимые корреляционные связи между уровнями биомаркеров и оценкой состояния пациентов по шкалам инсульта

Биомаркер/ точка	Показатель/ точка	Подгруппа пациентов с ИИ	Коэффициент корреляции
НСЕ/точка 1	NIHSS/точка 2	Пациенты с крупным очагом	0,871576
	Barthel/точка 1	Пациенты с атеротромботическим подтипом ИИ	-0,89822
	Barthel/точка 2	Основная группа	-0,303353
		Пациенты с атеротромботическим подтипом ИИ	-0,874267
		Пациенты с малым очагом	-0,89026
		Пациенты с крупным очагом	-0,754505
	Rankin/точка 1	Пациенты с атеротромботическим подтипом ИИ	0,848668
	Rankin/точка 2	Пациенты с малым очагом	0,701507
		Пациенты с крупным очагом	0,724267
	Rivermead /точка 1	Пациенты с атеротромботическим подтипом ИИ	-0,969782
	Rivermead /точка 2	Основная группа	-0,272554
		Пациенты с атеротромботическим подтипом ИИ	-0,849805
		Пациенты с малым очагом	-0,86164
		Пациенты с крупным очагом	-0,711991
НСЕ/точка 2	NIHSS/точка 1	Основная группа	0,307708
	NIHSS/точка 2	Основная группа	0,278377
		Пациенты с крупным очагом	-0,748819
	Barthel/точка 1	Основная группа	-0,303593
	Barthel/точка 2	Основная группа	-0,336453
	Rankin/точка 1	Основная группа	0,344868
		Пациенты с кардиоэмболическим подтипом ИИ	0,848668
	Rankin/точка 2	Основная группа	0,26268
		Пациенты с крупным очагом	-0,711991
	Rivermead/точка 1	Основная группа	-0,348964
		Пациенты с кардиоэмболическим подтипом ИИ	-0,58095
	Rivermead/точка 2	Основная группа	-0,331033
		Пациенты с атеротромботическим подтипом ИИ	-0,786387
	ГФКБ/точка 1	NIHSS/точка 1	Основная группа
Пациенты с атеротромботическим подтипом ИИ			0,759217
Пациенты со средним очагом			0,836364
NIHSS/точка 2		Основная группа	0,402782
Barthel/точка 1		Основная группа	-0,266336
		Пациенты со средним очагом	-0,87978
Barthel/точка 2		Основная группа	-0,303221
Rankin/точка 1		Основная группа	0,290886
		Пациенты со средним очагом	0,953463
Rivermead/точка 1		Пациенты со средним очагом	-0,96295
Rivermead/точка 2	Основная группа	-0,249703	
	Пациенты с атеротромботическим подтипом ИИ	-0,712017	
ГФКБ/точка 2	Rankin/точка 2	Основная группа	0,265629
NR2-антитела/ точка 2	NIHSS/точка 1	Пациенты с атеротромботическим подтипом ИИ	0,77114
	Barthel/точка 1	Пациенты с атеротромботическим подтипом ИИ	-0,778457

Таблица 6. AUC score, полученный при сравнении групп пациентов в зависимости от оцениваемого биомаркера

Оцениваемый биомаркер	AUC score при сравнении групп пациентов		
	Основная группа с ИИ против группы здоровых добровольцев	Основная группа с ИИ против группы с ХИМ	Основная группа с ИИ против групп с ХИМ и здоровых добровольцев
НСЕ	0,730	0,572	0,660
ГФКБ	0,583	0,572	0,484
NR2-антитела	0,441	0,484	0,582
Панель биомаркеров	0,741	0,588	0,666

При сравнении значений биомаркеров в различных группах пациентов в отношении НСЕ значимые отличия были обнаружены лишь между группой ИИ в начале заболевания и группой здоровых добровольцев. Однако стоит учитывать, что большая часть группы ХИМ имела повышенный уровень НСЕ, в отличие от здоровых добровольцев. Это может быть следствием различных сопутствующих заболеваний: в ряде исследований приведены доказательства повышения НСЕ у пациентов с гипергликемией [51], гипертонической болезнью [20], которые являются факторами риска инсульта и присутствовали у большинства пациентов с ХИМ. Уровень ГФКБ же у группы ХИМ в большинстве случаев не превышал пороговые значения и значительно отличался от такового у пациентов с ИИ на 10-14 день, как и уровень ГФКБ у здоровых добровольцев, что согласуется с данными о специфичности этого биомаркера в отношении острого повреждения мозговой ткани [52] и о сроках возвращения его уровня к минимальным значениям [35].

При разделении пациентов с ИИ на подгруппы в зависимости от тяжести неврологического дефицита было установлено, что у тех, кто имел более тяжелую симптоматику в первые 72 часа, концентрация НСЕ была выше, достигая уровня значимости различий в динамике, а в случаях с более тяжелой неврологической симптоматикой к 10-14 дню заболевания концентрация НСЕ была достоверно выше как в первые 72 часа, так и в динамике. Подобные результаты были получены в большинстве исследований, изучающих взаимосвязь уровня НСЕ и тяжести неврологических нарушений при ИИ [5, 20-25, 28]. В нашем исследовании также было обнаружено, что уровень НСЕ значительно уменьшался в динамике только у пациентов с более легкой степенью тяжести неврологической симптоматики, что позволяет судить о более дли-

тельном высвобождении НСЕ в кровь при тяжелом неврологическом дефиците, вероятно, вследствие продолжающегося разрушения мозговой ткани. Как и в значительной части работ, оценивавших связь уровня ГФКБ с тяжестью инсульта, в данном исследовании значения ГФКБ у пациентов с тяжелым неврологическим дефицитом были достоверно выше в первые трое суток, чем у пациентов с легкой степенью неврологических нарушений, а те из них, которые к 10-14 дню по-прежнему имели высокий балл по шкале NIHSS, имели более высокий уровень ГФКБ в первые 72 часа [31, 33, 36, 37, 39, 41, 42]. Достоверных различий уровней NR2-антител между подгруппами пациентов в зависимости от степени тяжести неврологического дефицита нами обнаружено не было, несмотря на то что большинство авторов отмечали прямую связь уровня данного биомаркера с тяжестью неврологических нарушений; однако в одной из работ приводились данные о том, что у наиболее тяжелых пациентов, вероятно, вследствие развития иммунодефицитного состояния, повышения уровня NR2-антител не отмечалось [53].

Исследовав уровни биомаркеров в зависимости от краткосрочного исхода, мы обнаружили достоверно более высокий уровень НСЕ в точке 2 у пациентов, имевших неблагоприятный исход к 10-14 дню. Наши данные согласуются с результатами большинства исследователей [17, 19, 22-26, 28]. При этом у таких пациентов хоть и прослеживалось значимое уменьшение уровней НСЕ, ГФКБ в динамике, но достижение референсных значений не наблюдалось, что может указывать на более высокое и длительное высвобождение данных веществ в кровь. Корреляционный анализ также выявил значимые взаимосвязи между уровнями НСЕ, ГФКБ, NR2-антител и тяжестью неврологических нарушений при ИИ, степенью инвалидизации

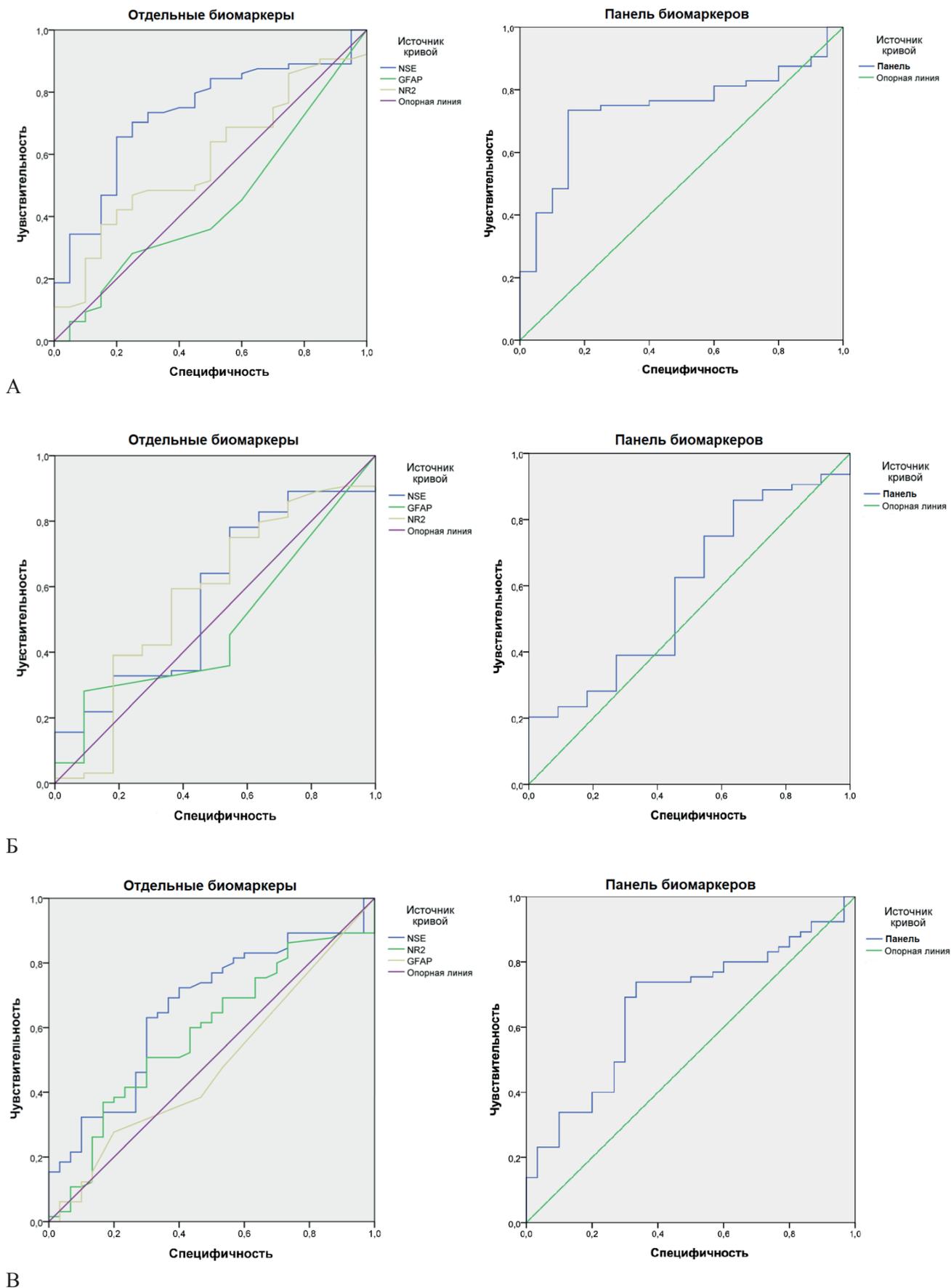


Рис. 4. ROC-кривые, полученные при сравнении:

(А) основной группы с ИИ и группы здоровых добровольцев; (Б) основной группы с ИИ и группы с ХИМ; (В) основной группы с ИИ и групп с ХИМ и здоровых добровольцев

и краткосрочным исходом: более высокие уровни НСЕ и ГФКБ наблюдались у пациентов с более тяжелым неврологическим дефицитом и менее благоприятным исходом в динамике, в особенности у пациентов с атеротромботическим подтипом инсульта и более крупным очагом ишемии, что согласуется с данными литературы [24, 25].

Применение панели биомаркеров может обладать более высокой чувствительностью и специфичностью в отношении ИИ, чем использование их по отдельности, и способствовать дифференциальной диагностике в острейшем периоде заболевания [35, 54-57]. При проведении ROC-анализа мы выявили, что панель, состоящая из трех исследуемых нами биомаркеров, обладает более выраженной чувствительностью и специфичностью, чем каждый из них по отдельности, в особенности при сравнении показателей пациентов с ИИ и здоровых добровольцев.

Заключение

В данном исследовании была проведена сравнительная оценка уровней НСЕ, ГФКБ и NR2-антител у пациентов в остром периоде ИИ, пациентов с ХИМ и здоровых добровольцев, а также уточнение взаимосвязи показателей данных биомаркеров с подтипом инсульта, тяжестью неврологических нарушений, объемом очага и краткосрочным исходом инсульта. Выявлено, что чувствительность и специфичность примененной панели биомаркеров оказалась выше, чем каждого биомаркера отдельно. Полученные данные подтверждают диагностический и прогностический потенциал НСЕ, ГФКБ и NR2-антител и являются перспективными для дальнейшего изучения.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Благодарности / Acknowledgments

Исследование выполнено при поддержке Государственного задания: «Изучение нейропластичности при цереброваскулярных заболеваниях путем использования новых биомаркеров ишемического повреждения мозга и исследования коннектома с целью выявления предикторов, разработки новых профилактических и терапевтических стратегий».

Список литературы / References

1. Alexandrova GA. The incidence of the entire population of Russia in 2016. Statistical materials. Part

I. // Ministry of Health of the Russian Federation [site]. In Russian. [Александрова Г.А. Заболеваемость всего населения России в 2016 году. Статистические материалы. Часть I. // Министерство Здравоохранения Российской Федерации [сайт]]. URL : <https://minzdrav.gov.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/statisticheskie-informatsionnye-materialy/statisticheskiy-sbornik-2016-god> (дата обращения: 25.11.2021).

2. Hosseini-zhad M, Sohrabnejad R. Stroke mimics in patients with clinical signs of stroke. *Caspian J Intern Med.* 2017; 8(3): 213-216. DOI: <https://dx.doi.org/10.22088/2Ffejim.8.3.213>

3. Missler U, Wiesmann M, Friedrich C et al. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke.* 1997; 28: 1956-1960. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.str.28.10.1956>

4. Laskowitz DT, Grocott H, Hsia A, et al. Serum markers of cerebral ischemia. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 1998 Jul-Aug; 7(4): 234-41. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1052-3057\(98\)80032-3](https://doi.org/10.1016/s1052-3057(98)80032-3)

5. Jauch EC, Lindsell C, Broderick J et al. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke. *Stroke.* 2006; 37: 2508-2513. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000242290.01174.9e>

6. Schoerhuber W, Kittler H, Sterz F et al. Time course of serum neuron-specific enolase. *Stroke.* 1999; 30: 1598-1603. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.str.30.8.1598>

7. Grubb NR, Simpson C, Sherwood RA et al. Prediction of cognitive dysfunction after resuscitation from out-of-hospital cardiac arrest using serum neuron-specific enolase and protein S-100. *Heart.* 2007 Oct; 93(10): 1268-73. DOI: <https://doi.org/10.1136/hrt.2006.091314>

8. Oertel M, Schumacher U, McArthur DL et al. S-100B and NSE: markers of initial impact of subarachnoid haemorrhage and their relation to vasospasm and outcome. *J Clin Neurosci.* 2006 Oct; 13(8): 834-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2005.11.030>

9. Celtik C, Acunaş B, Oner N et al. Neuron-specific enolase as a marker of the severity and outcome of hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev.* 2004 Sep; 26(6): 398-402. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2003.12.007>

10. Einav S, Kaufman N, Algur N et al. Modeling serum biomarkers S100 beta and neuron-specific enolase as predictors of outcome after out-of-hospital cardiac arrest: an aid to clinical decision making. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 60: 304-311. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.04.020>

11. Anand N, Stead LG. Neuron-specific enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *Cerebrovasc Dis.* 2005; 20(4): 213-219. DOI: <https://doi.org/10.1159/000087701>

12. Persson L, Hardemark HG, Gustafsson J et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke.* 1987; 18(5): 911-918. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.str.18.5.911>

13. Hardemark HG, Persson L, Bolander HG et al. Neuron-specific enolase is a marker of cerebral ischemia and infarct size in rat cerebrospinal fluid. *Stroke.* 1988; 19(9): 1140-1144. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.str.19.9.1140>

14. Hardemark HG, Ericsson N, Kotwica Z et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in CSF after experimental traumatic or focal ischemic brain damage. *J Neurosurg.* 1989; 71(5 Pt 1): 727-731. DOI: <https://doi.org/10.3171/jns.1989.71.5.0727>

15. Hatfield RH, McKernan RM. CSF neuron specific enolase as a quantitative marker of neuronal damage in a rat stroke model. *Brain Res.* 1992; 577: 249-252. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90280-m](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90280-m)
16. Gruener N, Gross B, Gozlan O et al. Increase in superoxide dismutase after cerebro-vascular accident. *Life Sci.* 1994; 54: 711-713. DOI: [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)90159-7)
17. Brea D, Sobrino T, Blanco M et al. Temporal profile and clinical significance of serum neuron-specific enolase and S100 in ischemic and hemorrhagic stroke. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47: 1513-1518. DOI: <https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.337>
18. Fassbender K, Schmidt R, Schreiner A et al. Leakage of brain-originated proteins in peripheral blood: temporal profile and diagnostic value in early ischemic stroke. *J Neurol Sci.* 1997 May 1; 148(1):101-5. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(96\)05351-8](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(96)05351-8)
19. Butterworth RJ, Wassif WS, Sherwood RA et al. Serum neuron-specific enolase, carnosinase, and their ratio in acute stroke. An enzymatic test for predicting outcome? *Stroke.* 1996 Nov; 27(11): 2064-8. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.str.27.11.2064>
20. Bharosay A, Bharosay VV, Varma M. et al. Correlation of brain biomarker neuron specific enolase (NSE) with degree of disability and neurological worsening in cerebrovascular stroke. *Ind J Clin Biochem.* 2012; 27: 186-190. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12291-011-0172-9>
21. Singh HV, Pandey A, Shrivastava AK et al. Prognostic value of neuron specific enolase and IL-10 in ischemic stroke and its correlation with degree of neurological deficit. *Clin Chim Acta.* 2013 Apr 18; 419: 136-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.02.014>
22. Selakovic V, Raicevic R, Radenovic L. The increase of neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and plasma as a marker of neuronal damage in patients with acute brain infarction. *J Clin Neurosci.* 2005; 12(5): 542-547. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2004.07.019>
23. Geiger S, Holdenrieder S, Stieber P et al. Nucleosomes as a new prognostic marker in early cerebral stroke. *J Neurol.* 2007 May; 254(5): 61723. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00415-006-0407-5>
24. Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T et al. Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke.* 1999 Jun; 30(6): 1190-5. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.str.30.6.1190>
25. Wunderlich MT, Lins H, Skalej M et al. Neuron-specific enolase and tau protein as neurobiochemical markers of neuronal damage are related to early clinical course and long-term outcome in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg.* 2006 Sep; 108(6): 558-63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2005.12.006>
26. Haupt WF, Chopan G, Sobesky J et al. Prognostic value of somatosensory evoked potentials, neuron-specific enolase, and S100 for short-term outcome in ischemic stroke. *J Neurophysiol.* 2016 Mar; 115(3): 1273-8. DOI: <https://doi.org/10.1152/jn.01012.2015>
27. Cunningham RT, Watt M, Winder J et al. Serum neuron-specific enolase as an indicator of stroke volume. *Eur J Clin Invest.* 1996 Apr; 26(4): 298-303. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.1996.129282.x>
28. Pandey A, Shrivastava AK, Saxena K. Neuron specific enolase and c-reactive protein levels in stroke and its subtypes: correlation with degree of disability. *Neurochem Res.* 2014 Aug; 39(8): 1426-32. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1328-9>
29. Pelinka LE, Kroepfl A, Leixnering M et al. GFAP versus S100B in serum after traumatic brain injury: relationship to brain damage and outcome. *J Neurotrauma.* 2004 Nov; 21(11): 1553-61. DOI: <https://doi.org/10.1089/neu.2004.21.1553>
30. Yang Z, Wang KK. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* 2015 Jun; 38(6): 364-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>
31. Wunderlich MT, Wallesch CW, Goertler M. Release of glial fibrillary acidic protein is related to the neurovascular status in acute ischemic stroke. *Eur J Neurol.* 2006 Oct; 13(10): 1118-23. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01435.x>
32. Nylén K, Csajbok LZ, Ost M et al. Serum glial fibrillary acidic protein is related to focal brain injury and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2007 May; 38(5): 1489-94. DOI: <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.106.478362>
33. Dvorak F, Haberer I, Sitzer M et al. Characterisation of the diagnostic window of serum glial fibrillary acidic protein for the differentiation of intracerebral haemorrhage and ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2009; 27(1): 37-41. DOI: <https://doi.org/10.1159/000172632>
34. Ehrenreich H, Kästner A, Weissenborn K et al. Circulating damage marker profiles support a neuroprotective effect of erythropoietin in ischemic stroke patients. *Mol Med.* 2011; 17(11-12): 1306-10. DOI: <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00259>
35. Stanca DM, Mărginean IC, Sorițău O et al. GFAP and antibodies against NMDA receptor subunit NR2 as biomarkers for acute cerebrovascular diseases. *J Cell Mol Med.* 2015 Sep; 19(9): 2253-61. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.12614>
36. Vissers JL, Mersch ME, Rosmalen CF et al. Rapid immunoassay for the determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in serum. *Clin Chim Acta.* 2006 Apr; 366(1-2): 336-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.11.017>
37. Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT et al. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke.* 2000 Nov; 31(11): 2670-7. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.str.31.11.2670%20>
38. Katsanos AH, Makris K, Stefani D et al. Plasma Glial Fibrillary Acidic Protein in the Differential Diagnosis of Intracerebral Hemorrhage. *Stroke.* 2017 Sep; 48(9): 2586-2588. DOI: <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.018409>
39. Ren C, Kobeissy F, Alawieh A et al. Assessment of Serum UCH-L1 and GFAP in Acute Stroke Patients. *Sci Rep.* 2016; 6: 24588. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep24588>
40. Foerch C, Niessner M, Back T et al. Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke. *Clin Chem.* 2012 Jan; 58(1): 237-45. DOI: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.172676>
41. Rozanski M, Waldschmidt C, Kunz A et al. Glial Fibrillary Acidic Protein for Prehospital Diagnosis of Intracerebral Hemorrhage. *Cerebrovasc Dis.* 2017;43(1-2): 76-81. DOI: <https://doi.org/10.1159/000453460>

42. Foerch C, Curdt I, Yan B et al. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006 Feb; 77(2): 181-4. DOI: <https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.074823>
43. Levite M. Glutamate receptor antibodies in neurological diseases: anti-AMPA-GluR3 antibodies, anti-NMDA-NR1 antibodies, anti-NMDA-NR2A/B antibodies, anti-mGluR1 antibodies or anti-mGluR5 antibodies are present in subpopulations of patients with either: epilepsy, encephalitis, cerebellar ataxia, systemic lupus erythematosus (SLE) and neuropsychiatric SLE, Sjogren's syndrome, schizophrenia, mania or stroke. These autoimmune anti-glutamate receptor antibodies can bind neurons in few brain regions, activate glutamate receptors, decrease glutamate receptor's expression, impair glutamate-induced signaling and function, activate blood brain barrier endothelial cells, kill neurons, damage the brain, induce behavioral/psychiatric/cognitive abnormalities and ataxia in animal models, and can be removed or silenced in some patients by immunotherapy. *J Neural Transm (Vienna)*. 2014 Aug; 121(8): 1029-75. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1193-3>
44. Dambinova SA, Khounteev GA, Izykenova GA et al. Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-D-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke. *Clin Chem*. 2003 Oct; 49(10): 1752-62. DOI: <https://doi.org/10.1373/49.10.1752>
45. Dambinova SA, Bettermann K, Glynn T et al. Diagnostic potential of the NMDA receptor peptide assay for acute ischemic stroke. *PLoS One*. 2012; 7(7):e42362. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042362>
46. Dambinova SA, Aliev KT, Bondarenko EV et al. The biomarkers of cerebral ischemia as a new method for the validation of the efficacy of cytoprotective therapy. *S.S. Korsakov Journal of neurology and psychiatry*. 2017; 117(5): 62-67. In Russian [Дамбинова С.А., Алиев К.Т., Бондаренко Е.В. и др. Биомаркеры ишемии головного мозга как новый метод доказательства эффективности нейроцитопротекторов. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2017; 117(5): 62-67.]. DOI: <https://doi.org/10.17116/jnevro20171175162-67>
47. Weissman JD, Khunteev GA, Heath R et al. NR2 antibodies: risk assessment of transient ischemic attack (TIA)/stroke in patients with history of isolated and multiple cerebrovascular events. *J Neurol Sci*. 2011 Jan 15; 300(1-2): 97-102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2010.09.023>
48. Klimenko LL, Skalny AV, Turna AA et al. Serum Trace Element Profiles, Prolactin, and Cortisol in Transient Ischemic Attack Patients. *Biol Trace Elem Res*. 2016 Jul; 172(1): 93-100. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0586-y>
49. Skalny AV, Klimenko LL, Turna AA et al. Serum trace elements are associated with hemostasis, lipid spectrum and inflammatory markers in men suffering from acute ischemic stroke. *Metab Brain Dis*. 2017 Jun; 32(3): 779788. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11011-017-9967-6>
50. Sulter G, Elting JW, De Keyser J. Increased serum neuron specific enolase concentrations in patients with hyperglycemic cortical ischemic stroke. *Neurosci Lett*. 1998; 253:71-73. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(98\)00595-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(98)00595-3)
51. Dambinova SA, Khounteev GA, Skoromets AA. Multiple panel of biomarkers for TIA/stroke evaluation. *Stroke*. 2002 May; 33(5): 1181-2. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.str.0000014922.83673.86>
52. Kamchatnov PR, Chugunov AV, Ruleva NYu, et al. Autoantibodies to GFAP (glial fibrillary acidic protein) and to dopamine in patients with acute and chronic cerebrovascular disorders. *Health*. 2010; 2 (12): 1366-1371. <https://doi.org/10.4236/health.2010.212202>
53. Gusev EI, Skvortsova VI, Izykenova GA, et al. The level of autoantibodies to glutamate receptors in the blood serum of patients in the acute period of ischemic stroke. *S.S. Korsakov Journal of neurology and psychiatry*. 1996; 96(5): 68-72. In Russian [Гусев Е.И., Скворцова В.И., Изыкенова Г.А., и др. Уровень аутоантител к глутаматным рецепторам в сыворотке крови пациентов в остром периоде ишемического инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 1996; 96(5): 68-72].
54. Lynch JR, Blessing R, White WD, et al. Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke*. 2004 Jan; 35(1): 57-63. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000105927.62344.4C>
55. Reynolds MA, Kirchick HJ, Dahlen JR, et al. Early biomarkers of stroke. *Clin Chem*. 2003 Oct; 49(10): 1733-9. DOI: <https://doi.org/10.1373/49.10.1733>
56. Laskowitz DT, Kasner SE, Saver J, Remmel KS, Jauch EC; BRAIN Study Group. Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke: the Biomarker Rapid Assessment in Ischemic Injury (BRAIN) study. *Stroke*. 2009 Jan; 40(1): 77-85. DOI: <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.516377>
57. Knauer C, Knauer K, Müller S, et al. A biochemical marker panel in MRI-proven hyperacute ischemic stroke—a prospective study. *BMC Neurol*. 2012 Mar 8; 12:14. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2377-12-14>

