

АЛЬМАНАХ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

47 (7) • 2019

Предотвращение эпилептогенеза как
будущая стратегия терапии эпилепсии

Кардиомиопатии, ассоциированные
с мутациями гена десмина:
молекулярный патогенез
и гентерапевтические подходы

Современное состояние и перспективные
инновационные направления развития
способов стерилизации биоимплантатов

Клеточные технологии в регенеративной
медицине сердца: основные проблемы
и пути развития

Прогностическое значение
ультразвукового контроля легких после
кардиохирургических вмешательств
в условиях искусственного кровообращения

Фотодинамическая терапия солидных
опухолей *in vitro* и *in vivo* с применением
комбинации рибофлавина и наноразмерных
апконвертирующих фосфоров

Изменение морфологии эритроцитов после
действия монооксида углерода на кровь
in vitro

Увеличивается ли тонус сосудов системы
микроциркуляции при артериальной
гипертонии?

ТЕМА НОМЕРА:

БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

АЛЪМАНАХ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научно-практический журнал
Издается с 1998 г.
Периодичность – 8 выпусков в год
Учредитель – ГБУЗ МО «Московский
областной научно-исследовательский
клинический институт
им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ)

Том 47 • № 7 • 2019

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Семенов Дмитрий Юрьевич, д-р мед. наук, проф., директор ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Заместитель главного редактора

Молочков Антон Владимирович, д-р мед. наук, проф., заместитель директора ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского по науке и международным связям (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Почетный член редколлегии: **Палеев Николай Романович**, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры терапии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Баркан Ариель, д-р мед. наук, профессор, медицинский факультет, отдел метаболизма, эндокринологии и диабета отделения нейрохирургии Мичиганского университета, содиректор Центра нейроэндокринологии и заболеваний гипофиза Мичиганского университета (Энн-Арбор, США)

Белоусова Елена Александровна, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения гастроэнтерологии и гепатологии, зав. кафедрой гастроэнтерологии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Богачев-Прокофьев Александр Владимирович, д-р мед. наук, руководитель Центра новых хирургических технологий ФГБУ «ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России (Новосибирск, Россия)

Брагин Анатолий Григорьевич, д-р биол. наук, научный сотрудник Центра по эпилепсии, отделение неврологии Калифорнийского университета (Лос-Анджелес, США)

Бухфельдер Михаэль, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения нейрохирургии Университетской клиники г. Эрланген (Эрланген, Германия)

Васюк Юрий Александрович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой клинической функциональной диагностики ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России (Москва, Россия)

Вольфенбюттель Брюс, д-р мед. наук, профессор, руководитель Департамента эндокринологии Университетского медицинского центра Гронингена (Гронинген, Нидерланды)

Голухова Елена Зеликовна, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения неинвазивной аритмологии ФГБУ «ННЦССХ им. А.Н. Бакулева» Минздрава России (Москва, Россия)

Густина Андреа, д-р мед. наук, президент Европейского общества эндокринологов, профессор кафедры эндокринологии, Университет Виты Салуте Сан-Раффаэле (Милан, Италия)

Давыдов Михаил Михайлович, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, зав. хирургическим торакальным отделением НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Де Херт Стефан, д-р мед. наук, председатель научного комплекса Европейского общества анестезиологии, профессор кафедры анестезиологии и периперативной медицины Гентского университета (Гент, Бельгия)

Добрынина Лариса Анатольевна, д-р мед. наук, руководитель 3-го неврологического отделения ФГБНУ НЦН (Москва, Россия)

Драпкина Оксана Михайловна, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, директор ФГБУ «ГНИЦПМ» Минздрава России (Москва, Россия)

Киров Михаил Юрьевич, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой анестезиологии и реаниматологии ФГБОУ ВО СГМУ (г. Архангельск) Минздрава России (Архангельск, Россия)

Научный редактор выпуска

Куликов Дмитрий Александрович, канд. мед. наук, ученый секретарь, доцент кафедры эндокринологии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Ответственный редактор

Парпара Олеся Анатольевна (Москва, Россия)

Кушлинский Николай Евгеньевич, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией клинической биохимии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Литвинов Рустем Игоревич, д-р мед. наук, профессор, старший исследователь отдела клеточной биологии и биологии развития медицинского факультета Пенсильванского университета (Филадельфия, США)

Лобзин Юрий Владимирович, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, директор ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия)

Майр Йоханнес, д-р мед. наук, профессор, консультант по детской хирургии отделения детской хирургии Педиатрической клиники Университета Базеля (Базель, Швейцария)

Мельниченко Галина Афанасьевна, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, директор Института клинической эндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Мурешану Дафин Ф., д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой и клиникой неврологии медицинского факультета Медико-фармацевтического университета г. Клуж-Напока (Клуж-Напока, Румыния)

Наймарк Олег Борисович, д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. лабораторией физических основ прочности ИМСС УрО РАН – филиал ФИЦ УрО РАН (Пермь, Россия)

Неров Владимир Владимирович, академик РАН, д-р мед. наук, профессор, директор ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России (Москва, Россия)

Овезов Алексей Мурадович, д-р мед. наук, зав. отделением анестезиологии, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Москва, Россия)