Информация об авторах:

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

Топузова Мария Петровна, к.м.н., доцент кафедры неврологии и психиатрии, старший научный сотрудник НИЛ цереброваскулярной патологии НИО неврологии и нейрореабилитации, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Маханова Альбина Мансуровна, аспирант кафедры неврологии и психиатрии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Михеева Анна Геннадьевна, ординатор кафедры неврологии и психиатрии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Короткова Дарья Сергеевна, ординатор кафедры неврологии и психиатрии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

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

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

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

Васильева Елена Юрьевна, заведующий ЦКДЛ, ассистент кафедры лабораторной медицины и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

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

Сергеева Татьяна Васильевна, к.м.н., заместитель главного врача по неврологии (руководитель Регионального сосудистого центра) СПб ГБУЗ «Городская больница Святой преподобномученицы Елизаветы», доцент кафедры медицинской реабилитации и спортивной медицины ФГБУ «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, ассистент кафедры нейрохирургии и неврологии ФГБУ «Санкт-Петербургский государственный университет»;

Алексеева Татьяна Михайловна, д.м.н., доцент, заведующий кафедрой неврологии и психиатрии, ведущий научный сотрудник НИЛ цереброваскулярной патологии НИО неврологии и нейрореабилитации, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Chaykovskaya Alexandra D., postgraduate student of the Department of Neurology and Psychiatry, Almazov National Medical Research Centre;

Topuzova Mariya P., MD, PhD, Senior Scientist, Associate Professor of the Department of Neurology and Psychiatry, Senior Researcher of the Research Laboratory of Cerebrovascular Pathology of the Research Department of Neurology and Neurorehabilitation, Almazov National Medical Research Centre;

Makhanova Albina M., postgraduate student of the Department of Neurology and Psychiatry, Almazov National Medical Research Centre;

Mikheeva Anna G., graduate student of the Department of Neurology and Psychiatry, Almazov National Medical Research Centre;

Korotkova Daria S., graduate student of the Department of Neurology and Psychiatry, Almazov National Medical Research Centre;

Pospelova Maria L., MD, DrSci, Leading Researcher of the Laboratory of Cerebrovascular Pathology of the Research and Development Department of Neurology and Neurorehabilitation, Associate Professor of the Department of Neurology and Psychiatry,

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

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

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

Simakov Kayum V., MD, Head of the Regional Vascular Center, head of the neurological department for the treatment of patients with acute cerebrovascular accident, Almazov National Medical Research Centre;

Sergeeva Tat'yana V., MD, PhD, Deputy Chief Physician for Neurology (Head of the Regional Vascular Center) SPb

State Budget Healthcare Institution; Municipal Hospital of the Saint Martyr Elizabeth, Associate Professor of Medical Rehabilitation and Sports Medicine of St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of Russia, Assistant of the Department of Neurosurgery and Neurology of Federal State Budget Educational Institution of Higher Education, Saint-Petersburg State University

Alekseeva Tat'yana M., MD, DrSci, Associate Professor, Head of the Department of Neurology and Psychiatry, Leading Researcher of the Laboratory of Cerebrovascular Pathology of the Research and Development Department of Neurology and Neurorehabilitation, Almazov National Medical Research Centre.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДОВ МОНИТОРИНГА БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ВИСОЧНОЙ ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

Марченко Е. В., Александров А. М., Одинцова Г. В.,
Чухловин А. А.

Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт имени профессора А. Л. Поленова — филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Марченко Елена Владимировна,
РНХИ им. проф. А. Л. Поленова,
ул. Маяковского, д. 12, Санкт-Петербург,
Россия, 191014.
E-mail: lm_sovushka@mail.ru

Статья поступила в редакцию 31.08.2021
и принята к печати 05.11.2021.

Резюме

Актуальность. Основу прехирургического нейрофизиологического обследования больных с фармакорезистентной структурной эпилепсией составляют методики мониторинга биоэлектрической активности головного мозга: видео-электроэнцефалографический мониторинг (видео-ЭЭГ-мониторинг), а при наличии показаний — длительный инвазивный мониторинг. Исследование выполнено с целью оценки диагностической эффективности методов мониторинга биоэлектрической активности головного мозга исходя из отдаленных результатов хирургического лечения больных с височной структурной фармакорезистентной эпилепсией. **Материалы и методы.** В исследование включен 61 пациент с височной фармакорезистентной эпилепсией, которые были разделены на две группы: выполнение только видео-ЭЭГ мониторинга (33 человека) и дополнительное использование инвазивного мониторинга для локализации эпилептогенной зоны (28 человек). Каждая группа в зависимости от исходов хирургического лечения была разделена на подгруппы: пациенты, у которых прекратились судорожные приступы (Engel 1), и пациенты, у которых сохраняются судорожные приступы в той или иной степени (Engel 2-3-4). Для расчета диагностической эффективности референсной методикой был выбран инвазивный мониторинг с регистрацией иктального события. **Результаты.** Инвазивный мониторинг, выполняемый в рамках прехирургического обследования больных с височной фармакорезистентной эпилепсией, обладает более высокой чувствительностью (72,7 %) и точностью (82,4 %), чем видео-ЭЭГ-мониторинг (чувствительность 50 %, точность 45,9 %). **Заключение.** При простых монофокальных вариантах структурной эпилепсии видео-ЭЭГ-мониторинг обладает достаточным уровнем диагностической эффективности. Феномен конвергенции нейрофизиологических фенотипов обуславливает снижение диагностической эффективности неинвазивного и инвазивного мониторинга.

Ключевые слова: биоэлектрическая активность головного мозга, височная эпилепсия, инвазивный мониторинг, клиническая нейрофизиология, электроэнцефалографический мониторинг, эпилептическая система.

Для цитирования: Марченко Е.В., Александров А.М., Одинцова Г.В. и др. Диагностическая эффективность методов мониторинга биоэлектрической активности головного мозга при височной фармакорезистентной эпилепсии. Трансляционная медицина. 2021;8(5):21-28. DOI: 10.18705/2311-4495-2021-8-5-21-28

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

DIAGNOSTIC EFFICIENCY OF MONITORING METHODS OF BRAIN BIOELECTRIC ACTIVITY IN TEMPORAL LOBE PHARMACORESISTANT EPILEPSY

Marchenko E. V., Aleksandrov A. M., Odintsova G. V.,
Chukhlov A. A.

Polenov Neurosurgical Institute — branch of the Almazov National
Medical Research Centre

Corresponding author:
Marchenko Elena V.,
Polenov Neurosurgical Institute,
St. Mayakovsky, 12, St. Petersburg, Russia,
191014.
E-mail: lm_sovushka@mail.ru

Received 31 August 2021; accepted
05 November 2021.

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

Abstract

Background. The basis of pre-surgical neurophysiological examinations of patients with pharmaco-resistant structural epilepsy is the method of monitoring bioelectrical activity of the brain, video-electroencephalographic monitoring and, if indicated, long-term invasive monitoring. **Objective.** The goal of the study is to estimate the diagnostic efficacy of the methods used for monitoring of the brain bioelectric activity on the basis of long-term results of surgical treatment of patients with temporal structural pharmaco-resistant epilepsy. **Design and methods.** The study included 61 patients with temporal lobe pharmaco-resistant epilepsy, who were divided into two groups: performance of video-EEG monitoring only (33 patients) and the additional use of invasive monitoring for the localization of the epileptogenic zone (28 patients). Each group was divided into subgroups depending on the outcome of surgical treatment: patients, in whom seizures ceased (Engel 1) and patients in whom seizures persisted to some degree (Engel 2-3-4). Invasive monitoring with ictal event recording was chosen as the reference method to calculate diagnostic efficacy. **Results.** Invasive monitoring was performed as part of the pre-surgical evaluation of patients with temporal lobe pharmaco-resistant epilepsy with a higher sensitivity (72.7 %) and accuracy (82.4 %) than video-EEG monitoring (sensitivity 50 %, accuracy 45.9 %). **Conclusion.** In simple monofocal variants of structural epilepsy, video-EEG monitoring has a sufficient level of diagnostic efficiency. The phenomenon of neurophysiological phenotypes convergence is responsible for the reduced diagnostic efficacy of noninvasive and invasive monitoring.

Key words: bioelectrical activity of the brain, clinical neurophysiology, electroencephalographic monitoring, epileptic system, invasive monitoring, temporal lobe epilepsy.

For citation: Marchenko EV, Aleksandrov AM, Odintsova GV, et al. Diagnostic efficiency of monitoring methods of brain bioelectric activity in temporal lobe pharmaco-resistant epilepsy. Translational Medicine. 2021;8(5):21-28. (In Russ.). DOI: 10.18705/2311-4495-2021-8-5-21-28

Список сокращений:

ЭЭГ — электроэнцефалограмма, БЭА — биоэлектрическая активность, ЭКоГ — электрокортикография, ЭсубКоГ — электросубкортикография.

Введение

Структурно обусловленная височная эпилепсия в 25-30 % случаев принимает устойчивое фармакорезистентное течение. При наличии соответствующих показаний части таких больных показано нейрохирургическое лечение. В соответствии с доминирующей в современной хирургической эпилептологии фокальной теорией патогенеза структурной эпилепсии основными операциями выбора являются резективная деструкция или разобщение эпилептического очага [1–3].

В структурно-функциональной организации эпилептического очага выделяют зону эпилептогенного структурного поражения, зону ирритации, зону начала приступа, симптоматогенную зону, зону постприступного функционального дефицита, а также эпилептогенную зону — зону, удаление которой приводит к избавлению от приступов [4, 5]. Современные методы клинко-инструментальных исследований не позволяют локализовать собственно эпилептогенную зону. Считается, что наибольшую сопряженность эпилептогенная зона имеет с зонами ирритации и зоной начала иктального паттерна, которые выявляются при нейрофизиологических исследованиях. Основу прехирургического нейрофизиологического обследования составляет длительный мониторинг электроэнцефалограммы (ЭЭГ), совмещенной с видео-регистрацией клинической картины (видео-ЭЭГ-мониторинг). При отсутствии конкордантности результатов клинических, нейровизуализационных и нейрофизиологических исследований при наличии показаний выполняется длительный инвазивный мониторинг биоэлектрической активности (БЭА) коры и глубоких структур головного мозга [6].

Цель исследования: на основе ретроспективного анализа результатов хирургического лечения больных с височной структурной фармакорезистентной эпилепсией оценить диагностическую эффективность видео-ЭЭГ-мониторинга и инвазивного мониторинга БЭА, выполняемых на этапе прехирургического обследования.

Материалы и методы

В исследование включены 61 пациент (мужчины/женщины 30/31, средний возраст $26,5 \pm 6,4$ года) с диагнозом височная фармакорезистентная эпилепсия. Средняя продолжительность забо-

левания составила $14,5 \pm 10,6$ лет. Критериями включения пациентов в исследование были: 1) структурная височная эпилепсия; 2) фармакорезистентное течение эпилепсии; 3) выполненная резекция эпилептического очага; 4) наличие катмнеза в период 2-3 лет после проведения хирургического лечения. Все больные проходили прехирургическое обследование и хирургическое лечение в клинике РНХИ им. проф. А.Л. Поленова (филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия) в период с 2015 по 2020 год.

В зависимости от объема прехирургического нейрофизиологического обследования пациенты были разделены на две группы. Первую группу составили 33 пациента (м/ж 16/17, средний возраст $34,51 \pm 9,59$) с диагнозом височная фармакорезистентная эпилепсия. Локализация эпилептического очага у данных больных была выполнена по результатам видео-ЭЭГ-мониторинга.

Во вторую группу вошли 28 пациентов (м/ж 14/14, средний возраст $30,2 \pm 3,55$), у которых нейрофизиологическое обследование включало видео-ЭЭГ-мониторинг и продолженный инвазивный мониторинг БЭА. При выполнении экстраоперационного инвазивного мониторинга регистрировалась электрокортикография (ЭКоГ), которая при наличии показаний дополнялась электросубкортикографией (ЭсубКоГ). Одновременно проводилась видеорегистрация клинической картины. Пациенты второй группы были разделены на две подгруппы. В подгруппу 2.1 были включены 11 пациентов (м/ж 5/6, средний возраст $31,55 \pm 7,47$), у которых при проведении экстраоперационного инвазивного мониторинга БЭА были зарегистрированы типичные иктальные события. В подгруппу 2.2 вошли 17 больных (м/ж 9/8, средний возраст $30,95 \pm 8$), у которых иктальные события зарегистрировать не удалось.

Регистрация БЭА проводилась на аппаратно-программном комплексе «Мицар-ЭЭГ-202-1» (ООО «Мицар», Россия). Фильтр нижних частот 1,6 Гц, фильтр высоких частот 35 Гц.

Видео-ЭЭГ-мониторинг проводился на фоне депривации ночного сна. Регистрация и визуально-логический анализ ЭЭГ выполнялись в стандартных монополярных и биполярных отведениях с электродов, расположенных по Международной системе «10-20». Общая длительность видео-ЭЭГ-мониторинговых исследований у больных составляла от 12 до 72 ч.

Экстраоперационная регистрация ЭКоГ выполнялась четырехконтактными (1 × 4), восьмиконтактными (2 × 4) и двадцатиконтактными (4 × 5) электродными системами (AdTech, США). Для регистрации ЭСубКоГ использовались глубинные четырехконтактные электроды типа Spenser (AdTech, США). У 23 пациентов выполнена регистрация БЭА коры головного мозга, у 12 пациентов — БЭА коры головного мозга и амигдало-гиппокампального комплекса. Общее количество электродных треков у одного пациента составляло от 16 до 84. Длительность инвазивных мониторинговых исследований БЭА составила от 24 до 96 часов. Анализ параметров ЭКоГ и ЭСубКоГ производился визуально-логически.

Вид хирургического лечения височной фармакорезистентной эпилепсии определялся локализацией эпилептического очага. В 55 случаях выполнялась резекция эпилептического очага в височной доле, включая зону структурных изменений. У 5 больных выполнена стереотаксическая деструкция гиппокампа или амигдало-гиппокампального комплекса. В одном случае проведена стереотаксическая двусторонняя радиочастотная передняя таламотомия. Выделенные в зависимости от объема нейрофизиологического обследования группы больных были полностью сопоставимы по видам нейрохирургического лечения.

Клиническое состояние пациентов оценивалось посредством стандартного неврологического осмотра. Проведен ретроспективный анализ историй болезней. Во всех обследованных группах собран катамнез через 2-3 года после хирургического лечения при повторной госпитализации пациентов. Оценка исходов хирургического лечения эпилепсии была проведена по модифицированной шкале J.Engel (1993): I класс — отсутствие приступов, отрицательно влияющих на качество жизни; II класс — редкие приступы, нарушающие качество жизни; III класс — существенное сокращение частоты приступов; IV класс — отсутствие существенного улучшения.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ SPSS 17.

Результаты исследования

Длительный видео-ЭЭГ-мониторинг с фиксацией икталных событий позволил инвариантно локализовать эпилептический очаг и определить показания к хирургическому лечению височной фармакорезистентной эпилепсии у 33 пациентов, вошедших во вторую группу исследования. В 28 случаях наблюдалась дискордантность клиниче-

ской картины, данных нейровизуализации и результаты видео-ЭЭГ-мониторинга. У 18 больных на ЭЭГ регистрировались два очага эпилептиформной активности без явного доминирования одного из них, у троих больных — три очага. В одном случае на скальповой ЭЭГ регистрировались четыре устойчивых очага эпилептиформной активности. В двух случаях многосуточный видео-ЭЭГ-мониторинг не позволил зарегистрировать устойчивую фокальную эпилептиформную активность. Для локализации эпилептического очага 28 больным был выполнен продолженный экстраоперационный инвазивный мониторинг БЭА.

Всем включенным в исследование больным, исходя из результатов прехирургического обследования, было выполнено хирургическое удаление эпилептического очага. Локализация эпилептического фокуса уточнялась при выполнении интраоперационной ЭКоГ и ЭСубКоГ. В зависимости от результатов хирургического лечения через 2-3 года после выполненной операции больные в каждой группе были разделены на две подгруппы: 1) пациенты, у которых приступы прекратились (Engel 1), 2) пациенты, у которых сохранялись эпилептические приступы (Engel 2-3-4).

В группе пациентов, оперативное лечение которых проведено на основе результатов длительного мониторинга скальповой ЭЭГ, в 33,3 % (11 пациентов) исход оперативного лечения был благоприятным (не ниже Engel 1). В 22 наблюдениях (66,7 %) хирургическое лечение не принесло существенно облегчения в клинической картине и в качестве жизни пациентов. В группе пациентов, прехирургическое обследование которых включало инвазивный нейрофизиологический мониторинг, у 11 пациентов (39,3 %) исход оперативного лечения был не ниже Engel 1; в 17 наблюдениях (60,7 %) исход был оценен на уровне от Engel 2 до Engel 4.

Для оценки диагностической эффективности видео-ЭЭГ-мониторинга, выполняемого на этапе прехирургического обследования больных с височной фармакорезистентной эпилепсией, инвазивный мониторинг БЭА был выбран как референсная методика. Благоприятный исход (Engel 1) оперативного лечения, выполненного на основе результатов неинвазивного мониторинга, является истинно положительным результатом выполнения теста: использование видео-ЭЭГ-мониторинга позволило достоверно локализовать эпилептогенную зону, далее подверженную резективной деструкции, что принесло полную свободу от приступов. Благоприятный исход оперативного лечения, проведенного на основании результатов инвазивного мониторинга, был принят как ложно отрицательный результат

для видео-ЭЭГ-мониторинга: у больного существовала фокальная форма структурной эпилепсии, локализовать которую методика скальповой ЭЭГ не смогла, но при инвазивном мониторинге БЭА фокус был надежно локализован. Отдаленные результаты хирургического лечения на уровне Engel 2-3-4 у пациентов, которым выполнялся только видео-ЭЭГ-мониторинг, были отнесены к ложно положительным результатам, поскольку для инвариантного описания эпилептической системы и локализации эпилептогенной зоны результатов скальповой ЭЭГ оказалось недостаточно. Хирургическое вмешательство в этой группе больных не привело к полному избавлению от приступов. Возможно, эпилептогенная зона была бы определена более надежно при выполнении инвазивного мониторинга.

Относительно неблагоприятные результаты хирургического лечения (Engel 2-3-4) у пациентов, которым выполнялся и видео-ЭЭГ-мониторинг, и инвазивный мониторинг, были приняты как истинно отрицательные результаты. Вероятно, у данных больных структурно-функциональная организация эпилептической системы не может быть инвариантно описана с использованием современных методов регистрации БЭА. Эта группа больных отражает ограничения нейрофизиологических методик прехирургического обследования больных со структурной эпилепсией.

Исходя из полученных данных проведен расчет диагностической эффективности видео-ЭЭГ-мониторинга (табл. 1).

Для видео-ЭЭГ-мониторинга отмечена средняя чувствительность методики (50,0 %) и средняя точность (45,9 %). При этом наблюдается относительно низкая прогностичность положительного результата (33,3 %) и соответственно высокая прогностичность отрицательного результата (60,7 %).

Считается, что одним из наиболее валидных диагностических приемов для локализации эпи-

лептогенной зоны является регистрация иктально-го паттерна и локализация зоны начала приступа, как наиболее близко расположенной к эпилептогенной зоне. В обследованной когорте пациентов, которым выполнялся инвазивный мониторинг БЭА, были выделены две подгруппы. В первую подгруппу вошли 17 пациентов, у которых была выполнена регистрация иктального события при проведении экстраоперационного инвазивного мониторинга БЭА. В данной подгруппе хирургическая деструкция эпилептического очага в обязательном порядке включала деструкцию зоны начала иктального паттерна. Анализ зависимости исходов оперативного лечения в подгруппе пациентов с зарегистрированной зоной начала иктального паттерна показал, что в только в 17,6 % (3 пациентов) исход хирургического лечения мог быть оценен как успешный (Engel 1). У 14 пациентов исход хирургического лечения был более драматичен (Engel 2-3-4). Во второй подгруппе (11 человек) локализация эпилептогенной зоны и планирование объема хирургического лечения осуществлялись только на основании результатов регистрации интериктальной активности. В данной подгруппе благоприятный исход был достигнут в 8 (72,7 %) случаях.

Была выполнена оценка диагностической эффективности инвазивного мониторинга БЭА (табл. 1). Референсной методикой была выбрана регистрация иктального паттерна и локализация зоны начала приступа при выполнении инвазивного мониторинга БЭА. Благоприятный исход в подгруппе пациентов с инвазивным мониторингом рассматривался как истинно положительный результат, а благоприятный исход хирургического лечения в подгруппе больных, у которых было зарегистрировано иктальное событие, как ложно отрицательный результат. Относительно неблагоприятные исходы в подгруппах расценивались, соответственно,

Таблица 1. Диагностическая эффективность методик прехирургического мониторинга биоэлектрической активности головного мозга у больных с височной фармакорезистентной эпилепсией, %

Показатели эффективности	Видео-ЭЭГ-мониторинг	Инвазивный мониторинг
Чувствительность	50,0	72,7
Специфичность	43,6	82,4
Точность	45,9	78,6
Прогностичность положительного результата	33,3	72,7
Прогностичность отрицательного результата	60,7	82,4

как ложно положительные и истинно отрицательные результаты выполнения исследования.

Для инвазивного мониторинга БЭА отмечены достаточно высокие значения чувствительности методики (72,7 %) и прогностичности положительного результата (72,7 %).

Таким образом, полученные результаты ретроспективного анализа успешности хирургического лечения височной эпилепсии показывают, что прогноз успешности хирургического лечения не может строиться исключительно на характере интериктальной активности, даже зарегистрированной непосредственно с коры и глубоких структур головного мозга.

Таким образом, при относительно простых формах фокально обусловленной эпилепсии видео-ЭЭГ-мониторинг обладает достаточным уровнем чувствительности и прогностичности положительного результата. При многоочаговых формах или при расположении эпилептического очага в глубоких структурах более точной методикой для локализации эпилептогенной зоны является инвазивный мониторинг БЭА.

Обсуждение результатов

В настоящее время в основе фокальной теории лежит концепция эпилептогенной зоны — зоны коры, хирургическое удаление которой приводит к освобождению от приступов [7]. Исходя из этой концепции, гипотетически идеальной для хирургии структурной фармакорезистентной эпилепсией является форма, при которой нейрофизиологическое обследование выявляет одиночный фокус интериктальной активности, не имеющей вторичного распространения, зона начала иктального паттерна локализована в пределах фокуса, а сам фокус расположен в пределах эпилептогенного поражения. Накопленный многолетний опыт хирургического лечения структурной эпилепсии показывает, что успешность хирургического лечения фокальных форм даже при полной конкордантности результатов всех предоперационных исследований не достигает 95 % [4].

Накопившиеся противоречия между постулатами фокальной теории эпилепсии и опытом хирургического лечения привели к тому, что в последние 10-15 лет многие исследователи становятся активными сторонниками теории эпилептической системы. Согласно этой теории, в основе височной эпилепсии лежит не только локальное эпилептогенное поражение, а формирование устойчивой патологической системы, включающей различные структурные образования и проводящие пути. Наиболее полно теория

эпилептической системы была разработана в 1960-х годах Талейраком [6].

Обе существующие теории в своих построениях патогенетических моделей эпилепсии опираются на результаты нейрофизиологического обследования. Согласно фокальной теории локализация эпилептогенной зоны строится исходя из результатов анализа иктального паттерна. В основе теории эпилептической системы лежит «клинико-анатомо-нейрофизиологический анализ» по Талейраку [5, 8, 9]. Тем не менее следует признать, что теория эпилептической системы также, как и фокальная теория, не отвечает на все накопившиеся вопросы. Изменения БЭА при эпилепсии отражают индивидуальный нейрофизиологический фенотип, который формируется в результате действия патогенетических механизмов, лежащих в основе эпилепсии. Однако фенотип не является «контрастным отражением» механизмов патогенеза. Основными причинами искаженного отражения механизмов эпилептогенеза в нейрофизиологических паттернах, на наш взгляд, являются следующие. Во-первых, на механизмы генерации БЭА действуют не только патогенетические факторы, но и механизмы саногенеза. В результате суммарная активность отражает интерференцию разнонаправленных механизмов. Во-вторых, одним из базовых механизмов функционирования ЦНС является формирование типовых патологических процессов. Набор патологических изменений БЭА, в том числе и при эпилепсии, не может быть бесконечным. Результатом выступает феномен, который можно описать как «фенотипическая конвергенция» — формирование сходных изменений БЭА при различном сочетании патогенетических и саногенетических механизмов. Конвергенции нейрофизиологических фенотипов способствуют особенности проведения БЭА как электрического сигнала в объемном проводнике, которым является мозг, и особенности проведения сигнала на поверхность скальпа. Не вдаваясь в подробное рассмотрение этой проблемы, можно лишь отметить, что эпилептический разряд должен быть достаточной мощности, чтобы он был зарегистрирован даже с поверхности коры. Но даже зарегистрированный разряд не позволяет судить о «глубине залегания» источника этого разряда. К сожалению, это противоречие не способна преодолеть полностью даже методика стерео-ЭЭГ, в основе которой установка многочисленных глубинных электродов.

Полученный результат показывает, что прогноз успешности хирургического лечения височ-

ной эпилепсии не может строиться исключительно на характере интериктальной активности, даже зарегистрированной непосредственно с коры и глубоких структур головного мозга. Так, удаляя детерминантный фокус эпилептической активности, то есть фокус полностью определяющий функционирование эпилептической системы, положительное воздействие может не оказываться, если источник генерации зарегистрированной активности залегает глубже, чем зарегистрировавшие его электроды, например, в случае локализации патологической констелляции нейронов на дне корковой борозды. Аналогичными механизмами могут быть объяснены случаи с относительно неблагоприятными исходами хирургического лечения эпилепсии, объем которого определялся на основании результатов инвазивного мониторинга с регистрацией иктального паттерна. При инвазивном мониторинге БЭА достаточно точно локализуется зона начала приступа на коре. Но эта зона может оказаться лишь зоной проекции на кору зоны начала иктального события. Таким образом, результаты регистрации как интериктальной, так и иктальной активности при инвазивном мониторинге не всегда позволяют инвариантно локализовать эпилептический очаг. Тем не менее следует учитывать ретроспективный характер исследования, что обуславливает некоторые методологические ограничения и диктует осторожность в экстраполяции полученных данных.

Выводы

1. Диагностическая эффективность видео-ЭЭГ-мониторинга не позволяет инвариантно описать структурно-функциональную организацию сложных эпилептических систем.

2. Инвазивный мониторинг биоэлектрической активности головного мозга, выполняемый в рамках прехирургического обследования больных с височной фармакорезистентной эпилепсией, обладает высокой чувствительностью (72,7 %) и точностью (78,6 %).

3. Феномен конвергенции нейрофизиологических фенотипов обуславливает снижение диагностической эффективности неинвазивного и инвазивного мониторинга биоэлектрической активности головного мозга при височной фармакорезистентной эпилепсии.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Благодарности / Acknowledgments

Статья выполнена в рамках темы государственного задания по науке «Сопряжение нейрофизиологических и патоморфологических механизмов формирования патологической системы при структурной эпилепсии» (Пер. № ААА-А-19-119070490032-0, 2019-2021 гг.).

Авторы выражают благодарность д.м.н., доценту А. Ю. Улитину, бывшему директору РНХИ им. проф. А. Л. Поленова (2016-2020 гг.); к.м.н. В. Г. Нездоровиной, заведующей вторым нейрохирургическим отделением РНХИ им. А. Л. Поленова; нейрохирургу д.м.н. В. Р. Касумову.

Список литературы / References

1. Krylov V.V. Khirurgiya ehpilepsii. M.: ID ABVpress, 2019. In Russian [Крылов В.В. Хирургия эпилепсии. М.: ИД АБВ-пресс, 2019].
2. Luders HO. Textbook of Epilepsy Surgery. London: CRC Press, 2008. P. 1648.
3. Rolston JD, Englot DJ, Cornes S, et al. Major and minor complications in extraoperative electrocorticography: A review of a national database. *Epilepsy Res.* 2016;122:26–29. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2016.02.004.
4. Aghakhani Y, Liu X, Jette N, et al. Epilepsy surgery in patients with bilateral temporal lobe seizures: a systematic review. *Epilepsia.* 2014;55 (12):1892–901. DOI: 10.1111/epi.12856.
5. Englot DJ, Raygor KP, Molinaro AM, et al. Factors associated with failed focal neocortical epilepsy surgery. *Neurosurgery.* 2014;75(6):648–656. DOI: 10.1227/NEU.0000000000000530.
6. Josephson CB, Dykeman J, Fiest KM, et al. Systematic review and meta-analysis of standard vs selective temporal lobe epilepsy surgery. *Neurology.* 2013;80(18):1669–1676. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182904f82.
7. DiLorenzo DJ, Mangubat EZ, Rossi MA, et al. Chronic unlimited recording electrocorticography-guided resective epilepsy surgery: technology-enabled enhanced fidelity in seizure focus localization with improved surgical efficacy. *J Neurosurg.* 2014;120(6):1402–1414. DOI: 10.3171/2014.1.JNS131592.
8. Talairach J, Bancaud J. Lesion, “irritative” zone and epileptogenic focus. *Confin Neurol.* 1966;27(1):91–94. DOI: 10.1159/000103937.
9. Aleksandrov MV, Ivanov LB, Lytaev SA, et al. Ehlektroehntsefalografiya: rukovodstvo. 3rd ed., revised and supplemented. SPb.: SpeTSLit, 2020. P. 224. In Russian [Александров М.В., Иванов Л.Б., Лытаев С.А. и др. Электроэнцефалография: руководство. 3 изд., перераб. и доп. СПб.: СпецЛит, 2020. С. 224].

Информация об авторах:

Марченко Елена Владимировна, врач функциональной диагностики отделения клинической нейрофизиологии, РНХИ им. проф. А. Л. Поленова (филиала ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России);

Александров Михаил Всеволодович, д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической нейрофизиологии, РНХИ им. проф. А. Л. Поленова (филиала ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России);

Одинцова Галина Вячеславовна, к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ эпилептологии РНХИ им. проф. А. Л. Поленова (филиала ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России);

Чухловин Александр Алексеевич, к.м.н., заведующий лабораторией нейрофизиологического мониторинга отделения клинической нейрофизиологии РНХИ им. проф. А.Л. Поленова (филиала ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России).

Author information:

Marchenko Yelena V., Physician of Functional Diagnostics, Department of Clinical Neurophysiology, Polenov Neurosurgical Institute — branch of the Almazov National Medical Research Centre;

Aleksandrov Mikhail V., MD, Dr. Sc., Professor, Head of the Department of Clinical Neurophysiology, Polenov Neurosurgical Institute — branch of the Almazov National Medical Research Centre;

Odintsova Galina V., PhD, Senior Researcher, Research Laboratory of Epileptology, Polenov Neurosurgical Institute — branch of the Almazov National Medical Research Centre;

Chukhlovin Aleksandr A., Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Neurophysiological Monitoring of the Department of Clinical Neurophysiology, Polenov Neurosurgical Institute — branch of the Almazov National Medical Research Centre.

АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ И СПЕКТРА ВАРИАНТОВ В ГЕНЕ ТАЙТИНА В УСЛОВНО ЗДОРОВОЙ РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Вахрушев Ю. А., Козырева А. А., Жук С. В., Ротарь О. П.,
Костарева А. А.

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

Контактная информация:

Вахрушев Юрий Алексеевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Акkuratова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: vakhrushev_yua@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию
12.10.2021 и принята к печати 15.12.2021.

Резюме

Актуальность. Ген тайтина (в русскоязычной литературе можно встретить также название титин/коннектин) ассоциирован с развитием кардиомиопатий, однако его крупные размеры (294 тыс. пар оснований) обуславливают большое число уникальных генетических вариантов, интерпретация которых затруднена. Кроме того, на сегодняшний день не существует данных по спектру вариантов в условно здоровой российской популяции. Определение частоты и спектра вариантов тайтина позволит интерпретировать результаты молекулярно-генетического обследования у пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями и оценить прогноз течения этих заболеваний. **Цель.** Изучить спектр и частоту однонуклеотидных и укорачивающих вариантов в гене тайтина в условно здоровой российской популяции и сравнить с данными международных регистров, а также оценить степень их патогенности и распределение по структуре белка. **Материалы и методы.** В исследование включены 192 мужчины в возрасте $55,8 \pm 6,6$ лет. Им было выполнено молекулярно-генетическое обследование при помощи технологии высокопроцессивного секвенирования, основанной на использовании набора целевых зондов ко всем кодирующим экзонам тайтина, с последующим подтверждением полученных генетических вариантов секвенированием по Сэнгеру. **Результаты.** Аллельная частота миссенс-вариантов (с частотой менее 0,1 %) в гене тайтина в условно здоровой российской популяции составила 15,1 %, а укорачивающих вариантов — 0,52 %. По распределению с точки зрения патогенности 37,9 % из них являлись вариантами неопределенной значимости, 62 % — вероятно доброкачественными и 0,1 % — доброкачественными. Патогенных и вероятно патогенных вариантов выявлено не было. Найденные генетические варианты равномерно распределялись по всей длине молекулы тайтина. **Заключение.** Вышеуказанные результаты совпадают с данными международных исследований и регистров. Использованный нами лабораторный метод секвенирования нового поколения с последующим подтверждением полуавтоматическим секвенированием по Сэнгеру может применяться в клинической практике и при создании базы данных генетических вариантов условно здоровой российской популяции.

Ключевые слова: высокопроцессивное секвенирование, индекс процента сплайсинга, кардиомиопатии, однонуклеотидные полиморфизмы, тайтин, *TTNtv*.

Для цитирования: Вахрушев Ю.А., Козырева А.А., Жук С.В. и др. Анализ частоты и спектра вариантов в гене тайтина в условно здоровой российской популяции. Трансляционная медицина. 2021; 8 (5):29-37. DOI: 10.18705/2311-4495-2021-8-5-29-37

ASSAY OF FREQUENCY AND SPECTRUM OF GENETIC VARIANTS IN TTN IN HEALTHY RUSSIAN POPULATION

Vakhrushev Yu. A., Kozyreva A. A., Zhuk S. V., Rotar O. P., Kostareva A. A.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Vakhrushev Yuriy. A.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: vakhrushev_yua@almazovcentre.ru

Received 12 October 2021; accepted
15 December 2021.

Abstract

Background. Gene *TTN* associated with all types of cardiomyopathy, however its large size (294 b.p.) warrants a lot of individual unique genetic variants or variants with low frequency, that aggravates their interpretation. Besides that nowadays there is no data about spectrum of variants in this gene in healthy Russian population. Recognition frequency and spectrum of variants in gene *TTN* in healthy Russian population will allow us to use it for interpretation results of molecular genetic research for patients with different heart pathology, and define prognosis for different heart diseases.

Objective. Recognize frequency and spectrum of single nucleotide and truncating variants in gene *TTN* in healthy Russian population and compare it with international data bases, and evaluate level of pathogenicity these variants and their distributing across titin structure.

Design and methods. 192 men in age $55,8 \pm 6,6$ years were tested with next-generation sequencing. Identified genetic variants were confirmed by Sanger sequencing.

Results. Allele missense variant frequency (with frequency less than 0.1%) in *TTN* in healthy Russian population amount to 15.1 %, and truncating variants — 0.52 %. 37,9 % of them were variants of unknown significance, 62 % — likely-benign and 0.1 % — benign. There was no pathological and likely-pathological variants. Identified genetic variants distributed throughout the titin structure.

Conclusion. Received result is congruent c international data bases and researches. Expended laboratory method (Next generation sequencing and confirmation with Sanger sequencing) can be used both in clinical practice, and in creating data bases of genetic variants in healthy Russian population.

Key words: cardiomyopathy, next-generation sequencing, PSI, SNP, titin, *TTN*tv.

For citation: Vakhrushev YuA, Kozyreva AA, Zhuk SV, et al. Assay of frequency and spectrum of genetic variants in TTN in healthy russian population. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2021;8(5): 29-37. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2021-8-5-29-37

Список сокращений:

ГКМП — гипертрофическая кардиомиопатия, ДКМП — дилатационная кардиомиопатия, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, КМП — кардиомиопатия, ACMG — Американский колледж медицинской генетики и геномики, PSI — индекс процента сплайсинга, *TTN*tv — укорачивающие варианты в гене тайтина.

Введение

Развитие лабораторных методов молекулярно-генетической диагностики в последнее десятилетие, в частности появление технологии секвенирования нового поколения, позволило осуществить детекцию вариантов в генах большого размера, ассоциированных с развитием патологии человека. Одним из них является ген тайтина (*TTN*) — бел-

ка, осуществляющего в структуре кардиомиоцита обеспечение пассивной жесткости саркомера, а также участвующего в сигнализации и саркомерогенезе. Молекулы тайтина, состоящие из иммуноглобулин-подобных, фибронектин-подобных доменов и уникальных последовательностей, расположены в саркомере от М-линии до Z-диска. Впервые мутации в данном гене были обнаружены в 2002 году у пациентов с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) [1], и на сегодняшний день они являются причиной 15–20 % всех случаев ДКМП [2]. Наиболее часто развитие данной патологии обусловлено укорачивающими вариантами (*TTNtv*), к которым относятся нонсенс-мутации, инсерции и делеции со сдвигом рамки считывания. В дальнейшем было доказано влияние *TTNtv* и на развитие других типов кардиомиопатий (КМП), таких как некомпактный миокард левого желудочка, аритмогенная КМП правого желудочка, а также нейромышечных заболеваний и различных нарушений ритма [3, 4].

На сегодняшний день считается, что основным механизмом действия *TTNtv* является гаплонедостаточность, что было доказано на кардиомиоцитах, полученных в результате дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с *TTNtv* или созданных при помощи технологии CRISPR–Cas9 [5]. При исследовании кардиомиоцитов было выявлено, что *TTNtv* приводят к дезорганизации саркомера и подавлению сигнальных путей, необходимых для работы кардиомиоцита [5]. При исследовании влияния *TTNtv* на работу миокарда при использовании мышинных моделей было выявлено снижение ударного объема, фракции выброса левого желудочка и утончение миокарда у мышей с *TTNtv* по сравнению с аллелем дикого типа [6]. Большую сложность сейчас представляет интерпретация найденных генетических вариантов, так как примерно у 1–3 % в популяции присутствуют *TTNtv* [7, 8]. Наиболее часто, по данным международных баз данных, таких как gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org>) и ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>), генетические варианты в общей популяции расположены в I-зоне молекулы тайтина, которая обеспечивает главную функцию молекулы — изменение пассивной жесткости саркомера. При сравнении здоровых носителей *TTNtv* с контрольной группой у них было выявлено увеличение объема левого желудочка как в систолу, так и в диастолу, снижение сократимости, а также эксцентрическое ремоделирование, обнаруженное с помощью магнитно-резонансной томографии [6]. Вышеописанные данные в значительной степени

подтверждаются тем, что патогенные варианты в гене тайтина ассоциированы с развитием не только первичных КМП, но и неблагоприятных вариантов ремоделирования миокарда, под воздействием неблагоприятных факторов, таких как прием алкоголя, антрациклинов и др. [9, 10].

Помимо *TTNtv*, в гене тайтина обнаружено около 60,000 различных однонуклеотидных генетических вариантов, при этом у каждого здорового человека присутствует хотя бы один из них [11]. Большинство генетических вариантов являются доброкачественными или их патологического эффекта недостаточно для развития заболевания, но при этом они могут выступать в качестве модифицирующих факторов при наличии патогенных вариантов в других генах [12]. Несмотря на интерес к данному гену в работах ряда отечественных авторов [13, 14, 15], частоты и спектр вариантов в гене тайтина в условно здоровой российской популяции является до сих пор не исследованным. Актуальность получения данной информации обусловлена тем, что на сегодняшний день для интерпретации степени патогенности вновь выявленных генетических вариантов необходимо их соотнесение с имеющимися контрольными базами данных, в российской же популяции подобного рода ресурс отсутствует. Также целесообразно сопоставление уже найденных генетических вариантов с клинической картиной соответствующих пациентов для оценки их патогенности и включение данной информации в реестр для последующего применения в клинической практике.

Материалы и методы

В исследование включены мужчины ($n = 192$) из Северо-Западного региона в возрасте $55,8 \pm 6,6$ лет из исследования ЭССЕ–РФ [16]. Все пациенты подписали информированное согласие на проведение необходимых методов обследования, в том числе генетического анализа. Работа была одобрена Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) для генетического исследования была выделена из цельной крови с помощью набора FlexiGene DNA Kit. Контроль качества выделенной ДНК проводили с использованием электрофореза и спектрофотометрии. Для ультразвуковой обработки выделенной ДНК была применена ультразвуковая система Bioruptor компании Diagenode. Для приготовления библиотек были получены образцы ДНК размером 150 пар оснований. Оценка качества была проведена при помощи аппарата капиллярного электрофореза высокого разрешения Bioanalyzer 2100. При-

готовление библиотек для высокопроцессивного секвенирования осуществляли с помощью набора Sure Select Target Enrichment System. Было произведено восстановление концов образцов ДНК при помощи T4 и Klenow ДНК–полимеразы и T4 полинуклеотидной киназы, и проведена очистка с помощью магнитных частиц AMPure X. На следующем этапе было последовательно осуществлено прикрепление полиА–хвоста и концевых адапторов. По окончании данного этапа была проведена оценка качества вышеуказанным методом капиллярного электрофореза высокого разрешения. Максимальный уровень пика находился в диапазоне от 225 до 275 пар оснований. Следующий этап состоял из двух параллельных процессов: гибридизации и приготовления магнитных частиц, покрытых стрептавидином. Далее производился захват гибридизованной ДНК магнитными частицами и последующая их отмывка.

Последний этап приготовления библиотек состоял в прикреплении индексов к полученным образцам методом амплификации, их очистке с помощью магнитных частиц и последующей оценке качества и концентрации полученных библиотек. Для создания зондов был использован сервис Agilent Sure Design. Было создано три группы зондов только для экзонов гена *TTN*. Было создано 206 целевых интервалов. Были охвачены все экзоны, а также прилегающие к ним сайты сплайсинга.

Секвенирование было выполнено при помощи прибора Illumina MiSeq. Генетические варианты учитывались при количестве прочтений не менее десяти. Анализ данных секвенирования следующего поколения осуществлялся с использованием cutadapt v.3.0, bwa v.0.7.17, Picard v.2.25.0 and Genome Analysis ToolKit (GATK) v.4.2.0.0 на основании рекомендаций разработчиков GATK (<https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices/>) для идентификации коротких герминальных вариантов. HaplotypeCaller в когортном режиме использовался

для генотипирования индивидуальных GVCF файлов. Фильтрация полученных вариантов проводилась с использованием параметров, рекомендованных GATK. Клиническая интерпретация вариантов осуществлялась согласно классификации ACMG (Американского колледжа медицинской генетики и геномики) с использованием международных баз данных UniProt Variants, RedSeq, gnomAD exomes, ClinVar и DANN SNVs. Информация о частоте варианта бралась из базы данных gnomAD Genomes version 3.1.1. Варианты с частотой более 0,1 % исключались, потому что они не могут выступать в качестве патогенных или условно-патогенных. Найденные генетические варианты были подтверждены при помощи полуавтоматического секвенирования по Сэнгеру при помощи прибора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

Результаты

При биоинформатическом анализе данных, полученных в результате секвенирования, было выявлено 2069 вариантов в гене тайтина, в том числе 1102 миссенс-варианта, 896 синонимичных вариантов, 64 миссенс-варианта в сайте сплайсинга, 4 синонимичных замены в сайте сплайсинга, 1 вариант со сдвигом рамки считывания, 1 делеция и 1 инсерция без сдвига рамки считывания. Среди вариантов с частотой более 0,1 % ранее не описанных обнаружено не было. После исключения вариантов с частотой более 0,1 % для последующего анализа осталось 29 миссенс-вариантов, 7 синонимичных вариантов и 1 делеция со сдвигом рамки считывания соответственно. Данные варианты были обнаружены только у одного человека, и все они находились в гетерозиготном состоянии. Таким образом, аллельная частота миссенс-вариантов составила 15,1 %. Распределение данных вариантов изображено на рисунке 1. Единственным обнаруженным укорачивающим вариантом являлся rs781363456 (NM_133379.5:c.13939del, Glu4647LysfsTer54),

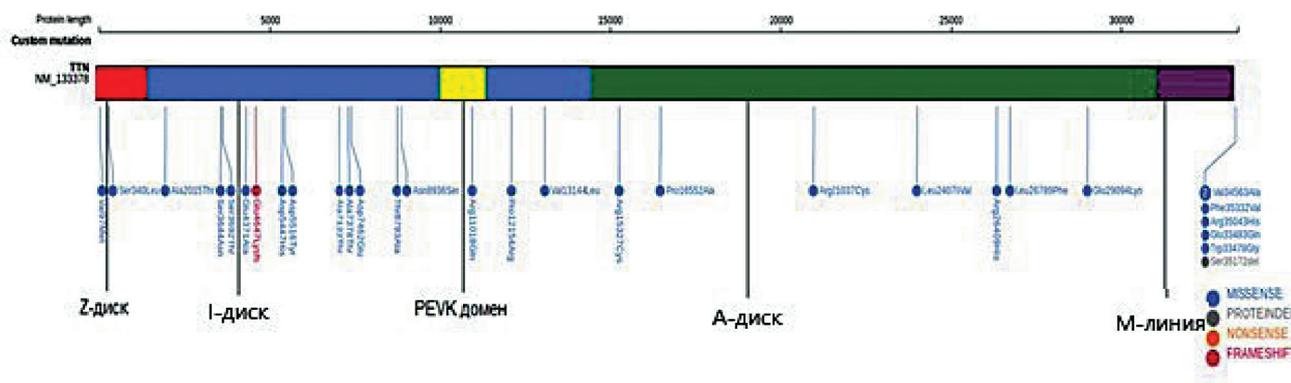


Рис. 1. Распределение генетических вариантов по структуре гена тайтина

который, согласно классификации ACMG, имеет неопределенную значимость. Аллельная частота встречаемости данного генетического варианта крайне низка (0,006371 %), что и обуславливает сложность его интерпретации. Таким образом, аллельная частота встречаемости *TTNtv* в условно здоровой популяции составила 0,52 %.

По распределению с точки зрения патогенности, 11 из них являлись вариантами неопределенной значимости, 17 — вероятно доброкачественными и 1 — доброкачественный. Патогенных и вероятно патогенных вариантов выявлено не было (рис. 2).

С точки зрения распределения по структуре молекулы тайтина, 11 из них были обнаружены в доменах фибронектина типа 3 и 6 — в иммуноглобулин-подобных доменах. При сравнении полученного распределения вариантов по структуре белка с данными международных исследований существенных различий обнаружено не было (рис. 3).

Найденные миссенс-варианты были также проанализированы на патогенность при помощи различных шкал на основе нейронных сетей, таких как FATHMM, Mutation Taster, SIFT, PolyPhen, CADD PHRED (табл. 1).

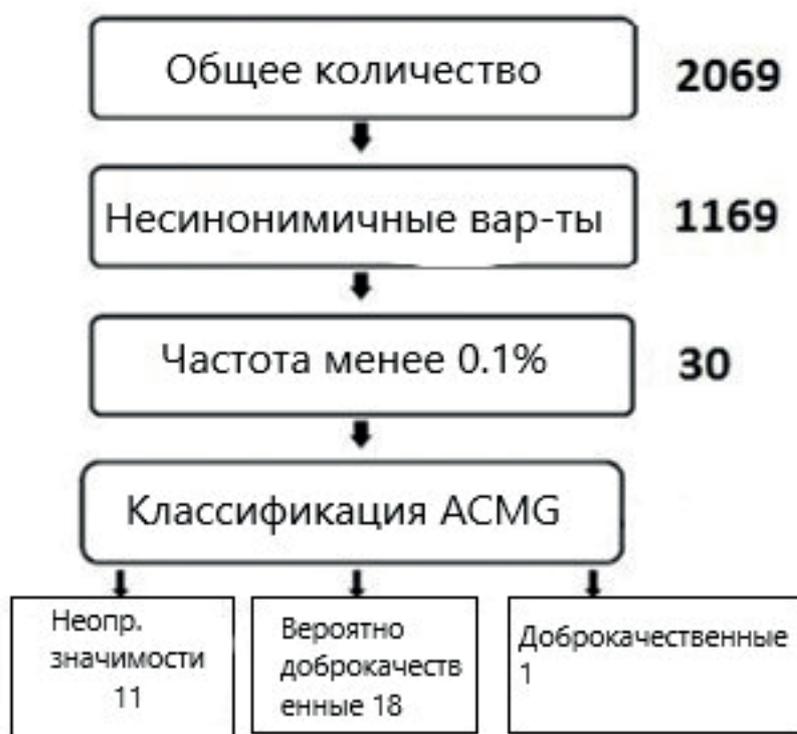


Рис. 2. Схема фильтрации найденных генетических вариантов

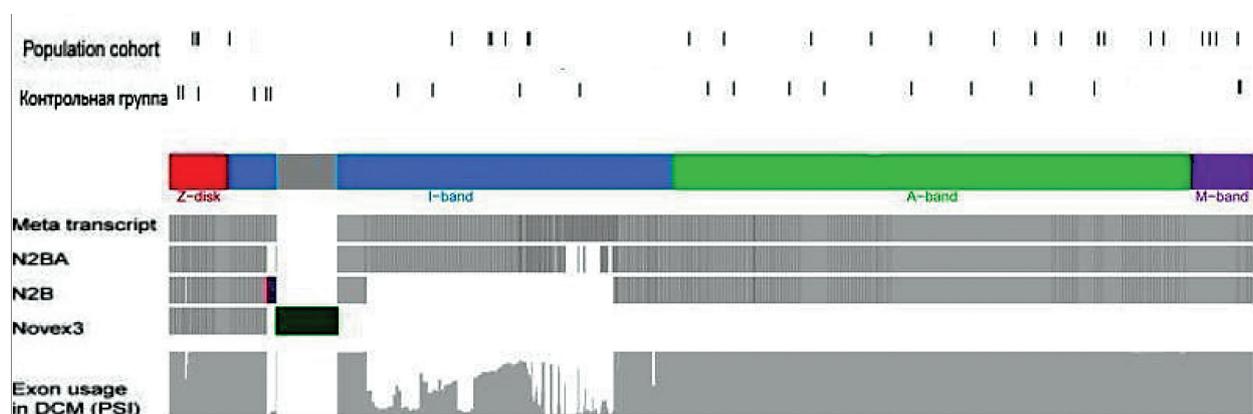


Рис. 3. Сравнение распределения генетических вариантов по структуре молекулы тайтина в условно здоровой российской популяции с результатами международных исследований. Серым цветом указан уровень экспрессии соответствующих экзонов

Таблица 1. Характеристика патогенности миссенс-вариантов в условно здоровой российской популяции по шкалам FATHMM, Mutation Taster, SIFT, PolyPhen, CADD PHRED

Миссенс-вариант	FATHMM	Mutation Taster	SIFT	PolyPhen	CADD PHRED
2:178713327:T>C	Tolerated (0,6593)	Disease causing, Polymorphism(0,5876)	Tolerated (0,04277)	benign (0)	5,272
rs776154251	Tolerated (0,7001)	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated (0,2068)	benign (0.003)	21,3
rs1001215658	No data	No data	No data	benign (0.012)	14,45
rs368321767	Tolerated (0,5435)	Disease causing (0,4195)	Tolerated (0,3325)	benign (0.018)	19,72
rs72650034	Tolerated (0,7025)	Polymorphism (0,08975)	Tolerated (0,3138)	benign (0.055)	7,632
rs202098308	Tolerated (0,6593)	Disease causing (0,4189)	Tolerated (0,2556)	benign (0.146)	16,44
rs55945684	Tolerated (0,6374)	Disease causing (0,4569)	Damaging (0,4819)	benign (0.183)	22,6
rs55945684	Tolerated (0,6374)	Disease causing (0,4569)	Damaging (0,4819)	benign (0.183)	22,6
rs147314430	Tolerated (0,5773)	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Damaging (0,4371)	benign (0.23)	10,91
COSV59974869	Tolerated (0,6556)	Disease causing (0,4457)	Tolerated (0,3554)	benign (0.322)	23,1
rs199501185	Tolerated (0,6575)	Disease causing (0,5876)	Damaging (0,5646)	possibly:damaging (0.607)	24
rs879099986	Tolerated (0,4106)	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated (0,08335)	possibly:damaging (0.696)	23,4
rs183482849	Tolerated (0,731)	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated (0,2031)	possibly:damaging (0.703)	15,45
rs776534823	Tolerated (0,6409)	Disease causing, Polymorphism (0,3858)	Tolerated (0,2107)	possibly:damaging (0.777)	23,6
rs72648940	Damaging (0,8164)	Disease causing (0,81)	Damaging (0,6542)	possibly:damaging (0.877)	24,2
rs72648206	Tolerated (0,5709)	Disease causing (0,4483)	Damaging (0,4504)	probably:damaging (0.917)	24,1
rs372304158	Tolerated (0,5435)	Disease causing (0,548)	Tolerated (0,3712)	probably:damaging (0.93)	25,7
rs1403788853	Tolerated (0,5594)	Disease causing (0,5293)	Damaging (0,5993)	probably:damaging (0.942)	24,2
rs185921345	Tolerated (0,7897)	Disease causing (0,4283)	Damaging (0,7849)	probably:damaging (0.953)	24,3

Миссенс-вариант	FATHMM	Mutation Taster	SIFT	PolyPhen	CADD PHRED
rs201394117	Tolerated (0,6818)	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated (0,1018)	probably:damaging (0.966)	23,8
rs367774903	Tolerated (0,6683)	Disease causing (0,5876)	Damaging (0,9125)	probably:damaging (0.982)	25,8
2:178613067:G>C	Damaging (0,8615)	Disease causing (0,81)	Damaging (0,9125)	probably:damaging (0.997)	23,7
rs370137295	Tolerated (0,7131)	Disease causing (0,5876)	Tolerated, Damaging (0,4278)	probably:damaging (0.998)	24
rs191549948	Tolerated (0,6073)	Disease causing (0,81)	Damaging (0,9125)	probably:damaging (0.998)	26,3
rs1414717534	Tolerated (0,8081)	Disease causing (0,81)	Damaging (0,5013)	probably:damaging (1)	16,06
rs374394719	Tolerated (0,6409)	Polymorphism (0,08975)	Tolerated(0,1015)	unknown (0)	0,006
rs371580084	Tolerated (0,7013)	Polymorphism (0,2615)	No data	unknown (0)	4,677
2:178740121:T>G	Tolerated (0,7489)	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated, Damaging(0,9125)	unknown (0)	12,34
rs78535378	Tolerated (0,7048)	Polymorphism (0,2305)	Tolerated (0,05061)	unknown (0)	11,81

Обсуждение

Использованный нами лабораторный метод определения генетических вариантов в гене тайтина успешно зарекомендовал себя. Данный метод в дальнейшем может быть использован в лабораторной диагностике и лабораторной генетике для поиска вариантов в гене тайтина, ассоциированных с развитием различных заболеваний, а также может быть применен в научных исследованиях для создания базы данных в условно здоровой российской популяции, включая при этом все экзоны, в том числе и редко транскрибируемые.