Пономаренко Геннадий Николаевич, д-р мед. наук, профессор, генеральный директор ФГБУ ФНЦРИ им. Г.А. Альбрехта Минтруда России (Санкт-Петербург, Россия)

Райниш Уолтер, д-р мед. наук, отделение гастроэнтерологии и гепатологии отдела внутренних болезней № 3 Венского медицинского университета (Вена, Австрия)

Романко Юрий Сергеевич, д-р мед. наук, профессор кафедры онкологии, радиотерапии и пластической хирургии Института клинической медицины Сеченовского университета (Москва, Россия)

Шахова Наталия Михайловна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биофотоники, отдел радиофизических методов в медицине, отделение нелинейной динамики и оптики, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр ИПО РАН» (Нижегород, Россия)

Шишацкая Екатерина Игоревна, профессор РАН, д-р биол. наук, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск, Россия)

Ян Чи, д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения челюстно-лицевой хирургии Шанхайского 9-го народного госпиталя, Шанхайский университет Цзяо Тун (Шанхай, Китай)

Содержание

| | |
|---|---|
| Обзор | Оригинальные статьи |
| <i>Кочергин-Никитский К.С., Заклязьминская Е.В., Лавров А.В., Смирнихина С.А.</i> | <i>Шолина Н.В., Акасов Р.А., Хоченков Д.А., Генералова А.Н., Семчишен В.А., Хайдуков Е.В.</i> |
| Кардиомиопатии, ассоциированные с мутациями гена десмина: молекулярный патогенез и генотерапевтические подходы 603 | Фотодинамическая терапия солидных опухолей <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> с применением комбинации рибофлавина и наноразмерных апконвертирующих фосфоров 647 |
| Приглашенная статья | <i>Фот Е.В., Изотова Н.Н., Виноградов М.В., Кузьков В.В., Киров М.Ю.</i> |
| <i>Брагин А.Г.</i> | Прогностическое значение ультразвукового контроля легких после кардиохирургических вмешательств в условиях искусственного кровообращения 654 |
| Предотвращение эпилептогенеза как будущая стратегия терапии эпилепсии 614 | <i>Рогаткин Д.А., Глазкова П.А., Куликов Д.А., Глазков А.А., Терпигорев С.А., Шехян Г.Г., Козлова К.А., Макматов-Рысь М.Б.</i> |
| Точка зрения | Увеличивается ли тонус сосудов системы микроциркуляции при артериальной гипертензии? 662 |
| <i>Агладзе К.И.</i> | <i>Козлова Е.К., Сергунова В.А., Козлов А.П., Шерстюкова Е.А., Гудкова О.Е.</i> |
| Клеточные технологии в регенеративной медицине сердца: основные проблемы и пути развития 623 | Изменение морфологии эритроцитов после действия монооксида углерода на кровь <i>in vitro</i> ... 669 |
| <i>Бурсов А.И.</i> | |
| Применение искусственного интеллекта для анализа медицинских данных 630 | |
| <i>Розанов В.В., Матвейчук И.В.</i> | |
| Современное состояние и перспективные инновационные направления развития способов стерилизации биоимплантатов 634 | |

Подписной индекс 81988
Объединенный каталог «Пресса России»

Журнал индексируется в системе
Российского индекса научного цитирования
(РИНЦ): www.elibrary.ru

© 2019 ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского
www.monikiweb.ru

ISSN 2072-0505 (print)
ISSN 2587-9294 (online)

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе
по надзору в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций.
Свидетельство ПИ № ФС77-34730 от 23.12.2008.

«Альманах клинической медицины» входит
в перечень рецензируемых научных изданий,
в которых должны быть опубликованы основные
научные результаты диссертаций на соискание
ученой степени кандидата наук, на соискание
ученой степени доктора наук (Перечень ВАК).
Шифры научных специальностей:
14.01.02 – Эндокринология (медицинские науки)
14.01.04 – Внутренние болезни (медицинские
науки)
14.01.05 – Кардиология (медицинские науки)

14.01.11 – Нервные болезни (медицинские науки)
14.01.13 – Лучевая диагностика, лучевая терапия
(медицинские науки)

Редакция не несет ответственности за содержа-
ние рекламных публикаций.

Полная или частичная перепечатка или размно-
жение каким-либо способом статей и иллюстра-
ций допускается только с письменного разреше-
ния редакции.

Адрес редакции:
129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2, корп. 8
Тел.: +7 (495) 688 32 41
E-mail: o_papara@monikiweb.ru
www.almclinmed.ru

ALMANAC OF CLINICAL MEDICINE

The scientific and practical journal

Published since 1998

Founded and published by Moscow Regional
Research and Clinical Institute (MONIKI),
Moscow, Russian Federation

Publication frequency: 8 issues per year

Volume 47 • Number 7 • 2019

EDITOR-IN-CHIEF

Dmitriy Yu. Semenov, MD, PhD, Professor, Director of MONIKI
(Moscow, Russia)

Deputy Chief Editor

Anton V. Molochkov, MD, PhD, Prof., Deputy Director on Science
and International Communications, MONIKI (Moscow, Russia)

Science Editor

Dmitriy