Полученные нами результаты свидетельствуют об их соответствии данным международных регистров: так, аллельная частота миссенс-вариантов в нашем исследовании составила 15,1 %, в то время как, согласно международным базам данных ExAC и gnomAD, это значение составляет 16,5 % и 17,1 % соответственно [17]. Среди обнаруженных миссенс-вариантов больше половины составили вероятно доброкачественные варианты (62 %), однако довольно значительную часть составили варианты неопределенной значимости (37,9 %). По структурному распределению мис-

сенс-вариантов в молекуле тайтина, половина из них (15) располагались в области I-зоны, экзоны которой имеют низкий уровень индекса процента сплайсинга (PSI) в изоформе N2B и транскриптах Novex 1–3 (рис. 3). Данный индекс характеризует процентное содержание определенной последовательности или экзона, проходящего этап сплайсинга, в зрелой мРНК. Часть конститутивных экзонов имеет PSI 100 %, то есть они содержатся во всех транскриптах, получаемых с данного гена. Остальные же экзоны, имеющие PSI менее 100 %, присутствуют лишь в части транскриптов. Порядка 90 % генов в организме подвержены альтернативному сплайсингу, что позволяет создавать в организме белковое многообразие, не увеличивая при этом количество ДНК в клетке. Альтернативный сплайсинг для тайтина имеет крайне важное значение, так как позволяет синтезировать множество различных изоформ для разных типов мышечной ткани в разные периоды онтогенеза: так, менее жесткая и более длинная N2BA изоформа синтезируется в сердце преимущественно в эмбриональном периоде, постепенно заменяясь после рождения на более жесткую и короткую

N2B изоформу, а в скелетной мускулатуре синтезируются два типа изоформы N2A — короткая (N2A(S)) и длинная (N2A(L)), изменение соотношения которых позволяет регулировать жесткость миофибриллы [18]. Данный индекс устанавливается при помощи секвенирования РНК и количественного сравнения различных последовательностей с одной матрицы [19]. Аналогичная ситуация и с укорачивающими вариантами: их частота в нашем исследовании составила 0,52 %, а согласно различным международным исследованиям их частота в общей популяции составляет от 1 % до 3 % [7, 8]. Кроме того, найденный укорачивающий вариант располагался в экзоне с PSI 7,3 %, что соответствует закономерности, при которой *TTNtv* в условно здоровой популяции располагаются преимущественно в экзонах I–зоны, имеющих низкий показатель PSI, в отличие от, например, когорты больных ДКМП, у которых *TTNtv* локализуется преимущественно в экзонах A–зоны тайтина, имеющих 100 % PSI [8]. Также стоит отметить, что именно показатель PSI является одним из ключевых факторов при классификации миссенс-вариантов при помощи различных алгоритмов оценки патогенности наряду с описанием клинической картины у носителей полиморфизмов.

Исходя из полученных результатов, очевидна неоднозначность и сложность интерпретации полученных данных, что еще раз подчеркивает необходимость создания базы данных генетических вариантов в гене тайтина для российской популяции. Полученные результаты могут быть в дальнейшем оформлены в качестве базы данных для клинической лабораторной диагностики сердечно-сосудистых и нейромышечных заболеваний.

Наше исследование имело ряд ограничений, таких как относительно малый состав изучаемой группы, а также отсутствие данных по секвенированию интронов тайтина, которые могут содержать регуляторные последовательности, влияющие на экспрессию белка. Секвенирование некодирующих последовательностей, по крайней мере в диапазоне 20 нуклеотидов от края экзона, может служить почвой для дальнейших исследований, однако патогенное влияние полиморфизмов в данных областях крайне мало.

Выводы

1. Аллельная частота миссенс-вариантов в гене тайтина составила 15,1 %, аллельная частота укорачивающих вариантов — 0,52 %, что соответствует данным международных регистров.

2. Среди обнаруженных миссенс-вариантов большинство составляли вероятно доброкаче-

ственные (62 %) и варианты неопределенной значимости (37,9 %). Патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов выявлено не было.

3. Найденные генетические варианты располагались по всей длине молекулы тайтина, что соответствует данным международных регистров.

4. Используемый нами лабораторный метод может применяться как в клинической практике, так и в создании базы данных генетических вариантов условно здоровой российской популяции.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Благодарности/Acknowledgments

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № ААА-А-А19-119070490034-4).

Список литературы / References

- Itoh-Satoh M, Hayashi T, Nishi H, et al. Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Feb 22; 291(2): 385-93. DOI: 10.1006/bbrc.2002.6448.
- Herman DS, Lam L, Taylor MR, et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2012 Feb 16; 366(7): 619-28. DOI: 10.1056/NEJMoa1110186.
- Taylor M, Graw S, Sinagra G, et al. Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes. *Circulation*. 2011 Aug 23; 124(8): 876-85. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.005405.
- Peled Y, Gramlich M, Yoskovitz G, et al. Titin mutation in familial restrictive cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2014 Jan 15; 171(1): 24-30. DOI: 10.1016/j.ijcard.2013.11.037.
- Hinson JT, Chopra A, Nafissi N, et al. HEART DISEASE. Titin mutations in iPSC cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. *Science*. 2015 Aug 28; 349(6251): 982-6. DOI: 10.1126/science.aaa5458. PMID: 26315439; PMCID: PMC4618316.
- Schafer S, de Marvao A, Adami E, et al. Titin-truncating variants affect heart function in disease cohorts and the general population. *Nat Genet*. 2017 Jan; 49(1): 46-53. DOI: 10.1038/ng.3719.
- Norton N, Li D, Rampersaud E, et al. Exome sequencing and genome-wide linkage analysis in 17 families illustrate the complex contribution of TTN truncating variants to dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013 Apr; 6(2): 144-53. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.111.000062.
- Akinrinade O, Koskenvuo JW, Alastalo TP. Prevalence of Titin Truncating Variants in General Population. *PLoS One*. 2015 Dec 23; 10(12):e0145284. DOI: 10.1371/journal.pone.0145284.
- van Spaendonck-Zwarts KY, Posafalvi A, van den Berg MP, et al. Titin gene mutations are common in families with both peripartum cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2014 Aug 21; 35(32): 2165-73. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu050.

10. Ware JS, Amor-Salamanca A, Tayal U, et al. Genetic Etiology for Alcohol-Induced Cardiac Toxicity. *J Am Coll Cardiol*. 2018 May 22; 71(20): 2293-2302. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.03.462.
11. Merlo M, Sinagra G, Carniel E, et al. Familial Cardiomyopathy Registry. Poor prognosis of rare sarcomeric gene variants in patients with dilated cardiomyopathy. *Clin Transl Sci*. 2013 Dec; 6(6): 424-8. DOI: 10.1111/cts.12116.
12. Golbus JR, Puckelwartz MJ, Fahrenbach JP, et al. Population-based variation in cardiomyopathy genes. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012 Aug 1; 5(4): 391-9. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.112.962928.
13. Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA. New titin (connectin) isoforms and their functional role in striated muscles of mammals: facts and suppositions. *Biochemistry (Mosc)*. 2012; 77(13): 1515-35.
14. Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA. Nuances of electrophoresis study of titin/connectin. *Biophys Rev*. 2017 Jun; 9(3): 189-199. DOI: 10.1007/s12551-017-0266-6
15. Vikhlyantsev IM, Okuneva AD, Shumilina UV, et al. Method for isolation of intact titin (connectin) molecules from mammalian cardiac muscle. *Biochemistry (Mosc)*. 2013;78(5):455-62. DOI: 10.1134/S0006297913050039
16. Boytsov SA, Drapkina OM, Shlyakhto EV, et al. Epidemiology of cardiovascular diseases and their risk factors in regions of Russian Federation (ESSE-RF) study. Ten years later. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021; 20(5): 3007. In Russian. [Бойцов С.А., Драпкина О.М., Шляхто Е.В., и др. Исследование ЭССЕ-РФ (Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний и их факторов риска в регионах Российской Федерации). Десять лет спустя. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2021; 20(5):3007] <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2021-3007>.
17. Akinrinade O, Heliö T, Lekanne Deprez RH, et al. Relevance of Titin Missense and Non-Frameshifting Insertions/Deletions Variants in Dilated Cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2019 Mar 11; 9(1): 4093. DOI: 10.1038/s41598-019-39911-x.
18. Neagoe C, Opitz CA, Makarenko I, Linke WA. Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness. *J Muscle Res Cell Motil*. 2003; 24(2-3): 175-89. DOI: 10.1023/a:1026053530766.
19. Schafer S, Miao K, Benson CC, et al. Alternative Splicing Signatures in RNA-seq Data: Percent Spliced in (PSI). *Curr Protoc Hum Genet*. 2015 Oct 6; 87:11.16.1-11.16.14. DOI: 10.1002/0471142905.hg1116s87.

Информация об авторах:

Вахрушев Юрий Алексеевич, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ;

Козырева Александра Анатольевна, к.б.н., старший научный сотрудник, Институт молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ;

Жук Сергей Владимирович, младший научный сотрудник, НИЛ молекулярного и клеточного моделирования и геномной терапии, НЦМУ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ;

Ротарь Оксана Петровна, к.м.н., заведующий НИЛ эпидемиологии артериальной гипертензии, НИО Артериальной гипертензии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ;

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

Author information:

Vakhrushev Yuriy A., assistant, Department of Clinical Laboratory Diagnostics and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Kozyreva Alexandra A., PhD, senior researcher, Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Zhuk Sergey V., junior researcher, Research Laboratory of Molecular and Cellular Modeling and Gene Therapy, World-class research centre for personalized medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Rotar Oksana P., Candidate of Medical Sciences, Head of the Research Laboratory of Epidemiology of Arterial Hypertension, Almazov National Medical Research Centre;

Kostareva Anna A., MD, DrSci, Director of the Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre.

БИОСОВМЕСТИМОСТЬ СКАФФОЛДОВ ИЗ СМЕСЕЙ И СОПОЛИМЕРОВ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И ПОЛИМОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ТЕСТАХ С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Мишанин А. И.¹, Панина А. Н.¹, Больбасов Е. Н.²,
Твердохлебов С. И.², Головкин А. С.¹

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

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск, Россия

Контактная информация:

Головкин Алексей Сергеевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: golovkin_a@mail.ru

Статья поступила в редакцию
20.10.2021 и принята к печати 16.11.2021.

Резюме

Актуальность. Биodeградируемые полимеры являются одной из наиболее перспективных групп материалов, пригодных для создания тканеинженерных конструкций. Высокий интерес к биополимерам связан с возможностью создания, за счет использования смесей и сополимеров, скаффолдов с заданными свойствами. При тестировании создаваемых материалов базовым является определение ключевых параметров биосовместимости. **Цель.** В тестах *in vitro* с мезенхимальными стволовыми клетками человека провести сравнительную оценку биосовместимых свойств биополимерных скаффолдов, изготовленных из поликапролактона, полимолочной кислоты, их смесей и сополимеров методом электроспиннинга. **Материалы и методы.** При сокультивировании с мезенхимальными стволовыми клетками человека были оценены адгезионные свойства и параметры цитотоксичности скаффолдов, изготовленных из поликапролактона, полимолочной кислоты, сополимера L- и D- изоформ молочной кислоты, смесей поликапролактона и полимолочной кислоты и поликапролактона и полигликолевой кислоты, сополимеров поликапролактона и полимолочной кислоты и поликапролактона и полимолочной кислоты с добавлением полигликолевой кислоты. **Результаты.** После сокультивации наибольшее количество распластанных веретеневидных МСК на поверхности было на полимерах, содержащих полигликолевую кислоту. Кроме того, на поверхности сополимера с полигликолевой кислотой клетки имели наиболее близкую к контролю морфологию. Меньше всего живых клеток было обнаружено на поверхности скаффолдов из полимолочной кислоты, больше всего — на поверхности образцов из смеси поликапролактона и полимолочной кислоты. **Заключение.** Наилучшими адгезионными свойствами в экспериментах с мезенхимальными стволовыми клетками человека обладали биodeградируемые полимеры с добавлением полигликолевой кислоты.

Ключевые слова: Биodeградируемые полимеры, биосовместимость, полигликолевая кислота, поликапролактон, полимолочная кислота, скаффолд, смеси полимеров, сополимеры.

Для цитирования: Мишанин А.И., Панина А.Н., Больбасов Е.Н. и др. Биосовместимость скаффолдов из смесей и сополимеров поликапролактона и полимолочной кислоты в тестах с мезенхимальными стволовыми клетками. Трансляционная медицина. 2021;8(5):38-49. DOI: 10.18705/2311-4495-2021-8-5-38-49

BIOCOMPATIBILITY OF ELECTROSPINNING POLYCAPROLACTONE, POLYLACTIC ACID, THEIR BLENDS AND COPOLYMERS SCAFFOLDS IN IN VITRO TESTS IF MESENCHYME STEM CELLS

Mishanin A. I.¹, Panina A. N.¹, Bolbasov E. N.²,
Tverdokhlebov S. I.², Golovkin A. S.¹

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

Corresponding author:

Alexey S. Golovkin,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: golovkin_a@mail.ru

Received 20 October 2021; accepted
16 November 2021.

Abstract

Background. Biodegradable polymers are one of the most promising groups of materials suitable for creating tissue-engineered scaffolds. The high interest in biopolymers is associated with the possibility of creating scaffolds with desired properties, through the use of mixtures and copolymers. The determination of the key parameters of biocompatibility is the basic purpose for testing created materials. **Objective.** To perform the comparative in vitro study of biocompatibility properties of biopolymer scaffolds produced using polycaprolactone, polylactic acid, their mixtures and copolymers by electrospinning technology. **Design and methods.** The adhesion properties and cytotoxicity of scaffolds made from polycaprolactone, polylactic acid, copolymer of L- and D-isoforms of lactic acid, their mixtures and co-polymers with the addition of polyglycolic acid were investigated after scaffolds co-cultivation with human mesenchyme stem cells (MSC). **Results.** The largest number of spread spindle-shaped MSCs was on the surface of polymers containing polyglycolic acid. Besides, the cells on the surface of the copolymer with polyglycolic acid had the morphology closest to the control. The lowest number of living cells was found on the surface of polylactic acid scaffolds, and the highest on the surface of samples from of polycaprolactone and polylactic acid blend. **Conclusion.** Thus, all tested polymers had good adhesion properties in experiments with human mesenchyme stem cells were possessed by biodegradable polymers with the addition of polyglycolic acid.

Key words: Biocompatibility, biodegradable polymers, copolymers, polycaprolactone, polyglycolic acid, polylactic acid, polymer blends, scaffolds.

For citation: Mishanin AI, Panina AN, Bolbasov EN, et al. Biocompatibility of electrospinning polycaprolactone, polylactic acid, their blends and copolymers scaffolds in in vitro tests if mesenchyme stem cells. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2021; 8(5):38-49. (In Russ.) DOI:10.18705/2311-4495-2021-8-5-38-49

Актуальность

В настоящее время терапия многих заболеваний основана на принципах регенерации, зачастую предполагая введение в организм пациента тканеинженерных конструкций. Методы тканевой инженерии позволяют управлять регенерацией

органа посредством моделирования оптимальных свойств используемого в качестве каркаса материала. Современная парадигма биосовместимости предполагает активное участие биоматериалов протезов в запуске репаративных процессов организма реципиента, включающих пролиферацию,

миграцию и адгезию на поверхности имплантируемых конструкций клеток различных типов, а также, при необходимости, запуск их дифференцировки в желаемом направлении [1, 2].

Тканеинженерные эквиваленты тканей и органов должны быть как можно более приближены по своему составу и характеристикам к соответствующим структурам. Однако для многих задач медицинской практики до сих пор не разработаны подходящие материалы, пригодные для конструирования протезов. В связи с этим последние десятилетия активно ведутся исследования, направленные на поиск оптимальных биоматериалов для применения в различных областях медицины [3].

На протяжении многих лет тканеинженерные конструкции проектировали таким образом, чтобы биоматериалы, входящие в их состав, сохраняли инертность в организме пациента, минимизируя нежелательные иммунные реакции в отношении имплантата [4]. Однако в настоящее время большое распространение при создании различных протезов получил подход, предполагающий активное взаимодействие биоматериала с тканями реципиента для запуска физиологического ответа, активирующего пролиферацию и/или дифференцировку клеток в месте имплантации [3].

Одной из перспективных групп материалов, способных удовлетворить современным требованиям, которые предъявляют к изделиям медицинского назначения, применяемым в регенеративной медицине, стали биodeградируемые полимеры [5]. К ним относятся, среди прочих, различные алифатические полиэфиры, такие как поли-L-лактид (PLA), поли-D-лактид, поли-D,L-лактид (PLDL), полигликолид (PGS), поли-ε-капролактон (PCL) и их сополимеры, например, поли-D,L-лактид-ко-гликолид и полилактид-ко-капролактон. Они различаются по растворимости, кристалличности, температуре плавления, механическим свойствам, а также времени биodeградации [6].

На сегодняшний день такие биodeградируемые полимеры, как поликапролактон, полимолочная и полигликолевая кислоты, уже находят применение в медицинской практике. Так, полигликолевая кислота активно применяется хирургами в качестве шовного материала DEXON® с 1970 года [7]. Смеси, изготовленные с использованием полигликолида, тестируются в качестве скаффолдов для регенерации хрящей, костей, связок и зубов. Полимолочная кислота используется в качестве костного фиксатора Fixsorb® [8]. Поликапролактон используется для разработки систем адресной доставки лекарств в места повреждений [5]. В настоящий момент перечисленные полимеры считаются

наиболее перспективными для конструирования тканеинженерных протезов различных органов, однако многие исследователи подчеркивают необходимость их модифицирования и комбинирования в различных соотношениях для достижения желаемых свойств [2].

Одним из достоинств биodeградируемых полимеров, помимо того, что они способны элиминироваться из организма в процессе регенерации поврежденных органов, является возможность моделирования поверхности изготовленных из них скаффолдов. Одним из популярных методов изготовления скаффолдов, позволяющих контролировать их структуру и тем самым создавать оптимальное топографическое решение для конкретной прикладной задачи, является метод электроспиннинга [9].

Цель

В тестах *in vitro* с мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) человека провести сравнительную оценку адгезионных свойств биополимерных скаффолдов, изготовленных из поликапролактона, полимолочной кислоты, их смесей и сополимеров методом электроспиннинга.

Материалы и методы

Образцы скаффолдов из биodeградируемых полимеров

Все тестируемые скаффолды были изготовлены методом электроспиннинга с использованием установки NANON-01A (MECC CO. Япония) в Томском политехническом университете. Для изготовления скаффолдов вне зависимости от тестируемых групп были использованы следующие технологические параметры. Напряжение формирования 30 кВ, расстояние от инжектора до сборочного коллектора 140 мм. Тип инжектора — игла 22 G. Тип сборочного коллектора — стальной цилиндр из нержавеющей стали размером 10×200 мм. Частота вращения коллектора 50 об/мин. Скорость подачи прядильного раствора 6 мл/час. Прядильные растворы готовили, растворяя соответствующий полимерный материал в гексафторизопропанол (Sigma, США) при температуре 24 °С в течение 12 часов, используя герметичный стеклянный реактор, до получения однородной прозрачной вязкой жидкости. После формирования скаффолд отделяли от сборочного коллектора и помещали в вакуум 5×10^{-3} Па на 24 часа для удаления остаточных растворителей.

В исследование были включены скаффолды, изготовленные из следующих полимерных материалов:

- Поликапролактон (Polycaprolactone (PURASORB® PC 12, PURAC, Gorkum, Netherlands), PCL);

- Полимолочная кислота (Poly-L-lactic acid (PURASORB® PL 38, PURAC, Gorkum, Netherlands), PLA);
- Сополимер L- и D- изоформ молочной кислоты (L-lactide/D-lactide copolymer (PURASORB® PLDL 8038, PURAC, Gorkum, Netherlands), PLDL);
- Смесь поликапролактона и полимолочной кислоты (Polycaprolactone + Poly-L-lactic acid, PCL PLA);
- Смесь поликапролактона и полигликолевой кислоты (Polycaprolactone + Polyglycolide (PURASORB® PGS, PURAC, Gorkum, Netherlands), PCL PGS);
- Сополимер поликапролактона и полимолочной кислоты (L-lactide/Caprolactone copolymer (PURASORB® PLC 7015, PURAC, Gorkum, Netherlands), PLC7015);
- Сополимер поликапролактона и полимолочной кислоты с добавлением полигликолевой кислоты (L-lactide/Caprolactone copolymer + Polyglycolide, PLC7015 PGS).

Мезенхимальные стволовые клетки человека

Забор жировой ткани для получения МСК проводился в ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» у здоровых доноров. Исследование было одобрено Этическим комитетом Центра им. В. А. Алмазова (№ 12.26/2014; 1 декабря 2014 г.). Все биологические тесты были выполнены в соответствии с Хельсинкской Декларацией. От всех пациентов было получено информированное согласие на проведение процедуры. После забора материал — 1 г жировой ткани из окологупочной области — помещали в одноразовую пробирку. В стерильных условиях культурального бокса ткань фрагментировали до однородной массы ресуспендированием и переносили в культуральные чашки диаметром 35 мм с раствором DMEM (Lonza, Бельгия):коллагеназа 1 типа (Worthington, США) в соотношении 1:1. Инкубацию в растворе проводили при 37 °C в течение 30 минут — 1 часа. После этого суспензию центрифугировали при 500g 5-10 минут. Надосадочную жидкость удаляли, к осадку добавляли среду для культивирования и переносили на флаконы 75 см² (BD, США).

Для культивирования МСК использовали среду α -MEM (Modified Eagle's Medium) (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Hyclone, США), 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США), 100 ЕД/мл пенициллина (Invitrogen, США), 2 мМ L-глутамин (Invitrogen, США). Клетки культивировали во влажной атмосфере с 5 % содержанием CO₂ при 37 °C до достижения ими 70-80 % конфлюэнтного монослоя. Для дезинтеграции монослоя клетки сначала промыва-

ли стерильным 0,01М фосфатно-солевым буфером (PBS) (Биолот, Россия) (pH 7,3-7,5), затем добавляли 0,125 % раствор трипсина-ЭДТА (Gibco, США) и помещали в CO₂-инкубатор на 3-5 минут. После этого к суспензии открепившихся клеток добавляли полную питательную среду с сывороткой для ингибирования трипсина и снимали клетки с флакона, затем центрифугировали при 300g в течение 5 минут, осадок ресуспендировали в свежей питательной среде. Подсчет клеток проводили в камере Нойбауэра. До проведения экспериментов МСК культивировали в стерильных флаконах 75 см². Для экспериментов использовали МСК 3-5 пассажей.

Оценка адгезии клеток на биodeградируемых скаффолдах

Стерильные фрагменты скаффолдов стандартной формы и размеров помещали в лунки 24-луночного плоскодонного планшета (Corning, США). Далее в лунки вносили суспензию клеток в концентрации 100 000 клеток на лунку. Контролями служили лунки с покровными стеклами. Планшет помещали во влажную атмосферу с 5 % содержанием CO₂ при 37 °C на трое суток, после чего проводили фиксацию образцов с адгезированными на них клетками. Для этого кусочки скаффолдов перекладывали в чистые лунки и быстро отмывали в PBS от остатков питательной среды в течение нескольких секунд. После этого из лунок отбирали PBS и вносили 4 % раствор параформальдегида (ПФА) (Sigma, США) на 15-20 минут. Затем образцы с фиксированными клетками промывали в PBS от остатков ПФА 3 раза по 3 минуты. Планшеты с образцами в PBS хранили до проведения окраски и дальнейшего исследования при 4 °C.

Для оценки адгезии клеток на скаффолдах из биodeградируемых полимеров проводили иммуноцитохимическое окрашивание образцов антителами к белку цитоскелета винкулину. Образцы с клетками обрабатывали 0,05 % раствором Triton X-100 (AppliChem, Германия) на PBS в течение 3 минут. Затем проводили 3 отмывки по 3 минуты в PBS. Для уменьшения неспецифического связывания антител образцы обрабатывали 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Amresco, США) на PBS в течение 30 минут. По истечении инкубации раствор BSA удаляли и вносили в лунки первичные мышинные моноклональные антитела к человеческому винкулину (VLN01) (Invitrogen, США) в разведении 1:200 в 1 % BSA-PBS и инкубировали 1 час при комнатной температуре. После этого образцы трехкратно отмывали в PBS и вносили вторичные козы анти-мышинные антитела IgG, меченные флуоро-

хромом Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США) в разведении 1:1000 в 1→ BSA-PBS на 1 час при комнатной температуре. Далее проводили 3 отмытки в PBS от остатков антител. Для окрашивания ядер клеток использовали интеркалирующий краситель DAPI (AppliChem, Германия). Стоковый раствор (5 мг/мл) разводили в PBS в соотношении 1:30 000. Окрашивание проводили в течение 15 секунд, после чего образцы трехкратно отмывали от остатков DAPI в PBS. До проведения визуализации образцы хранили в PBS в темноте при +4 °С. Покровные стекла с клетками из контрольных лунок монтировали на предметные стекла с использованием среды для заключения препаратов.

Визуализацию клеток на полимерных скаффолдах проводили при помощи инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert (Zeiss, Германия) и совместимого фотоаппарата Canon. Кусочки материалов с клетками помещали между двумя предметными стеклами. Флуоресценцию DAPI и Alexa Fluor 488 регистрировали с использованием соответствующих фильтров. Фотографировали по 10 разных полей зрения при увеличениях x20 и x40 для каждого технического повтора. В каждом эксперименте (биологическом повторе) проводили по 3 технических повтора с каждым типом образцов.

Полученные изображения были проанализированы с использованием программного обеспечения FIJI, для чего были разработаны макросы для подсчета количества ядер клеток, окрашенных DAPI, а также для расчета суммарной площади клеток

на образцах по выделению областей с высоким флуоресцентным сигналом по зеленому каналу (в котором регистрировалось свечение вторичных антител к винкулину) (рис. 1). Далее рассчитывали среднюю площадь, занимаемую одной клеткой на образце, в программе MS Excel по формуле:

$$\text{Средняя площадь одной клетки, мкм}^2 = \frac{\text{площадь изображения, мкм}^2}{\text{суммарная площадь клеток на образце, мкм}^2}$$

Для расчетов использовали изображения, полученные при увеличении x20. Для иллюстративного материала подготавливали изображения, полученные при увеличении x40, с использованием плагина ScientiFig для FIJI.

Оценка жизнеспособности МСК при сокультивировании с биodeградируемыми скаффолдами

На 3 сутки после посева клеток на полимерные скаффолды образцы отмывали от остатков среды в PBS и обрабатывали 3 % раствором трипсина в течение 5-7 минут, ориентируясь на степень открепления клеток в контрольных лунках. Затем к клеткам добавляли раствор 10 % ЭТС на PBS для нейтрализации фермента. Клетки ресуспендировали и переносили в пробирки, центрифугировали в течение 3 минут при 300g, удаляли надосадочную жидкость. К осадку добавляли аннексин V, меченный FITC (BioLegend, США), йодид пропи-

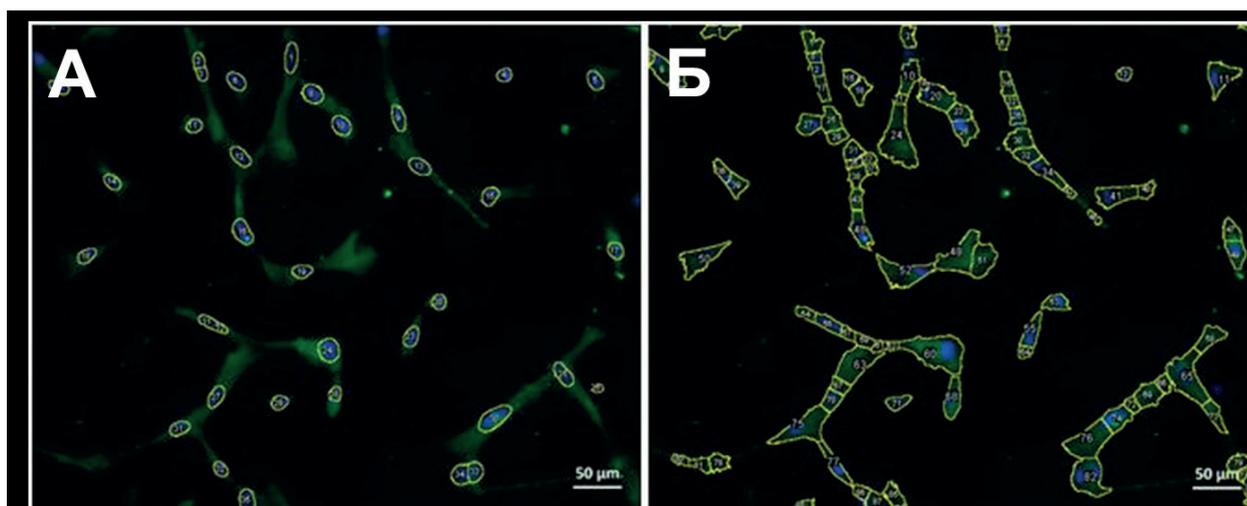


Рис. 1. Пример работы макроса по подсчету ядер, окрашенных DAPI (А), и выделению контуров клеток, окрашенных антителами к винкулину (Б), по интенсивности флуоресценции в соответствующих каналах

Figure 1. An example of the macros operation for counting nuclei stained with DAPI (A) and stained with antibodies to vinculin (B), according to the fluorescence intensity in the corresponding channels

дия (PI) (BioLegend, США) и кальцийсодержащий буфер (BioLegend, США) в соответствии с рекомендациями производителей. Содержимое тщательно перемешивали и инкубировали 20 минут в темноте при комнатной температуре. До проведения анализа клетки хранили в темноте при 4 °С.

Затем процент живых клеток, клеток в раннем апоптозе, а также клеток на поздних стадиях апоптоза и погибших определяли, используя метод проточной цитометрии (Guava EasyCyte, Millipore, Германия). Первоначальное гейтирование клеток проводили в линейных шкалах с использованием прямого и бокового светорассеивания. Настройки усиления по соответствующим каналам флуоресценции проводили с использованием интактных клеток, окрашенных изолированно аннексином V или PI, помещая негативные клетки в первую декаду логарифмической шкалы по соответствующему каналу детекции. Настройку компенсации осуществляли с использованием клеток с индуцированным апоптозом (перекись водорода 100 мкмоль), в силу отсутствия клеток, находящихся на ранних и поздних стадиях апоптоза в интактных культурах. Анализ результатов в каждой пробе выполняли после сбора не менее 3000 событий.

Для оценки и подсчета результатов использовали программное обеспечение Kaluza (Beckman Coulter). В каждом эксперименте проводили по 3

технических повтора. Статистическую обработку полученных данных проводили в компьютерной программе STATISTICA 7.0. При анализе результатов с проточного лазерного цитометра использовали t-критерий Стьюдента, результаты представляли в виде среднего значения и ошибки среднего: $M \pm m$. При анализе результатов, полученных посредством флуоресцентной микроскопии, использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни, результаты представляли в виде медианы и интерквартильного размаха: Me (25;75).

Результаты

Адгезионные свойства биodeградируемых полимеров, сополимеров и смесей

PCL и PLA, служившие базовыми образцами для сравнения с остальными полимерными скаффолдами, различались по адгезионным свойствам в отношении МСК. Количество МСК на поверхности скаффолда из PLA, относительная суммарная площадь клеток, а также степень распластности клеток на этом образце были выше по сравнению с соответствующими параметрами для PCL (таб. 1). Как смесь, так и сополимер PCL и PLA имели наименьшее количество МСК на своей поверхности по сравнению с чистыми полимерами. Кроме того, клетки на поверхности PCL PLA имели более округлую форму, чем на PCL или PLA. МСК на поверхности PLC7015 и PLDL были менее распласта-

Таблица 1. Адгезия мезенхимальных стволовых клеток к биodeградируемым полимерам. Me (25; 75)

Table 1. Adhesion of mesenchymal stem cells to biodegradable polymers

Образец	Количество клеток на единицу площади образца (1 мм ²)	Суммарная площадь, занимаемая клетками на образце, %	Средняя площадь, занимаемая одной клеткой на образце, мкм ²
контроль	530 (427; 661)	38.5 (35.9; 42.6)	772 (607; 878)
PCL	51 (35; 64) •†	1,5 (1,1; 2,5) •†	326 (264; 377) •†
PLA	76 (64; 143) •*	3,0 (2,4; 6,1) •*	389 (354; 425) •*
PCL PLA	22 (13; 29) •*†	0,5 (0,3; 0,8) •*†	226 (201; 274) •*†
PLDL	67 (51; 86) •	2,1 (1,6; 3,0) •†	319 (292; 379) •†
PLC7015	21 (13; 32) •*†	0,6 (0,4; 1,0) •*†	286 (234; 390) •
PCL PGS	73 (51; 89) •	2,5 (2,1; 3,2) •	389 (313; 443) •
PLC7015 PGS	140 (60; 207) •*	4,9 (2,8; 6,8) •*	456 (299; 569) •

Достоверность различий: •-p < 0,001 по сравнению с контролем; *-p < 0,01 по сравнению с PCL; †-p < 0,01 по сравнению с PLA

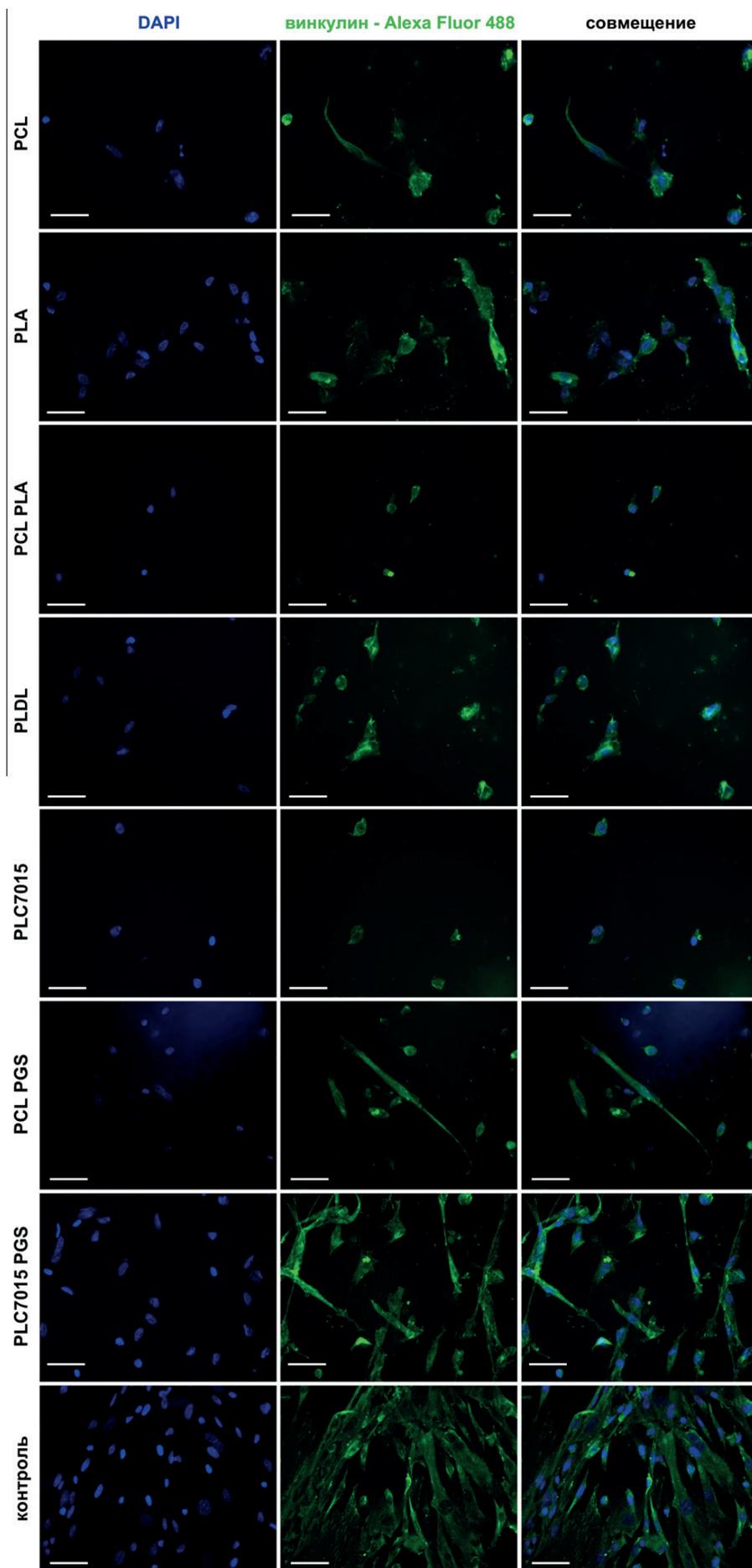


Рис. 2. Адгезия МСК на поверхности биodeградируемых полимерных скаффолдов.

Первый столбец — ядра клеток, окрашенные DAPI; второй столбец — цитоплазматическая локализация винкулина в МСК (визуализация конъюгированного с вторичными антителами флуорохроме Alexa Fluor 488 по каналу FITC); третий столбец — совмещение каналов. Масштабная линейка — 50 мкм

Figure 2. MSC adhesion on the surface of biodegradable polymer scaffolds.

The first column is cell nuclei stained with DAPI; the second column — cytoplasmic localization of vinculin in MSCs (visualization of Alexa Fluor 488 fluorochrome conjugated with secondary antibodies by the FITC channel); the third column is the alignment of the channels. Scale bar — 50 microns

ны, чем на PLA, однако существенных различий с PCL не имели (рис. 2).

Наибольшим количеством распластанных веретенновидных МСК на поверхности обладали полимеры, содержащие полигликолевую кислоту (PCL PGS, PLC7015 PGS) (рис. 2). На поверхности PLC7015 PGS МСК имели наиболее близкую к контролю морфологию. В том числе, у некоторых клеток были обнаружены фокальные контакты с поверхностью полимера в виде отчетливых коротких полос локализации винкулина в цитоплазме отростков клеток, схожие с контролем (рис. 3). На поверхности других полимерных скаффолдов отчетливых сайтов фокальной адгезии клеток не наблюдалось.

Жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток при сокультивировании с биodeградируемыми скаффолдами

По сравнению с контролем МСК на стекле, на поверхности всех исследуемых скаффолдов, кроме PLC7015 и PLC7015 PGS, количество живых клеток было ниже. Меньше всего живых клеток было обнаружено на поверхности PLA, больше всего — на поверхности PCL PLA (табл. 2).

Обсуждение

Проведенное тестирование биополимеров с позиции их адгезионного потенциала и жизне-

способности адгезировавшихся клеток продемонстрировало некоторую противоречивость результатов. Так, для полимолочной кислоты неплохой адгезионный потенциал сочетался с повышенной клеточной гибелью. PLDL обладал средней биосовместимостью при сокультивировании. PCL PLA обладал низкими адгезионными свойствами в отношении МСК, однако на его поверхности было обнаружено наибольшее количество жизнеспособных клеток. Такие параметры, как количество МСК, а также суммарная площадь, ими занимаемая, были снижены при культивировании этих клеток на поверхности PLC7015. С другой стороны, площадь, занимаемая одной клеткой на образце, была сравнима с PCL, который показал себя лучше по остальным характеристикам.

Для того чтобы быть признанными в качестве оптимальных материалов для создания тканеинженерных конструкций, новые биоматериалы должны успешно пройти множественные *in vitro* и *in vivo* испытания. При этом такие характеристики материалов, как жесткость, способность к резорбции в организме и скорость биodeградации, топография поверхности, обращенной к клеткам и тканям организма, смачиваемость и наличие модификаций, могут как увеличить шансы скаффолда на приживление, так и привести к неудачным операциям. К конструированию искусственного

Таблица 2. Жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток при сокультивировании с биodeградируемыми полимерами

Table 2. Viability of mesenchymal stem cells when co-cultivated with biodegradable polymers

Образец	Живые клетки, %	Клетки, находящиеся на ранних стадиях апоптоза, %	Погибшие клетки и клетки, находящиеся на поздних стадиях апоптоза, %
контроль	95.1 ± 0.6	2.5 ± 0.4	2.3 ± 0.3
PCL	89.6 ± 0.7 •	5.6 ± 0.3 •	4.8 ± 0.5
PLA	82.3 ± 2.2 •	8.1 ± 0.7 •	9.5 ± 1.4 •
PCL PLA	91.8 ± 0.3 •†	4.8 ± 0.4 †	3.3 ± 0.1 †
PLDL	89.7 ± 1.3 †	4.7 ± 0.6 †	5.5 ± 0.7 †
PLC7015	92.4 ± 1.3 †	3.0 ± 1.0 †	4.5 ± 0.2 •†
PCL PGS	83.9 ± 2.6	7.1 ± 0.7 •	8.8 ± 2.1
PLC7015 PGS	91.2 ± 1.3	3.3 ± 0.1 *†	5.5 ± 1.5

•-p < 0,01 по сравнению с контролем;

*-p < 0,01 по сравнению с PCL;

†-p < 0,05 по сравнению с PLA.

эквивалента каждого конкретного органа или ткани организма предъявляются разные требования, и, соответственно, ожидаются разные результаты тестирования [5, 10].

Оценка адгезионных и цитотоксических свойств биоматериалов, потенциально пригодных к созданию, например, протезов сосудов малого диаметра, основана на том, что скаффолды должны обладать способностью к эндотелизации

и привлечению к месту имплантации прогениторных клеток [11]. Соответственно, применительно к нашей экспериментальной модели, перспективные биодеградируемые скаффолды должны обладать высоким адгезионным потенциалом и низкими цитотоксическими свойствами.

По результатам исследования поликапролактон обладал низкой биосовместимостью в отношении МСК. Это согласуется с большим массивом литера-

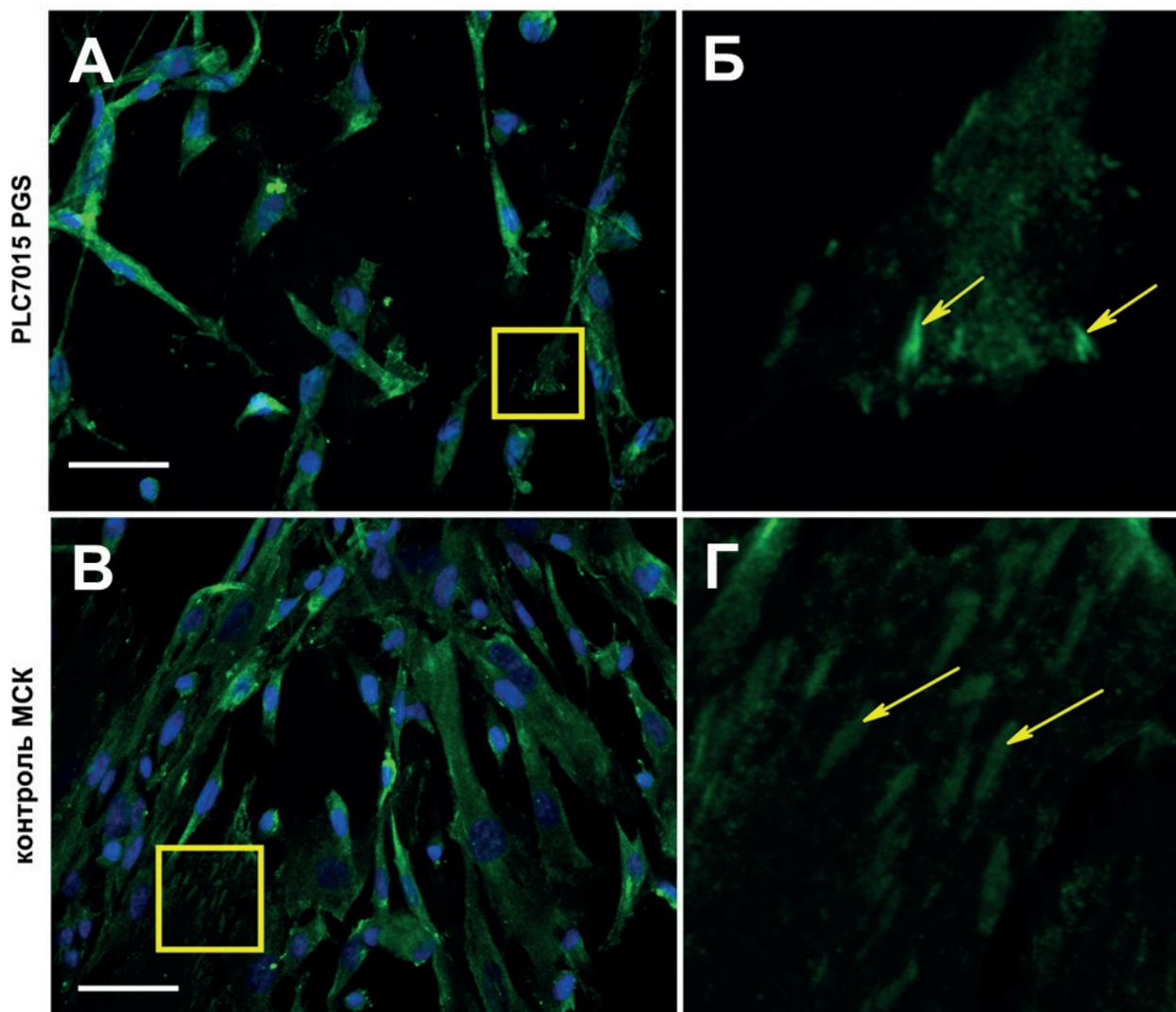


Рис. 3. Фокальные контакты, формируемые МСК на поверхности PLC7015 PGS и в контрольных лунках на стекле.

A, B – увеличение микроскопа x40; C, D – вставки, обозначенные рамкой на соответствующих фотографиях слева. Стрелки указывают на фокальные контакты МСК с поверхностью субстрата, видимые как короткие полосы локализации винкулина в цитоплазме. Масштабная линейка — 50 мкм

Figure 3. Focal contacts formed by MSCs on the surface of the PLC7015 PGS and in the control wells on the glass.

A, B — microscope magnification x40; C, D — inserts indicated by a frame in the corresponding photographs on the left. Arrows indicate focal contacts of MSCs with the substrate surface, visible as short bands of vinculin localization in the cytoplasm. Scale bar — 50 microns

турных данных, подтверждающих необходимость модификации этого полимера с целью увеличения его адгезионных свойств и, в целом, повышения биосовместимости [12, 13]. Однако встречаются исследования, в которых PCL проявлял себя лучше, чем другие полимеры. Например, PCL по сравнению с PLA и сополимером PLA и PGS показал себя лучше в экспериментах по оценке биосовместимости с макрофагами [14]. Скорее всего, биосовместимость PCL определяется в первую очередь параметрами топографии поверхности материала, такими как толщина фибрилл, размер пор, а также выбранной клеточной моделью.

Нами было показано, что PLA показала лучшие адгезионные свойства по сравнению с PCL. В то же время анализ жизнеспособности клеток на поверхности PLA выявил повышенное количество клеток в стадии раннего и позднего апоптоза и некроза. Это не согласуется с большей частью исследований, в которых PLA, напротив, является материалом сравнения в качестве наименее токсичного при исследованиях биосовместимых свойств *in vitro* [5, 15]. Однако многими исследователями подчеркиваются потенциальные отрицательные эффекты продукта деградации PLA — молочной кислоты на запуск воспалительного процесса *in vivo* [6]. В одном из исследований была показана цитотоксичность молочной кислоты *in vitro* в отношении МСК костного мозга крысы при превышении порога ее концентрации в культуральной среде, равного 20 ммоль/л. Причем было установлено, что критическое влияние на жизнеспособность клеток оказывает изменение уровня pH, сопровождающее увеличение содержания этого соединения в среде [16]. В другом исследовании оказалась значимой также роль самой молочной кислоты как химического соединения [17]. Возможно, происходит накопление молочной кислоты при сокультивировании материала с клетками или, по крайней мере, pH среды изменяется до критического значения, в частности из-за метаболической активности клеток. Авторы двух последних вышеприведенных экспериментальных статей рекомендуют при изготовлении тканеинженерных конструкций использовать PLA с небольшим молекулярным весом и большим размером пор для обеспечения быстрого и более эффективного элиминирования молочной кислоты из организма.

Особенности параметров биосовместимости материалов, а также присущих им физико-механических свойств определили стратегию дальнейшего развития технологий изготовления тканеинженерных конструкций из биodeградируемых полимеров, подразумевающую создание различных смесей и сополимеров. Такой подход призван

сохранить достоинства и приуменьшить недостатки каждого отдельного компонента [5].

В теории, изготовление механических смесей PLA и PCL позволяет контролировать пластичность итогового материала в зависимости от соотношения компонентов [18]. PCL имеет хорошую эластичность, но слишком большую жесткость. Напротив, PLA отличается хрупкостью, что может привести к спаданию, например, протеза сосуда, изготовленного из этого полимера. Как результат, возможно развитие истончений, аневризм, тромбозов протезов сосудов [19]. Примененная модель с равным соотношением компонентов, использованная в нашем исследовании для изготовления смеси PCL и PLA, дала противоречивые результаты.

Смесь PCL и PLA, в противоположность PLA, обладала сниженным адгезионным потенциалом, но при этом характеризовалась повышенным удельным содержанием живых клеток на поверхности материала. Высокая доля жизнеспособных клеток на поверхности этого скаффолда согласуется с литературными данными, подчеркивающими улучшение биосовместимых свойств PLA при добавлении PCL [18]. В теории, PCL в смеси с PLA приобретает более гидрофильные свойства, благоприятные для адгезии клеток. С другой стороны, снижается вероятность накопления чрезмерного количества кислых продуктов деградации PLA из-за снижения ее содержания в конечном полимере. В подтверждение этих гипотез можно привести исследование, в котором было показано, что морфология клеток NIH 3T3 при культивировании на поверхности смеси PCL и PLA была более близкой к контролю, чем при культивировании на PLA [20]. Вместе с тем, авторы данного исследования также проводили оценку влияния разных режимов электроспиннинга на свойства смесей PCL и PLA и показали, что условия формирования имеют значение при оценке биосовместимых свойств полученных скаффолдов. Кроме того, соотношение компонентов в смесях, примененных в исследовании (80:20 PLA:PCL), отличалось от использованного нами (70:30 PLA:PCL).

Сополимер PCL и PLA обладал относительно низким адгезионным потенциалом. В результате очевидна необходимость модификаций этого сополимера для увеличения биосовместимых свойств. Исследования в этом направлении уже проводятся и показывают улучшение результатов при введении в сополимер PCL и PLA дополнительных компонентов [21].

Интересные результаты были получены при культивировании МСК на поверхности PLDL. Удовлетворительные адгезионные свойства сочетались с высокой долей живых клеток на поверхности об-

разцов. Литературные данные подтверждают близкую к контролю морфологию клеток различных типов при культивировании на поверхности PLDL, а также высокую жизнеспособность клеток [22, 23].

В нашем исследовании мы также тестировали биосовместимые свойства смеси PCL и PGS. Полигликолевая кислота отличается выраженными адгезионными свойствами, однако в связи с трудностями в подборе растворителей возникают проблемы в создании смесей, содержащих этот полимер [5]. PCL PGS показал средние биосовместимые свойства в отношении МСК, характеризуясь небольшим количеством распластанных клеток на своей поверхности. Однако следует отметить, что при культивировании на этом материале мы наблюдали активное проникновение отростков клеток в толщу скаффолда, из-за чего клетки на фотографиях в ряде случаев казались округлыми. В условиях *in vivo* этот процесс осуществляется при взаимодействии клеток с внеклеточным матриксом и активной миграции клеток, поэтому такие наблюдения *in vitro* могут свидетельствовать о запуске миграционной активности клеток в системе сокультивирования с PCL PGS.

Считается, что PGS является перспективным полимером для улучшения биосовместимых свойств не только PCL, но и PLA. Отсутствие дополнительной метильной группы в химической структуре PGS делает этот полимер менее гидрофобным и менее устойчивым к гидролизу по сравнению с PLA [24]. В связи с этим полимеры имеют разное время деградации, и при изготовлении смесей и сополимеров PLA и PGS появляется возможность регулировать этот параметр для каждой конкретной задачи, варьируя соотношение компонентов. При увеличении скорости деградации таких смесей и сополимеров также снижается вероятность воспалительных реакций в ответ на накопление молочной и гликолевой кислот, так как они будут быстрее элиминироваться из организма [6]. В связи с этим полигликолевую кислоту было решено добавить также к сополимеру PLC7015.

PLC7015 PGS характеризовался высоким адгезионным потенциалом в отношении МСК. Это согласуется с литературными данными. Так, было показано, что при добавлении к поликапролактону сополимера PGS и PLA цитотоксический эффект материала в отношении различных типов клеток млекопитающих снижался [14].

Средние размеры (площади) клеток при культивировании в контрольных лунках соответствовали литературным данным [25, 26]. Однако при сокультивировании с биодеградируемыми скаффолдами практически во всех случаях площадь одной клетки оказывалась меньше описанной физиологической

нормы для *in vitro* культивирования. Это коррелировало с отсутствием признаков активной адгезии клеток на материалах — распластности и формирования комплексов фокальной адгезии. В случае с МСК наблюдали образование фокальных контактов с PLC7015 PGS, но степень распластности клеток была ниже по сравнению с контролем.

Выводы

Наилучшими адгезионными свойствами в экспериментах с мезенхимальными стволовыми клетками человека обладали биодеградируемые полимеры из поликапролактона и сополимера поликапролактона и полимолочной кислоты с добавлением полигликолевой кислоты (PCL PGS, PLC7015 PGS).

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Благодарности / Acknowledgments

Работа выполнена в рамках Государственного задания №2021-40.

Список литературы / References

- Williams DF. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials*. 2014; 35(38): 10009–14. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.08.035.
- Khademhosseini A, Langer R. A decade of progress in tissue engineering. *Nat Protoc*. 2016; 11(10): 1775–81. DOI: 10.1038/nprot.2016.123.
- Place ES, Evans ND, Stevens MM. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater*. 2009; 8(6): 457–70. DOI: 10.1038/nmat2441.
- Santos AR, Ferreira BMP, Duek EAR, Dolder H, Wada MLF. Use of blends bioabsorbable poly(L-lactic acid)/poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) as surfaces for Vero cell culture. *Brazilian J Med Biol Res*. 2005; 38(11): 1623–32. DOI: 10.1590/s0100-879x2005001100009.
- Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J Polym Sci Part B Polym Phys*. 2011 Jun; 49(12): 832–64. DOI: 10.1002/polb.22259.
- Tesfamariam B. Bioresorbable vascular scaffolds: Biodegradation, drug delivery and vascular remodeling. *Pharmacol Res*. 2016; 107: 163–71. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.03.020.
- Katz AR, Turner RJ. Evaluation of tensile and absorption properties of polyglycolic acid sutures. *Surg Gynecol Obstet*. 1970; 131(4): 701–16.
- Ueda H, Tabata Y. Polyhydroxyalkanoate derivatives in current clinical applications and trials. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003; 55(4): 501–18. DOI: 10.1016/s0169-409x(03)00037-1.
- Sell SA, McClure MJ, Garg K, Wolfe PS, Bowlin GL. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue

- engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61(12): 1007–19. DOI: 10.1016/j.addr.2009.07.012.
10. Viknianshchuk AN, Mishanin AI, Tverdokhlebov SI, et al. Approaches to biomaterials testing according to modern biocompatibility paradigm. *Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine.* 2017; 4(1): 29–40. In Russian. [Викнянчук А.Н., Мишанин А.И., Твердохлебов С.И. и др. Подходы к тестированию биоматериалов с позиции современной парадигмы биосовместимости. *Трансляционная медицина.* 2017; 4(1): 29–40]. DOI: 10.18705/2311-4495-2017-4-1-29-40.
11. Tsaryk R, Peters K, Unger RE, Feldmann M, Hoffmann B, Heidenau F, et al. Improving cytocompatibility of Co28Cr6Mo by TiO2 coating: Gene expression study in human endothelial cells. *J R Soc Interface.* 2013; 10(86): 20130428. DOI: 10.1098/rsif.2013.0428.
12. Antonova LV, Matveyeva VG, Borisov VV, et al. Impact of various modifications of biodegradable membranous scaffolds surface on multipotent mesenchymal stromal cells adhesion and viability. *Biulleten sibirskoi meditsiny=Bulletin of Siberian Medicine.* 2012; 11(4): 5–12. In Russian. [Антонова Л.В.; Матвеева В.Г.; Борисов В.В. и др. Влияние различных вариантов модификации поверхности биodeградируемых пленочных матриц на адгезию и жизнеспособность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Бюллетень сибирской медицины.* 2012; 4: 5–12]. DOI: 10.20538/1682-0363-2012-4-5-12.
13. Alvim Valente C, Cesar Chagastelles P, Fontana Nicoletti N, Ramos Garcez G, Sgarioni B, Herrmann F, et al. Design and optimization of biocompatible polycaprolactone/poly (l-lactic-co-glycolic acid) scaffolds with and without microgrooves for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res — Part A.* 2018; 106(6): 1522–34. DOI: 10.1002/jbm.a.36355.
14. Potnis P. A., Tesfamariam B. WSC, Potnis PA, Tesfamariam B, Wood SC. Induction of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and apoptosis by biodegradable polymers in macrophages: implications for stents. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011; 57(6): 712–20. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31821a4f1e.
15. Tsou CH, Kao BJ, Yang MC, Suen MC, Lee YH, Chen JC, et al. Biocompatibility and characterization of polylactic acid/styrene-ethylene-butylene/styrene composites. *Biomed Mater Eng.* 2015; 26(Suppl 1): S147–54. DOI: 10.3233/BME-151300.
16. He Y, Pan Z, Ding JD. Effects of degradation media of polyester porous scaffolds on viability and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Polym Sin.* 2013; 58(6): 755–64. DOI: 10.3724/SP.J.1105.2013.12439.
17. Chen T, Zhou Y, Tan WS. Influence of lactic acid on the proliferation, metabolism, and differentiation of rabbit mesenchymal stem cells. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25(6): 573–86. DOI: 10.1007/s10565-008-9113-7.
18. Chen L, Bai Y, Liao G, Peng E, Wu B, Wang Y, et al. Electrospun Poly(L-lactide)/Poly(ϵ -caprolactone) Blend Nanofibrous Scaffold: Characterization and Biocompatibility with Human Adipose-Derived Stem Cells. *PLoS One.* 2013; 8(8):e71265. DOI: 10.1371/journal.pone.0071265.
19. Piechota-Polanczyk A, Jozkowicz A, Nowak W, Eilenberg W, Neumayer C, Malinski T, et al. The Abdominal Aortic Aneurysm and Intraluminal Thrombus: Current Concepts of Development and Treatment. *Front Cardiovasc Med.* 2015; 2(19). DOI: 10.3389/fcvm.2015.00019.
20. Zhang C, Zhai T, Turng LS. Electrospinning of poly(lactic acid)/polycaprolactone blends: Investigation of the governing parameters and biocompatibility. *J Polym Eng.* 2018; 38(4): 409–17. DOI: 10.1515/polyeng-2017-0194.
21. Tsou CH, Yao WH, Lu YC, Tsou CY, Wu CS, Chen J, et al. Antibacterial property and cytotoxicity of a poly(lactic acid)/nanosilver-doped multiwall carbon nanotube nanocomposite. *Polymers (Basel).* 2017; 9(3): 1–13. DOI: 10.3390/polym9030100
22. Li RY, Liu ZG, Liu HQ, Chen L, Liu JF, Pan YH. Evaluation of biocompatibility and toxicity of biodegradable poly (DL-lactic acid) films. *Am J Transl Res.* 2015; 7(8): 1357–70.
23. Más BA, De Luna Freire DC, De Melo Cattani SM, Motta AC, Barbo MLP, De Rezende Duek EA. Biological Evaluation of PLDLA Polymer Synthesized as Construct on Bone Tissue Engineering Application. *Mater Res.* 2016; 19(2): 300–7. DOI: 10.1590/1980-5373-MR-2015-0559.
24. Santos Jr. AR. *Tissue Engineering: Bioresorbable Polymers for Tissue Engineering.* 2010; 225–46. Daniel Eberli (Ed.), ISBN: 978-953-307-079-7, InTech, DOI: 10.5772/8580.
25. Jiménez N, Krouwer VJD, Post JA. A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. *Cytotechnology.* 2013; 65(1): 1–14. DOI: 10.1007/s10616-012-9459-9.
26. Biggs MJP, Fernandez M, Thomas D, Cooper R, Palma M, Liao J, et al. The Functional Response of Mesenchymal Stem Cells to Electron-Beam Patterned Elastomeric Surfaces Presenting Micrometer to Nanoscale Heterogeneous Rigidity. *Adv Mater.* 2017; 29(39). DOI: 10.1002/adma.201702119.

Информация об авторах:

Мишанин Александр Игоревич, младший научный сотрудник, Группа геномно-клеточной инженерии, Институт молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ;

Панина Алиса Николаевна, аспирант, Институт молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ;

Большасов Евгений Николаевич, к.т.н., научный сотрудник, Томский политехнический университет;

Твердохлебов Сергей Иванович, к. ф.-м. н., доцент, руководитель лаборатории, Томский политехнический университет;

Головкин Алексей Сергеевич, д.м.н., руководитель группы геномно-клеточной инженерии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава РФ.

Author information:

Mishanin Alexander I., researcher, Institute of molecular biology and genetics, Almazov National medical research centre;

Panina Alice N., PhD student, Institute of molecular biology and genetics, Almazov National medical research centre;

Bolbasov Evgeny N., PhD, researcher, Tomsk polytechnic university;

Tverdokhlebov Sergey I., PhD, assistant professor, Tomsk polytechnic university.

Golovkin Alexey S., DrSci, MD, group leader, Almazov National medical research centre.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ СЕРДЦА У АСИСТОЛИЧЕСКИХ ДОНОРОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Полещенко Я. И.¹, Процак Е. С.¹, Дружининский Д. А.²,
Галагудза М. М.^{1,2}, Минасян С. М.^{1,2}, Борщев Ю. Ю.¹,
Курилов А. Б.³, Сонин Д. Л.^{1,2}.

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

³ Государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И. И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Процак Егор Сергеевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: egor-protsak@yandex.ru

*Статья поступила в редакцию 19.11.2021
и принята к печати 08.12.2021.*

Резюме

В трансплантологии всегда остро стояла проблема несоответствия количества донорских органов числу реципиентов, включая донорские сердца. Возможны различные способы увеличения пула донорских органов, одним из них является использование асистолических доноров, у которых наступила необратимая остановка кровообращения. Из-за плохой переносимости миокардом ишемии в течение периода асистолии и трудностей диагностики кардиологических заболеваний, являющихся препятствием к трансплантации, требуется углубленное исследование состояния миокарда у асистолических доноров. В настоящее время общепринятый протокол работы с асистолическими донорами сердца отсутствует. Для его разработки, в том числе методов кондиционирования такого донора, и методов оценки состояния сердца на предмет пригодности к трансплантации необходимы экспериментальные, в частности поисковые и доклинические исследования. Предлагается протокол такого исследования. Моделирование асистолического донора с использованием крыс описывается на основе экспериментальных работ, проведенных коллективом авторов. В статье дано описание следующих технических аспектов: анестезиологическое пособие, критерий констатации асистолии, поддержание температуры тела крысы в соответствии с температурой тела человека при остановке сердца, хирургические аспекты выполнения основной экспериментальной модели.

В качестве основной модели, позволяющей оценить состояние миокарда мелкого лабораторного животного, выбрана модель изолированной перфузии сердца по Лангендорфу. В качестве критериев оценки состояния донорского сердца выбраны такие параметры, как внутрилевожелудочковое давление, объем коронарного кровотока, частота сердечных сокращений и наличие постреперфузионных аритмий. Оценка объема повреждения донорского сердца проводится с помощью окраски срезов донорского органа трифенилтетразолием хлоридом.

Ключевые слова: асистолическое донорство, сердце, экспериментальные исследования органной донации.

Для цитирования: Поляченко Я.И., Протсак Е.С., Дружининский Д.А. и др. Методика исследования состояния сердца у асистолических доноров в эксперименте на мелких лабораторных животных. *Трансляционная медицина.* 2021;8(5):50-56. DOI 10.18705/2311-4495-2021-8-5-50-56

METHODOLOGY OF ASYSTOLIC DONOR HEART'S CONDITION STUDY IN AN EXPERIMENT USING SMALL LABORATORY ANIMALS

Poleschenko Ya. I.¹, Protsak E. S.¹, Druzhininsky D. A.², Galagoudza M. M.^{1,2}, Minasian S. M.^{1,2}, Borshchev Yu. Yu.¹, Kurilov A. B.³, Sonin D. L.^{1,2}

Corresponding author:

Protsak Egor S.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: egor-protsak@yandex.ru

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

² Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

³ Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery, Saint Petersburg, Russia

Received 19 November 2021; accepted 08 December 2021.

Abstract

In transplantation, there has always been an acute problem of the discrepancy between the number of donor organs and the number of recipients, including donor hearts. There are various ways to increase the pool of donor organs, one of them is the use of asystolic or non-heart-beating donors. Due to poor myocardial tolerance of ischemia during the asystole period, as well as because of the difficulties in diagnosing cardiac diseases of the asystolic donor, which can be contraindication to transplantation. Therefore, an in-depth study of the state of the myocardium in asystolic donors is required. Currently, there is no generally accepted protocol for working with asystolic heart donors. This protocol should include methods of heart conditioning and assessing of myocardium state. For its development we need more experimental and preclinical studies. A protocol for such a study is proposed. The modeling of an asystolic donor using rats is described on the basis of experimental work carried out by a team of authors. The article describes the following technical aspects: anesthetic guidance, asystole detection criterion, maintaining the rat body temperature in accordance with the human body temperature during cardiac arrest, surgical aspects of performing the main experimental model.

The Langendorff model of isolated cardiac perfusion was chosen as the main model for assessing the state of the myocardium of a small laboratory animal. Intra-left ventricular pressure, volume of coronary blood flow, heart rate and the presence of post-reperfusion arrhythmias were selected as criteria for assessing the state of donor hearts. Assessment of the volume of damage to the donor heart is carried out using triphenyltetrazolium chloride staining of the donor organ.

Key words: asystolic donation, experimental studies of organ donation, heart.

For citation: Poleschenko YaI, Protsak ES, Druzhininsky DA, et al. Methodology of asystolic donor heart's condition study in an experiment using small laboratory animals. *Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine.* 2021;8(5):50-56. (In Russ.) DOI 10.18705/2311-4495-2021-8-5-50-56

Введение

В настоящее время органы доноры с необратимой остановкой кровообращения (далее асистолические доноры) крайне редко используются для донации сердца. Немногочисленные успешные результаты такой процедуры относятся исключительно к донорам 3 категории по Маастрихтской классификации [1], то есть к донорам с запланированной остановкой кровообращения [2, 3]. Трансплантация сердца от асистолических доноров других категорий (включая доноров с внегоспитальной смертью) крайне затруднительна из-за многих препятствий. К ним, в частности, относится тяжелое ишемическое повреждение миокарда во время тепловой ишемии непосредственно в теле донора после наступления асистолии, отсутствие общепризнанного и утвержденного протокола работы с такими донорами, диагностика состояния сердца для определения его пригодности к пересадке. Для разрешения этих проблем необходимы масштабные исследования. Анализ возможности использования донорского сердца от асистолических доноров на основе крайне скудного клинического опыта представляется затруднительным. Зачастую в клинических исследованиях трудно оценить время ишемии сердца, что является критически важным для подобных исследований. Так, в части работ указано, что декларация смерти пациента требует от 2 до 20 мин., что не дает возможности оценить пределы нахождения сердца в состоянии ишемии. Кроме того, в данных работах возникает вопрос оценки времени общей ишемии вследствие отсутствия стандартизации начала отсчета периода ишемии. Так, в Австралии моментом отсчета времени ишемии считается момент отключения пациента от аппарата искусственной вентиляции легких, а в Великобритании началом ишемии считают снижение систолического давления ниже 50 мм рт. ст., хотя некоторые экспериментальные исследования показывают, что сердце подвергается ишемическому повреждению при систолическом давлении на уровне 50 мм рт. ст., что предполагает необходимость пересмотра подобного критерия [4, 5, 6]. Таким образом, отсутствие возможности однозначно оценить имеющиеся литературные данные приводит к необходимости проведения стандартизированных экспериментов для дальнейшей работы в данном направлении.

Экспериментальные исследования, посвященные данной тематике, стали проводиться в последние 5-10 лет. Большинство из них осуществляется с использованием крупных животных, из-за чего могут возникать сложности этического и материального характера. Обзор всех применяемых мето-

дик не входит в задачи данной статьи, посвященной использованию лабораторных грызунов. Их особенностью является невозможность выполнить на завершающем этапе эксперимента ортотопическую трансплантацию сердца с последующей оценкой его морфофункционального состояния методами, аналогичными используемым в клинике у человека.

Цель

Описать разработанную нами оригинальную методику исследования состояния сердца у асистолических доноров в эксперименте на мелких лабораторных животных, в том числе для исследования потенциальных методов кардиопротекции применительно к таким сердцам и оценки их эффективности.

Анестезия

Животное наркотизируется до стадии хирургического наркоза с применением рекомендованных для мелких лабораторных животных препаратов. Выбор конкретного анестетика остается за авторами исследования. Мы предлагаем использовать ингаляционный наркоз изофлюраном, осуществляемый при нахождении животного в индукционной камере, в которую подается атмосферный воздух с содержанием паров изофлюрана 5 %. Животное не получает премедикации и во время наркотизации дышит спонтанно. Такая анестезия сама по себе безболезненна для животного, нет необходимости выполнять инъекции препаратов. После наступления хирургической стадии наркоза животное изымается из камеры и подвергается цервикальной дислокации, о чем будет сказано ниже. Несмотря на то что данная манипуляция, согласно международным рекомендациям и руководствам, допустима и без анестезии у мелких животных массой до 200 г [7], мы настоятельно рекомендуем осуществлять введение животного в наркоз с целью недопущения его страданий, а также для снятия ограничений по массе тела животного. Известным кардиопротективным действием изофлюрана в данном случае можно пренебречь, учитывая крайне незначительное время экспозиции животного в наркозной камере, а также рутинность его применения во всех экспериментальных группах.

Моделирование необратимой остановки кровообращения (асистолии)

Вопрос об оптимальном способе моделирования необратимой остановки кровообращения у животного дискутабелен. При проведении исследований на крупных животных для этого зачастую используется и рекомендуется прекращение

искусственной вентиляции легких у предварительно интубированного животного, находящегося под действием миорелаксантов. Авторы обычно не описывают причины избрания именно такого метода, но при анализе сложившейся ситуации с асистолическими органами донорами в западных странах выбор способа моделирования необратимой остановки кровообращения становится понятным. В настоящее время в клинике имеется скудный опыт пересадки сердца от доноров 3 категории, у которых остановка кровообращения возникает вследствие прекращения интенсивной терапии, в том числе искусственной вентиляции легких. Это и объясняет соответствующий выбор в эксперименте. Поскольку работа с донорами 3 категории авторами не рассматривается из-за способа возникновения таких доноров, данный способ необратимой остановки кровообращения у животного мы также не рекомендуем. Понимая, что наиболее подходящими для донорства сердца после остановки кровообращения являются доноры 4 категории, у которых повреждение головного мозга является первичным, и прекращение сердечной деятельности в ходе их кондиционирования является, в конечном итоге, также следствием первичного повреждения мозга, мы решили и в эксперименте осуществить то же. Цервикальная дислокация в этом плане является просто выполнимой и разрешенной к применению, а для исключения возможных страданий животного осуществлять ее рекомендуется в условиях анестезии.

Констатация смерти животного вследствие необратимой остановки кровообращения

Формально непосредственно после осуществления цервикальной дислокации электрическая и сократительная активность сердца продолжают еще некоторое время. Согласно нашим наблюдениям, этот период продолжается не более минуты. Сердечный выброс при этом постепенно снижается до нуля, но это происходит не мгновенно. Артериальное давление, измеряемое при этом инвазивным способом (катетеризация общей сонной артерии), снижается до величины 1015 мм рт. ст. приблизительно за 30-40 секунд. Частота сердечных сокращений также постепенно уменьшается до нуля, причем за счет электромеханической диссоциации прекращение электрической и механической активности миокарда иногда происходит неодновременно. К настоящему времени не существует общепринятых пограничных значений показателей центральной гемодинамики (прежде всего среднего артериального давления и сердечного выброса), достижение которых позволяло бы одно-

значно констатировать факт остановки кровообращения. Так, некоторые исследователи рекомендуют считать моментом остановки кровообращения среднее артериальное давление 50 мм рт. ст., другие 25 мм рт. ст. При этом такие параметры, как величина сердечного выброса, сатурации артериальной крови, нарушения газового состава крови и кислотно-щелочного равновесия, концентрация лактата, не учитываются. Однако учет этих показателей в данной ситуации и невозможен с практической точки зрения, принимая во внимание скоротечность их изменения до уровня, при котором организм становится нежизнеспособным. Внешнее дыхание при этом отсутствует. Это, пожалуй, единственный объективный параметр, который прекращается в строго определенную временную точку. Мы предлагаем использовать именно его как момент начала отсчета времени гибели животного, понимая, что циркуляция крови после него продолжается некоторое непродолжительное время, но при этом не только из-за остановки внешнего дыхания сразу же наступают необратимые изменения метаболизма, приводящие к биологической смерти.

Предупреждение спонтанного охлаждения тела животного в предэксплантационном периоде

За счет естественного остывания трупа снижается температура его тканей, что оказывает выраженный антиишемический эффект. Скорость остывания тела мелких животных за счет более высокого отношения поверхности тела к массе выше, чем у крупных животных и у человека, благодаря чему их ткани могут оказаться более сохранными спустя определенный период времени с момента смерти, чем у человека, несмотря на исходно более высокие значения температуры и основного обмена. Известно, что тело умершего человека при комнатной температуре (22 °С) остывает со скоростью примерно 0,51,0 °С в час. Для того чтобы скорость остывания тела крысы оказалась сопоставимой, его приходится сразу же после смерти помещать в воздушную термостатируемую камеру. Были проведены тестовые эксперименты, по результатам которых было установлено, что температура ядра тела крысы, измеренная в прямой кишке, снижается на 0,50,7 °С в случае помещения тела крысы в воздушную термостатируемую камеру с температурой воздуха, поддерживаемой на уровне $37,5 \pm 0,5$ °С. При этом скорость остывания тела крысы ускорялась в 2,53,0 раза при снижении температуры воздуха в камере до $33,5 \pm 0,5$ °С. Мы не рекомендуем рутинно измерять ректальную или

пищеводную температуру тела крысы в таких экспериментах, однако периодическая «калибровка» и проверка работоспособности тепловой камеры необходима. Также важен ее небольшой объем, сопоставимый с размерами тела животного. Еще раз подчеркиваем, что даже незначительные технические погрешности при термостатировании тела мертвого животного при его небольших размерах могут существенно повлиять на скорость его остывания и кардинально изменить получаемые в эксперименте результаты [6].

Диапазон времени от момента индукции асистолии до эксплантации сердца

Выбор временного интервала, в течение которого животное будет находиться в состоянии биологической смерти, зависит от дизайна конкретного исследования и выбирается экспериментатором. Очевидно, что этот период должен иметь разумную продолжительность. Слишком длительная его продолжительность приведет к необратимым изменениям в миокарде, после чего дальнейшие этапы эксперимента будут бессмысленными. Собственно, исследование продолжительности данного временного интервала является самостоятельным исследованием, позволяющим ответить на важный вопрос — по прошествии какого времени с момента прекращения кровообращения сердце еще можно рассматривать как пригодное к пересадке. Собственные данные [8] показывают, что относительно безопасный период (конкретно для сердца крысы) продолжается не более 10 мин., далее состояние миокарда начинает ухудшаться, а по прошествии 15 мин. динамика ухудшения еще более возрастает. Однако мы не исследовали никаких кардиопротективных воздействий применительно к этой ситуации, в их присутствии указанные временные интервалы могут изменяться. Кроме того, этот безопасный период может различаться в зависимости от исходного состояния животного (возраст, пол, наличие хронических заболеваний).

Еще раз повторимся, что выбор оптимальной продолжительности асистолии — это лишь в небольшой степени методический аспект. В большей мере — это исследуемый показатель.

Эксплантация сердца и его экстракорпоральная перфузия на аппарате Лангендорфа

Методика перфузии сердца по Лангендорфу хорошо зарекомендовала себя для исследования ишемически-реперфузионного повреждения сердца мелких животных, поэтому и была внедрена для данной задачи [9].

Процесс эксплантации сердца и его подключение к аппарату Лангендорфа принципиально не отличаются от таковых при проведении стандартной ретроградной перфузии сердца через аорту. Правда, в данном случае от оператора требуется еще более четко соблюдать временной регламент и действовать с максимальной скоростью.

Вопрос о необходимости и допустимости введения гепарина животному перед проведением цервикальной дислокации должен решаться индивидуально. Проблема свертывания крови в коронарных сосудах сердца и его полостях при извлечении сердца из живой наркотизированной крысы обычно отсутствует, и превентивная гепаринизация животного не является рутинным мероприятием перед изъятием сердца. В то же время посмертное свертывание крови после наступления асистолии не является редкостью и может дополнительно ухудшить состояния сердца в периоде реперфузии. Однако, интерполируя дизайн эксперимента на клиническую ситуацию, необходимо подразумевать допустимость или недопустимость введения гепарина при еще сохраненном кровообращении. Очевидно, что гепаринизация допустима только в случае донора 4 категории, когда донор уже признан умершим, и категорически неприемлема при работе с остальными категориями асистолических доноров.

Особенности перфузии сердец от асистолических животных-доноров по Лангендорфу

Во время перфузии на аппарате Лангендорфа таких сердец возникает непреодолимая сложность в случае введения в полость левого желудочка баллона для создания адекватной пред- и постнагрузки, и также для мониторинга в течение всего времени перфузии внутрилевожелудочкового давления, с помощью значений которого оценивается сократительная функция сердца. Рутинная и хорошо отработанная процедура регистрации давления в изоволюмическом режиме применима при перфузии исходно интактного сердца без диастолической дисфункции. В случае сердца, полученного от асистолического донора, диастолическая дисфункция очень вероятна, и объективно оценить ее во время начала перфузии невозможно. Следовательно, должный объем жидкости для нагнетания в баллон, находящийся в полости левого желудочка, неизвестен. Пренебрегая абсолютными значениями систолического и диастолического давления в его полости, можно лишь оценить максимально развиваемое левым желудочком пульсовое давление. При этом следует понимать,

что неадекватно раздутый баллон может перерастянуть миокард желудочка, причиняя ему тем самым дополнительное повреждение и способствуя усилению феномена невосстановления кровотока в период реперфузии. Это, в свою очередь, может приводить к увеличению объема необратимого повреждения миокарда, внося дополнительный источник погрешности в результат эксперимента.

Возможные оценочные критерии состояния сердца

Во время перфузии сердца по Лангендорфу возможна оценка его функциональных и морфологических показателей. Среди функциональных внутрилевожелудочковое давление (его регистрация возможна только в случае установки баллона, которая имеет описанные выше особенности), величина коронарной перфузии (далее коронарный кровоток), частота сердечных сокращений. Последний показатель также требует либо баллона, либо регистрации электрограммы изолированного сердца. Ценность данного параметра для изолированного сердца, вероятно, самая последняя по значимости, хотя тоже подлежит анализу. Коронарный кровоток показывает выраженность феномена невосстановления кровотока, который может быть обусловлен эндотелиальной дисфункцией, диастолической дисфункцией, а также, в случае перфузии сердца от асистолического донора, тромбозом микрососудов либо коронарных артерий более крупного калибра.

Чтобы установка баллона в полость левого желудочка не влияла на морфологию миокарда после реперфузии и чтобы экспериментатор не лишался такого важного показателя, как внутрилевожелудочковое давление, мы рекомендуем опытные группы делить на 2 подгруппы: половина сердец перфузируется без баллона, при этом осуществляется измерение коронарного кровотока, а затем выполняются морфологические исследования миокарда, а другая половина сердец из экспериментальной группы перфузируется с установленным баллоном для регистрации максимально возможного пульсового давления, но последующий морфологический анализ сердца не осуществляется.

Среди множества морфологических оценочных критериев состояния сердца по окончании перфузии экспериментатор имеет возможность выбора последних в зависимости от цели исследования. Наиболее часто используемый вариант — это гистохимическое окрашивание миокарда трифенилтетразолием хлоридом с целью количественной оценки объема необратимого повреждения миокарда (абсолютный эквивалент некроза). Однако

этот вариант не является единственно возможным.

С применением описанной методики уже получены некоторые экспериментальные данные, и исследования в этом направлении продолжают. Предварительные данные демонстрируют в том числе пригодность и адекватность заявленной методики для данных целей [8].

Варианты оценки морфофункционального состояния сердца от асистолического донора в эксперименте *in vivo*

В настоящее время описанный протокол уже опробован авторами с получением предварительных результатов [8]. Однако он не является единственно возможным. Предстоит разрабатывать, тестировать и внедрять и другие подходы для работы с асистолическими донорами сердца в эксперименте на мелких лабораторных животных. В частности, представляется перспективным внедрить методику гетеротопической трансплантации таких сердец с разработкой оптимального режима и способа введения кардиоконсервирующего раствора. Также требуется совершенствовать и расширять оценочные критерии, включая диагностику состояния сосудистого, в том числе микроциркуляторного русла миокарда, отдаленные изменения сердца в результате ремоделирования (в хроническом опыте с применением гетеротопической трансплантации), а также определение места молекулярных и клеточных диагностических технологий применительно к данной категории сердец.

Заключение

Использование в клинической практике донорских сердец, полученных от доноров с необратимой остановкой кровообращения, может способствовать увеличению количества доступных для трансплантации сердец. Вероятно, это увеличение будет небольшим, однако в условиях имеющегося острого дефицита донорских сердец даже очень скромное увеличение их количества (на 12 %) может обеспечить значимый результат. Для более широкого внедрения методики трансплантации сердца, полученного от асистолического донора, требуется четкое понимание предельных сроков нормотермической остановки кровообращения, после которых целесообразно обсуждать вопрос о трансплантации, а также разработка способов прекращения прогрессирования ишемического повреждения сердца в теле донора, экспресс-методов оценки пригодности сердца к трансплантации и, возможно, способов рекондиционирования сердца. Решение этих задач требует экспериментальных исследований, в том числе на мелких лабораторных

животных. Описанная методика позволяет приблизиться к решению данной комплексной проблемы.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Благодарности / Acknowledgments

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований, проект №20-015-00552 А «Исследование механизмов влияния гипотермического кондиционирования на состояние миокарда и микроциркуляторного русла донорского сердца, полученного от асистолического донора». / The study is supported by the grant of the Russian Scientific Foundation No 20-015-00552 А «Investigation of the mechanisms of the influence of hypothermic conditioning on the state of the myocardium and the microcirculation of the donor heart, obtained from an asystolic donor».

Список литературы / References

1. Thuong M, Ruiz A, Evrard P, et al. New classification of donation after circulatory death donors definitions and terminology. *Transpl Int.* 2016; 29(7): 749759. DOI: 10.1111/tri.12776.
2. Page A, Messer S, Large SR. Heart transplantation from donation after circulatory determined death. *Ann Cardiothorac Surg.* 2018 Jan; 7(1): 7581. DOI: 10.21037/acs.2018.01.08.
3. Smith M, Dominguez-Gil B, Greer DM, Manara AR, Souter MJ. Organ donation after circulatory death: current status and future potential. *Intensive Care Med.* 2019; 45(3): 310321. DOI: 10.1007/s00134-019-05533-0.
4. Brant SM, Cobert ML, West LM, Shelton JM, Jessen ME, Peltz M. Characterizing cardiac donation after circulatory death: implications for perfusion preservation. *Ann Thorac Surg.* 2014; 98(6): 21072113; discussion 21132114. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2014.05.091.
5. Boucek MM, Mashburn C, Dunn SM, Frizell R, Edwards L, Pietra B, Campbell D; Denver Children's Pediatric Heart Transplant Team. Pediatric heart transplantation after declaration of cardiocirculatory death. *N Engl J Med.* 2008; 359(7): 709714. DOI: 10.1056/NEJMoa0800660.
6. Longnus SL, Mathys V, Dornbierer M, et al. Heart transplantation with donation after circulatory determination of death. *Nat Rev Cardiol.* 2014; 11(6): 354363. DOI: 10.1038/nrcardio.2014.45.
7. American Veterinary Medical Association. 2020. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals, 2020 edition.
8. Protsak ES, Galagoudza MM, Borshchev YuYu, et al. Evaluation of the suitability of a donor heart for transplantation after various asystole periods in experiment. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2020; 19(4): 7075. In Russian [Процак Е.С., Галагудза М.М., Борщев Ю.Ю., и соавт. Оценка пригодности донорского сердца для трансплантации после различных периодов асистолии в эксперименте. *Регионарное*

кровообращение и микроциркуляция. 2020; 19(4): 7075]. doi.org/10.24884/1682-6655-2020-19-4-70-75.

9. Galagudza MM, Protsak ES, Borschev YuYu, et al. Pathophysiological aspects of heart donation from asystolic donors. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2020; 19(4): 411. In Russian [Галагудза М.М., Процак Е.С., Борщев Ю.Ю., и соавт. Патофизиологические аспекты донорства сердца от асистолических доноров. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* 2020; 19(4): 411]. doi.org/10.24884/1682-6655-2020-19-4-4-11.

Информация об авторах:

Полещенко Яна Игоревна, младший научный сотрудник, ординатор, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Процак Егор Сергеевич, лаборант-исследователь, ординатор, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Дружининский Дмитрий Александрович, студент, ФГБОУ ВО «СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России;

Галагудза Михаил Михайлович, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор Института экспериментальной медицины, главный научный сотрудник НИО микроциркуляции и метаболизма миокарда, заведующий кафедрой патологии Института медицинского образования, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Минасян Саркис Минасович, к.м.н., старший научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Борщев Юрий Юрьевич, к.б.н., заведующий НИО токсикологии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Курилов Александр Борисович, к.м.н., научный сотрудник, ГБУ «СПб НИИ скорой помощи им. И. И. Джanelidze»;

Сонин Дмитрий Леонидович, к.м.н., заведующий НИО микроциркуляции и метаболизма миокарда, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Poleschenko Yana I., junior researcher, Almazov National Medical Research Centre;

Protsak Egor S., laboratory assistant, Almazov National Medical Research Centre;

Druzhininsky Dmitry A., student, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Galagoudza Mikhail M., MD, DrSci., prof., director of Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Minasian Sarkis M., PhD, senior researcher, Almazov National Medical Research Centre;

Borshchev Yuri Yu., PhD, Head of toxicology laboratory, Almazov National Medical Research Centre;

Kurilov Alexander B., PhD, researcher, St. Petersburg I. I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine;

Sonin Dmitry L., PhD, Head of the Microcirculation and myocardium metabolism laboratory, Almazov National Medical Research Centre.

СРАВНЕНИЕ АКТИВАЦИОННЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ГЕМОСОРБЕНТОВ ПО СКОРОСТИ АДГЕЗИИ КЛЕТОК КРОВИ IN VITRO

Кузнецов С. И.¹, Киричук О. П.², Буркова Н. В.¹, Юрьев Г. О.³,
Даванков В. А.⁴, Постнов В. Н.^{1,3}, Романчук Е. В.⁵,
Свиридов Э. Е.¹, Киселева А. Д.¹

Контактная информация:

Буркова Наталья Владимировна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Долгоозерная, д. 43, Санкт-Петербург,
Россия, 197375.
E-mail: n.burk@list.ru

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

² Университет Гренобль-Альпы, Гренобль, Франция

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

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт элементоорганических соединений имени
А. Н. Несмеянова» Российской академии наук, Санкт-Петербург,
Россия

⁵ Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург,
Россия

*Статья поступила в редакцию 27 июля
2021 и принята к печати 22 ноября 2021.*

Резюме

Актуальность работы заключается в поиске новых гемоконтактных препаратов, обладающих гемосовместимостью и выраженным активационным воздействием на клеточные и гуморальные системы крови для возможного их использования в клинической практике при проведении малообъемной гемоперфузии. **Целью** работы являлась оценка активационных возможностей трех гранулированных гемосорбентов по скорости адгезии клеточных элементов крови к поверхности гранул in vitro. **Материалы и методы.** При использовании в клинике метода малообъемной гемоперфузии (МОГ) важно учитывать активационные свойства твердофазных гранулированных препаратов. Гемоконтактное взаимодействие проводили в стендовых условиях с использованием донорской крови в ротационном режиме. Пробы крови брали до начала эксперимента и через 5, 20, 40 и 60 мин. Оценивали изменения в клеточных и субклеточных популяциях крови с помощью гематологического анализатора SySmex XT 1800i (26 параметров), что давало возможность косвенно судить об активации клеток крови. Проведено 30 экспериментов. Для анализа активационных функций гемоконтактных препаратов использовали скоростно-временной адгезивный профиль клеток крови на сорбенте. **Результаты.** Эффект использования препаратов Силохром С-120 и СПС по сравнению с СКТ-6А ВЧ в качестве контактных гемоактиваторов может быть более выраженным, поскольку активационный потенциал этих сорбентов для клеток крови намного выше. Силохром S-120 имеет самые высокие возможности активации по сравнению с SPS и SCT-6A HP. **Заключение.** Показатели скорости адгезии могут быть индикаторами активации клеток крови при контакте с чуже-

родными поверхностями и служить критерием оценки активационных возможностей этих поверхностей при использовании метода МОГ в клинике.

Ключевые слова: адгезия, клеточные популяции крови, контактная активация клеток крови, лейкоциты, малообъемная гемоперфузия, тромбоциты.

Для цитирования: Кузнецов С.И., Киричук О.П., Буркова Н.В. и др. Сравнение активационных возможностей гемосорбентов по скорости адгезии клеток крови *in vitro*. Трансляционная медицина. 2021;8(5):57-66. DOI: 10.18705/2311-4495-2021-8-5-57-66



COMPARISON OF THE ACTIVATION CAPABILITIES OF HEMOSORBENTS BY ADHESION RATE OF BLOOD CELLS IN VITRO

Kuznetsov S. I.¹, Kirichuk O. P.², Burkova N. V.¹, Yuriev G. O.³, Davankov V. A.^{1,3}, Postnov V. N.^{1,3}, Romanchuk E. V.⁵, Sviridov E. E.¹, Kiseleva A. D.¹

Corresponding author:

Burkova Natalya V.,
Almazov National Medical Research Centre,
Dolgoozernaya str. 2, Saint Petersburg,
Russia, 197375.
E-mail: n.burk@list.ru

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² University of Grenoble Alpes, Grenoble, France

³ Institute of Chemistry of Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia

⁴ A.N.Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

⁵ Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

Received 27 July 2021; accepted
22 November 2021.



Abstract

Background: The relevance of the work lies in the search for new hemocontact drugs with hemocompatibility and a pronounced activation effect on the cellular and humoral blood systems for their possible use in clinical practice during low-volume hemoperfusion. **The aim** of this work was to assess the activation capabilities of three granular hemosorbents by the rate of adhesion of blood cellular elements to the surface of granules *in vitro*. **Materials and methods.** When using the method of low-volume hemoperfusion (LVH) in the clinic it is important to take into account the activation properties of solid-phase granular drugs. Blood-contact interaction was carried out in bench conditions with the use of donated blood in rotary mode. Blood samples were taken before the experiment and after 5, 20, 40 and 60 minutes. Changes in blood cell and subcellular populations were evaluated using the Sysmex XT 1800i hematological analyzer (26 parameters), which made it possible to indirectly judge the activation of blood cells. 30 experiments were conducted. To analyze the activation functions of the hemocontact preparations the speed-time adhesive profile of blood cells on the sorbent was used. **Results.** The effect of using the preparations Silochrome S-120 and SPS in comparison with SCT-6A HP as contact hemoactivators can be more pronounced, since the activation potential of these sorbents for blood cells is much higher. Silochrome S-120 has the highest activation capabilities compared to SPS and SKT-6A HP. **Conclusion.** Adhesion rate indicators can be indicators of the activation of blood cells upon contact with foreign surfaces and serve as a criterion for assessing the activation capabilities of these surfaces when using the LVH method in the clinic.

Key words: adhesion, blood cell populations, contact activation of blood, hemosorbent, leukocyte, low-volume hemoperfusion, platelets.

For citation: Kuznetsov SI, Kirichuk OP, Burkova NV, et al. Comparison of the activation capabilities of hemosorbents by adhesion rate of blood cells in vitro. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2021;8(5):57-66. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2021-8-5-57-66

Список сокращений

МОГ — малообъемная гемоперфузия; СВАП — скоростно-временной адгезивный профиль; СКТ-6А ВЧ — медицинский углеродный адсорбент высокой чистоты; СПС — сверхсшитый полистирол марки «Стиросорб 516»;

Силохром С-120 — сорбент на основе кремнезема; ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота.

Введение

В настоящее время продолжается поиск новых гемоконтактных препаратов, обладающих не только гемосовместимостью, но и выраженным активационным воздействием на клеточные и гуморальные системы крови для возможного их использования в клинической практике при проведении МОГ [1]. Особое внимание уделяется изучению процессов клеточной адгезии.

Адгезия лейкоцитов — один из показателей активации клеток. Ведущие адгезивные структуры для лейкоцитов представлены в преобладающем количестве молекулами суперсемейства интегринов — FLA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), p150,95 (CD11c/CD18), а также рядом β -интегринов, обеспечивающих адгезию к белковым структурам матрикса: к витронектину (α v β 3-интегрин, CD51/CD61), к коллагену (α 2 β 1-интегрин, CD49b/CD29), к ламинину (α 6 β 1-интегрин, CD49f/CD29) и др. [2]. Этапом миграции нейтрофилов в очаг воспаления является их прикрепление к эндотелию сосудов с помощью молекул адгезии L-селектина, экспрессирующегося на самих нейтрофилах, и эндотелиальных P- и E-селектинов. Кроме того, в процессе миграции доказана роль основных рецепторов адгезии нейтрофилов: ICAM-1, α Mb2-интегрин, Mac-1 и LFA-1 (CD11), а также лигандов к P-селектину — PSGL-1 и E-селектину — ESL-1 [3]. Интегрины контролируют взаимодействие клеток с их микроокружением, регулируя адгезию клетка-клетка и клетка-матрикс. К классу интегринов относятся молекулы LFA-1, лигандами для которых являются ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 [4].

Рецепторы тромбоцитов многообразны не только по лигандам, но и по химическому составу

и включают: многочисленные интегрины (α IIb β 3, α 2b1, α 5 β 1, α 6 β 1, α V β 3); рецепторы, богатые лейцином (LRR); гликопротеины (GP1b-V-IX, Toll-подобные рецепторы); рецепторы, ассоциированные с белком G (рецепторы PAR-1 и PAR-4 к тромбину, рецепторы P2Y1 и P2Y12 к АДФ, рецепторы TP α и ск TXA2; рецепторы из семейства иммуноглобулинов (GPVI, Fc γ RIIA)); C-тип лектиновый рецептор (P-селектин); тирозинкиназные рецепторы; смешанные типы рецепторов (CD63, CD36, лиганд 1P-селектина, рецепторы фактора некроза опухоли — ФНО- α и пр.). В ходе активации тромбоцита происходит выбрасывание содержимого их гранул, после чего процесс активации становится необратимым [5, 6]. Тромбоциты способны непрерывно синтезировать белки, секретирующиеся из α -гранул, — фибриноген, тромбоспондин, фактор Виллебранда, важные компоненты системы гемостаза — тканевый фактор и ингибитор активатора плазминогена типа 1, интерлейкин IL-1 β , циклооксигеназа 1. Причем структура синтеза белка изменяется в ответ на клеточную активацию [7]. Активированные тромбоциты в кровотоке связываются с лейкоцитами, образуя циркулирующие тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты за счет быстрого обратимого взаимодействия P-селектина (CD62P) на поверхности тромбоцита с лигандом 1 гликопротеина P-селектина (PSGL-1) на плазмолемме лейкоцитов. Это начальное связывание усиливается взаимодействием различных других рецепторов, в зависимости от подтипа лейкоцитов, что приводит к взаимной активации [8].

Молекулы клеточной адгезии выполняют две основные функции: обеспечивают прилипание клеток к различным субстратам (процессы адгезии) и выполняют сигнальную функцию, т.е. передают сигнал внутрь клетки (процессы активации). Процесс взаимодействия прилипающих клеток крови с твердофазным препаратом можно представить следующим образом: в начале контакта идет интенсивная адгезия клеток крови к субстрату, затем скорость адгезии падает и наступает динамическое равновесие, после которого в гемоконтактной системе начинает преобладать процесс

перехода клеточных элементов обратно в жидкую фазу крови [9].

В данном исследовании использовали показатели адгезии клеток крови как критерий активационных возможностей поверхностей твердофазных препаратов различной физико-химической структуры, контактирующих с кровью.

Цель исследования состояла в оценке активационных возможностей трех гранулированных гемосорбентов по скорости адгезии клеточных элементов крови к поверхности гранул *in vitro*.

Материалы и методы

Эксперименты по изучению активационных свойств чужеродных поверхностей проводили в стендовых условиях. Донорскую кровь получали на станции переливания крови ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, которую забирали у здоровых волонтеров из локтевой вены в вакуумную пробирку с гепарином лития в объеме 9,0 мл.

В качестве гемоконтактных препаратов использовали:

1. СКТ-6А ВЧ — медицинский углеродный гемосорбент высокой чистоты, разрешенный к применению в клинической практике в качестве гемосорбента и в качестве гемоактиватора в процедуре малообъемной гемоперфузии [1].

2. СПС — гранулы темно-коричневого цвета размером 0,3–1,2 мм. Удельная поверхность 800–1000 м²/г, суммарный объем пор — 1,0–1,1 мл/г. Поры двух типов: транспортные — диаметром 80 нм и нанопоры — диаметром 1–3 нм. Полимер нейтрален, не содержит функциональных групп, обладает гидрофобной поверхностью, не меняет объема в средах в интервале рН 1–14 независимо от ионной силы раствора.

3. Силохром С-120 — гранулы белого цвета неправильной формы размером 0,3–0,5 мм. Удельная поверхность гранул — 130 м²/г, размер пор — 28 нм.

В колонки, изготовленные из одноразовых шприцев объемом 20 мл, помещали фильтр из нетканого материала и капроновую сетку, которые плотно фиксировали у торцевой поверхности шприца прижимным кольцом, и загружали гемоконтактные препараты, хранившиеся в 20%-ном растворе этанола, в объеме 1,8–2,0 мл. Перед началом работы из шприц-колонок удаляли раствор этанола, гемоконтактный препарат три раза промывали стерильным физиологическим раствором (1:10), а затем еще три раза физиологическим раствором с гепарином (20 ед/мл). Затем в шприц-колону забирали гепаринизированную донорскую кровь из вакуумной пробирки из расчета сорбент: кровь

(1:4), предварительно отобрав пробу крови «до контакта». Загруженные кровью шприц-колонки помещали в горизонтальном положении на роторную мешалку и включали вращение со скоростью 10 об/мин. Эксперименты проводили в течение 60 мин при комнатной температуре в постоянном ротационном режиме. Брали пробы крови каждые 5, 20, 40 и 60 мин от начала эксперимента в объеме 1,8–2,0 мл в пробирки с ЭДТА. До подсчета клеток пробы крови хранили в холодильнике. После завершения эксперимента во всех пробах регистрировали показатели крови (26 параметров) с использованием гематологического анализатора SySmex ХТ 1800i. Было выполнено 30 экспериментов (по 10 с каждым из гемоконтактных препаратов).

Во всех пробах исследовали прилипающие клетки крови — тромбоциты, лейкоциты и их субпопуляции (гранулоциты и агранулоциты), регистрировали количество фиксированных к субстрату (сорбенту) клеток по их числу, оставшихся в жидкой фазе крови. Скорость адгезии клеток за каждый временной интервал рассчитывали по формуле:

$$V = (A - B) / t,$$

где: V — скорость адгезии клеток; А — количество клеток в единице объема крови в предыдущей пробе; В — количество клеток в единице объема крови в последующей пробе; t — время между соответствующими точками проведения анализа.

Для исследования развития активационных процессов клеток в зависимости от скорости адгезии их к субстрату в разные временные интервалы контакта использовали скоростно-временной адгезивный профиль (СВАП) клеток крови на сорбенте. Исследования проводили в пробах крови «до», «5 мин», «20 мин», «40 мин» и «60 мин», но при анализе гемограмм для построения временного профиля были определены реперные точки:

1 — проба «5 мин» от начала контакта крови с сорбентом (по методике проведения МОГ в клинике время контакта крови с сорбентом СКТ-6А ВЧ составляло 3–5 мин) [1];

2 — временная точка, включающая период от начала контактного взаимодействия и до точки, в которой еще преобладает адгезия клеток к субстрату над их отлипанием и уходом в жидкую фазу крови;

3 — временная точка, завершающая период преобладания отлипания клеток крови от сорбента. Этот период длится от второй реперной точки, когда начинают превалировать процессы ухода клеток с сорбента в жидкую фазу крови, и до конца эксперимента — «60 мин».

Для получения скоростного профиля реакции прилипающих клеток крови на контактное взаи-

модействие с сорбентами рассчитывали скорости адгезии клеток в периоды между реперными точками. Для каждого гемоконтактного препарата рассчитывали и представляли графически СВАП. Скорость взаимодействия клеток с гранулами сорбента выражали в изменении количества клеток в единице объема в минуту (кл/мкл/мин). Данные величины позволяют определить, какие процессы преобладают в гемоконтактной системе в исследуемый период времени и каково количество клеток, прилипающих к субстрату или возвращающихся в жидкую фазу крови.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием прикладных пакетов Statistica 7.0 for Windows и Excel 2013. Достоверность изменения показателей внутри групп оценивали с помощью t-критерия Стьюдента для попарно связанных выборок и критерия Вилкоксона для парных сравнений, достоверность различий показателей между группами — с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок и U-критерия Манн-Уитни. Для анализа непараметрических показателей применяли метод Фишера, тест χ^2 Пирсона. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Проведен анализ СВАП различных твердофазных гемоконтактных препаратов для определения способности активировать клеточные элементы крови, что важно учитывать при проведении процедуры МОГ. СВАП для тромбоцитов крови человека при ее контакте с твердофазными препаратами СКТ-6А ВЧ, СПС марки «Стиросорб-516» и Силохром С-120 представлен на рисунке 1. Максимальную скорость адгезии для тромбоцитов наблюдали в период «5 мин» от начала контакта со всеми исследуемыми препаратами. Процесс адгезии клеток на препарате Силохром С-120 происходил в период «0–5 мин», затем процесс отлипания клеток от сорбента становился ведущим и длился до окончания эксперимента «60 мин». При контакте крови с СКТ-6А ВЧ и СПС процесс адгезии тромбоцитов продолжался до пробы «20 мин». Временные профили гемоконтактного взаимодействия препаратов СКТ-6А ВЧ и СПС сопоставимы. По сравнению с препаратом СКТ-6А ВЧ ($21,22 \pm 1,47$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин скорость адгезии тромбоцитов в пробах «5 мин» контакта наиболее высокая для Силохрома С-120 ($30,6 \pm 1,62$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин и для СПС ($27,52 \pm 1,83$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин ($p < 0,05$). Вторая реперная точка для СКТ-6А ВЧ и СПС совпадала и составляла «20 мин» контакта. Реперная точка «20 мин» для препарата Силохром

С-120 отсутствовала. Скорость адгезии тромбоцитов в период «20 мин» для сорбентов СКТ-6А ВЧ и СПС снижалась и составляла ($6,17 \pm 0,368$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин и ($7,98 \pm 0,536$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин соответственно ($p < 0,05$). Начиная с пробы «5 мин» при контакте крови с препаратом Силохром С-120 и с пробы «20 мин» на препаратах СКТ-6А ВЧ и СПС до окончания эксперимента «60 мин» преобладали процессы отлипания тромбоцитов и переход их в жидкую фазу крови. В результате показатели скорости адгезии имели отрицательные значения: для СКТ-6А ВЧ — ($-1,02 \pm 0,122$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин; для СПС — ($-0,37 \pm 0,060$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин; для Силохром С-120 — ($-2,02 \pm 0,093$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин.

Диаграмма скорости взаимодействия лейкоцитов с сорбентами СКТ-6А ВЧ, СПС марки «Стиросорб-516» и Силохром С-120 представлена на рисунке 2. Можно наблюдать совпадение временных характеристик адгезивных профилей для общей популяции лейкоцитов — «5 мин», «20 мин» и «60 мин». В период «0–5 мин» скорость адгезии лейкоцитов при контакте крови с СКТ-6А ВЧ ($310,6 \pm 43,2$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин ниже, чем с СПС ($449,0 \pm 37,9$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин ($p < 0,05$) и с препаратом Силохром С-120 ($501,0 \pm 44,41$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин ($p < 0,05$). При сравнении скорости адгезии лейкоцитов в период «20 мин» контакта отмечали различия между препаратами СКТ-6А ВЧ и СПС: СКТ-6А ВЧ — ($126,8 \pm 13,3$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин; СПС — ($179,4 \pm 11,9$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин ($p < 0,05$). При сравнении скорости адгезии лейкоцитов на препаратах СКТ-6А ВЧ и Силохром С-120 в период «20 мин» скорости адгезии лейкоцитов на обоих сорбентах практически не отличались: Силохром С-120 — ($134,0 \pm 10,50$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин. Можно отметить, что скорость адгезии лейкоцитов на СПС выше по сравнению с данными показателями на препарате Силохром С-120 ($p < 0,05$). При анализе скорости отлипания клеток в период «20–60 мин» отмечена тенденция к снижению показателей скорости адгезии на исследуемых гемосорбентах в следующем порядке: СПС ($-25,6 \pm 4,01$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин > СКТ-6А ВЧ ($-22,4 \pm 6,17$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин > Силохром С-120 ($-13,4 \pm 3,92$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин. Диаграмма, характеризующая скорости прилипания и отлипания гранулоцитов при контакте с исследуемыми препаратами, представлена на рисунке 3.

Показатели скорости адгезии гранулоцитов на сравниваемых сорбентах несколько ниже и не различались между собой в период «0–5 мин»: СКТ-6А ВЧ — ($255,3 \pm 38,87$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин; СПС — ($303,4 \pm 32,50$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин; Силохром С-120 — ($366,4 \pm 35,09$) $\times 10^3$ кл/мкл/мин ($p > 0,05$). Для исследуемого временного периода «0–20 мин»

характерны следующие показатели: СКТ-6А ВЧ — $(81,6 \pm 10,29) \times 10^3$ кл/мкл/мин; СПС — $(130,5 \pm 9,50) \times 10^3$ кл/мкл/мин ($p < 0,05$); Силохром С-120 — $(111,2 \pm 8,34) \times 10^3$ кл/мкл/мин. Отмечены различия в показателях между СКТ-6А ВЧ и Силохром С-120. В период «20–60 мин»: СКТ-6А ВЧ — $(-15,9 \pm 3,27) \times 10^3$ кл/мкл/мин; СПС — $(-28,2 \pm 3,84) \times 10^3$ кл/мкл/мин; Силохром С-120 — $(-9,9 \pm 3,36) \times 10^3$ кл/мкл/мин.

Диаграмма, характеризующая скорости прилипания и отлипания агранулоцитов при контакте с исследуемыми препаратами, представлена на рисунке 4. Показатели скорости адгезии агранулоцитов в пробах «5 мин» регистрировали при контакте с препаратом СКТ-6А ВЧ: $(130,0 \pm 16,68) \times 10^3$ кл/мкл/мин; с СПС: $(141,4 \pm 14,08) \times 10^3$ кл/мкл/мин; с Силохром С-120: $(98,6 \pm 11,05) \times 10^3$ кл/мкл/мин. В период «0–20 мин» показатели

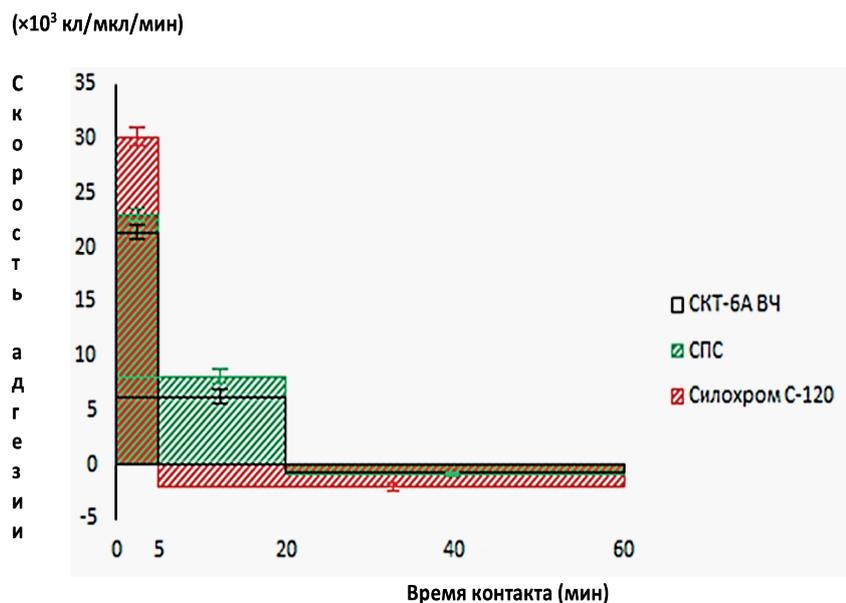


Рис. 1. Скоростно-временной адгезивный профиль для тромбоцитов при контакте крови с сорбентами СКТ-6А ВЧ, СПС и Силохром С-120

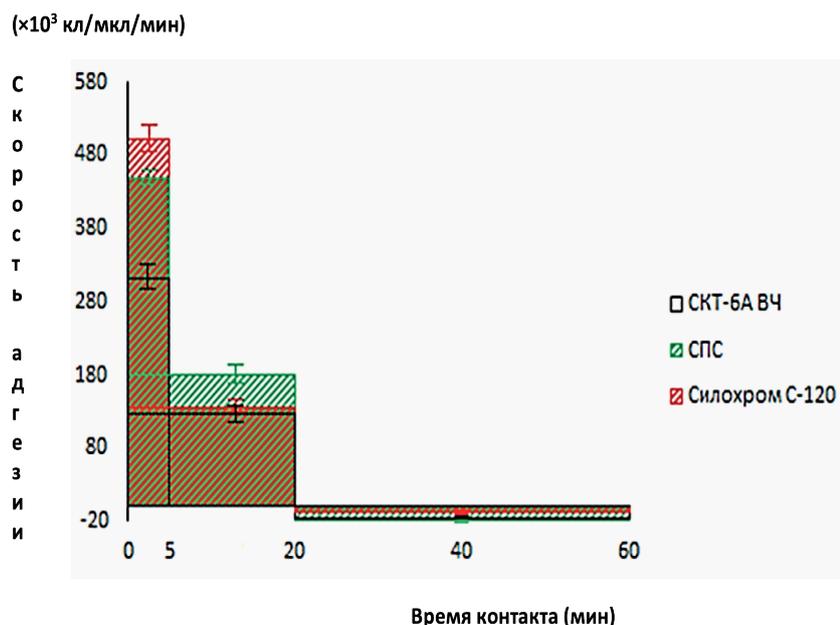


Рис. 2. Скоростно-временной адгезивный профиль для лейкоцитов при контакте крови с сорбентами СКТ-6А ВЧ, СПС и Силохром С-120

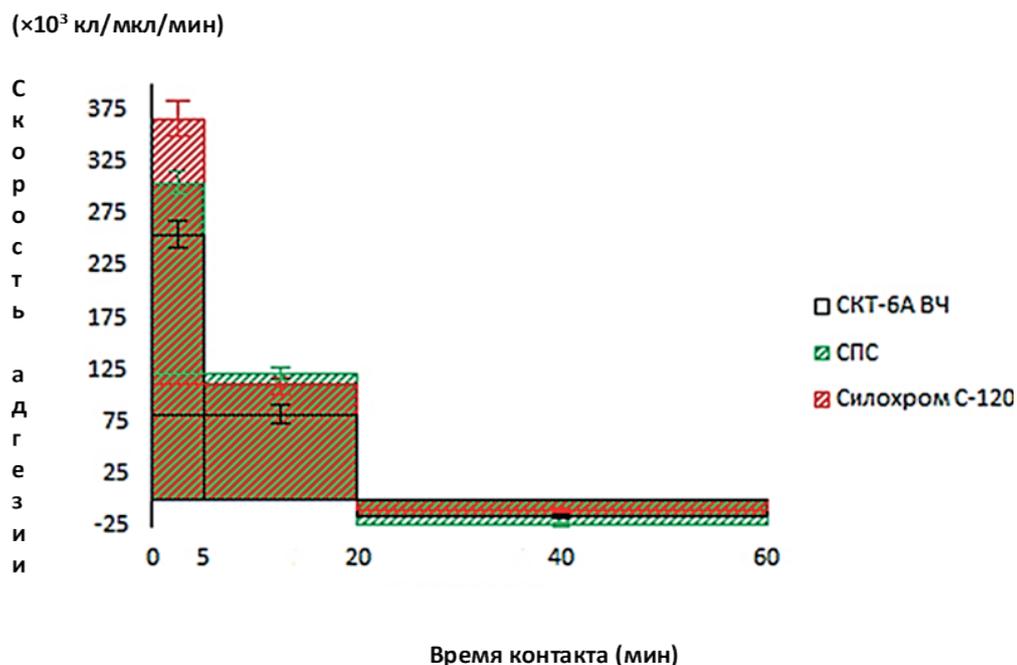


Рис. 3. Скоростно-временной адгезивный профиль для гранулоцитов при контакте крови с сорбентами SKT-6A ВЧ, СПС и Силохром С-120

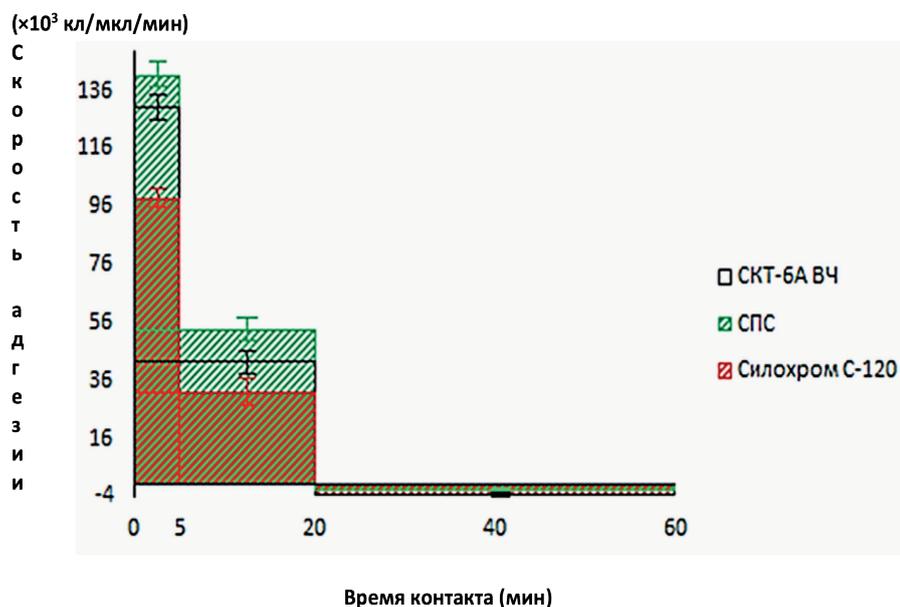


Рис. 4. Скоростно-временной адгезивный профиль для агранулоцитов при контакте крови с сорбентами SKT-6A ВЧ, СПС и Силохром С-120

скорости адгезии на исследуемых гемоконтактных препаратах составили: SKT-6A ВЧ — $(42,6 \pm 5,09) \times 10^3$ кл/мкл/мин; СПС — $(53,5 \pm 6,61) \times 10^3$ кл/мкл/мин; Силохром С-120 — $(31,7 \pm 5,69) \times 10^3$ кл/мкл/мин. Отмечены различия между показателями СПС и Силохром С-120 ($p < 0,05$).

В заключительный временной интервал контакта «20–60 мин» преобладало отлипание клеток от гранул сорбентов: SKT-6A ВЧ — $(-3,4 \pm 0,68) \times 10^3$ кл/мкл/мин; Силохром С-120 — $(-3,1 \pm 0,62) \times 10^3$ кл/мкл/мин; СПС — $(-1,5 \pm 0,36) \times 10^3$ кл/мкл/мин.

Обсуждение результатов

Таким образом, для лейкоцитов, в отличие от тромбоцитов, определен «классический» профиль их реакции на контактное взаимодействие крови с тремя исследуемыми препаратами, который характерен для углеродного сорбента СКТ-6А ВЧ. Однако скоростные характеристики этого взаимодействия крови с сорбентами в пробах «5 мин» различались, что свидетельствовало об их активационных возможностях различной степени выраженности для клеток лейкоцитарного ряда. Существенным являлось значительное снижение скорости адгезии этих клеток по сравнению с тромбоцитами, что, очевидно, связано с количеством лейкоцитов в крови, их размером и разнородностью, а также с особенностями развития и реализации адгезивных процессов в различных клетках крови.

Все лейкоциты крови условно могут быть разделены на гранулоциты (нейтрофилы, базофилы и эозинофилы) и агранулоциты (моноциты и лимфоциты). В лейкоцитарной формуле крови человека преобладают гранулоциты. Поэтому СВАП для гранулоцитов на исследованных сорбентах полностью совпал с профилем, характерным для общей популяции лейкоцитов. В развитии реакции активации отмечали сходные тенденции в те же временные точки. Сравнивая показатели активации гранулоцитов при контакте с исследуемыми сорбентами, можно отметить различия между СКТ-6А ВЧ и СПС ($p < 0,05$), а также СПС и Силохром С-120 ($p < 0,05$).

Содержание агранулоцитов в крови значительно меньше, чем гранулоцитов. Кроме того, у субпопуляций агранулоцитов адгезивный аппарат клеток выражен слабее, поэтому можно предположить, что скорости адгезии этих клеток будут меньше. Анализ показал, что временной профиль агранулоцитов совершенно одинаков для всех сорбентов и идентичен профилю общей популяции лейкоцитов, но числовые величины значительно меньше. Для агранулоцитов отмечали тенденцию к снижению скорости отлипания клеток от сорбентов в следующем ряду: СКТ-6А ВЧ > Силохром С-120 > СПС.

Таким образом, при сравнении показателей СВАП исследуемых гемоконтактных препаратов можно отметить, что временные профили сорбентов СКТ-6А ВЧ и СПС для всех популяций и субпопуляций клеток крови полностью совпадают в реперных точках «5 мин», «20 мин» и «60 мин». Показатели СВАП гемоконтактного препарата Силохром С-120 для тромбоцитов отличались от профилей двух других исследуемых

сорбентов. Реперные точки данного препарата соответствовали «5 мин» и «60 мин». На препарате Силохром С-120 адгезия клеток к сорбенту происходила очень интенсивно. Преобладание этого процесса завершилось в первые «5 мин» контакта. Можно сделать заключение, что Силохром С-120 наиболее мощный активатор тромбоцитов, затем, по степени активации, следует СПС, и меньшей активностью ($p < 0,05$) обладает СКТ-6А ВЧ. Также отмечено, что скоростные характеристики адгезии клеток крови в временных интервалах «0–5 мин» и «0–20 мин» значительно выше у препаратов СПС и Силохром С-120 по сравнению с СКТ-6А ВЧ. Это относится как к показателям контакта с тромбоцитами, так и с лейкоцитами и их субпопуляциями. Во временном интервале «20–60 мин» на всех сорбентах преобладал процесс отлипания клеток от субстрата (для Силохром С-120 начиная с «5 мин»), поэтому показатели скорости адгезии клеток в этот временной интервал имели отрицательные величины. Скорость отрицательной адгезии (отлипания клеток) в этот период времени на всех исследуемых сорбентах была незначительной, но, учитывая длительность этого процесса, можно заключить, что существенная часть прилипающих клеток возвращается обратно в жидкую фазу крови в течение всего эксперимента. Однако оценить влияние скорости отрицательной адгезии на активационную функцию гемоконтактных препаратов пока не представляется возможным.

Известно, что углеродный сорбент СКТ-6А ВЧ, используемый в качестве гемоконтактного препарата при проведении МОГ у больных с тяжелыми поражениями конечностей, дает значительный положительный эффект при включении данного метода в стандартную схему лечения [1]. Метод МОГ основан на способности гемоконтактного препарата запускать активационные процессы в гуморальных и клеточных системах крови, что приводит к изменению регуляторно-эффекторного потенциала крови путем образования огромного количества биоактивных молекул. Попадая в область поражения с током крови, они оказывают позитивный эффект на процессы саногенеза в перфузируемой области. В данном исследовании показано, что временные профили сорбентов СКТ-6А ВЧ и СПС совпадают. Причем скорости адгезии (активация клеток крови) на СПС значительно выше, чем на углеродном сорбенте СКТ-6А ВЧ, что свидетельствует о более высоком активационном потенциале. Можно полагать, что при использовании СПС в качестве гемоконтактного препарата в методе МОГ для лечения больных с тяжелыми поражениями конечностей будет получен анало-

гичный лечебный эффект. При проведении процедуры МОГ время контактного взаимодействия крови с сорбентом у больных составляло 3–5 мин, поэтому использование препарата Силохром С-120 также может быть перспективным. Активационный эффект данного сорбента максимально реализуется в первые 5 мин контакта как для тромбоцитов, так и для лейкоцитов.

Выводы

1. По развитию процесса адгезии можно судить об активации клеток крови, контактировавших с поверхностями твердофазных материалов, а также оценивать их активационные возможности.

2. Эффект применения в качестве контактных гемоактиваторов препаратов Силохром С-120 и СПС по сравнению с эталоном СКТ-6А ВЧ может быть более выраженным, так как активационный потенциал этих сорбентов для клеток крови значительно выше.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Список литературы / References

- Burkova NV, Kuznetsov SI, Tyukavin AI. Effects of small volume blood perfusion activated by hemosorbents. *Vestnik Sankt-Peterburgskoi meditsinskoi akademii postdiplomnogo obrazovaniia*. 2011; 3(4): 24–32. In Russian [Буркова Н.В., Кузнецов С.И., Тюкавин А.И. Эффекты малообъемной перфузии крови, активированной гемосорбентами. Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии постдипломного образования. 2011; 3(4): 24–32].
- Galkin AA, Demidova VS. The role of adhesion in activation of neutrophils and their cytotoxic interaction with endothelium. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2011; 131(1): 62–78. In Russian [Галкин А.А., Демидова В.С. Роль адгезии в активации нейтрофилов в цитотоксическом взаимодействии нейтрофилов с эндотелием. Успехи современной биологии. 2011; 131(1): 62–78].
- Yuan SY, Shen Q, Rigor RR, Wu MH. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvasc Res*. 2012; 83(1): 82–88. DOI: 10.1016/j.mvr.2011.06.015.
- Herter J, Zarbock A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *J Immunol*. 2013 May 1; 190(9): 4451–4457. DOI: 10.4049/jimmunol.1203179.
- Burkova NV, Kirichuk OP, Kuznetsov SI, et al. Contact of chitosan films with cellular elements of human venous blood in vitro. *Vestnik Smolenskoi gosudarstvennoi meditsinskoi akademii*. 2019; 18(1): 34–41. In Russian [Буркова Н.В., Киричук О.П., Кузнецов С.И. и др. Контакт пленок хитозана с клеточными элементами венозной крови человека in vitro. Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2019; 18(1): 34–41].
- Yakimenko AO, Verholomova FY, Kotova YN, Ataullakhanov FI, Pantelev MA. Identification of different

proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. *Biophys J*. 2012; 102(10): 2261–2269. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.04.004.

7. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev*. 2015; 29(3): 153–162. DOI: 10.1016/j.blre.2014.10.003.

8. Sviridova SP, Somonova OV, Kashiya ShR, et al. The role of platelets in inflammation and immunity. *Research'n Practical Medicine Journal*. 2018; 5(3): 40–52. In Russian [Свиридова С.П., Сомонова О.В., Кашия Ш.Р. и др. Роль тромбоцитов в воспалении и иммунитете. Исследования и практика в медицине. 2018; 5(3): 40–52]. DOI: 10.17709/2409-2231-2018-5-3-4.

9. Kirichuk OP, Burkova NV, Romanchuk EV, et al. Valuation of Activation Capabilities of Solid-Phase Surfaces by the Rate of Adhesion of Blood Cells. *Translational Medicine*. 2019; 6(3): 53–60. In Russian [Киричук О.П., Буркова Н.В., Романчук Е.В. и др. Оценка активационных возможностей твердофазных поверхностей по скорости адгезии клеток крови. Трансляционная медицина. 2019; 6(3): 53–60]. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2019-6-3-53-60>

Информация об авторах:

Кузнецов Сергей Иванович, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Киричук Оксана Петровна, аспирант, лаборатории междисциплинарной физики (LIPhy), Университет Гренобль-Альпы, Гренобль, Франция;

Буркова Наталья Владимировна, д.б.н., доцент, заведующий кафедрой физиологии, профессор кафедры физиологии Лечебного факультета Института медицинского образования, ведущий научный сотрудник НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России

Юрьев Глеб Олегович, аспирант Института химии СПбГУ, инженер ресурсного центра «Инновационные технологии композитных наноматериалов» научного парка СПбГУ;

Даванков Вадим Александрович, д.х.н., профессор, заведующий лабораторией стереохимии сорбционных процессов Института элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН;

Постнов Виктор Николаевич, к.х.н., доцент, старший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, доцент кафедры химии твердого тела Института химии СПбГУ;

Романчук Елизавета Вячеславовна, студент кафедры медицинской физики Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого;

Свиридов Эрик Евгеньевич, студент лечебного факультета Института медицинского образования, лаборант-исследователь НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Киселева Анастасия Дмитриевна, студент лечебного факультета Института медицинского образования, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Kuznetsov Sergei I., Dr. Sci., prof., chief researcher of the Research laboratory of Biological Prosthetic Valve Replacement and Cardioprotection of the Center for Experimental Surgical Bio-Modelling of the Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Kirichuk Oksana P., PhD student, Interdiscipline physical laboratory (LIPhy), University of Grenoble Alpes;

Burkova Natalya V., Dr. Sci., head of the Department of physiology, prof. of the Department of physiology of the medical faculty of the Institute of Medical Education; Leading Researcher of the Research Laboratory of Biological Prosthetic Valve Replacement and Cardioprotection of the Center for Experimental Surgical Bio-Modelling of the Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Yuryev Gleb O., postgraduate student of the Institute of Chemistry, Saint-Petersburg State University;

Davankov Vadim A., Dr. Sci., prof., Head of the Laboratory of Stereochemistry of Sorption Processes of the A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds; Postnov Viktor N., PhD, Senior Researcher of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Center for experimental Biomodeling A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds;

Romanchuk Elizaveta V., student of the Department of Medical Physics, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University;

Sviridov Erik E., student of the Medical Faculty of the Institute of Medical Education, laboratory researcher of the Research Laboratory of Biological Prosthetic Valve Replacement and Cardioprotection of the Center for Experimental Surgical Bio-Modelling of the Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Kiseleva Anastasia D., student of the Medical Faculty of the Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre.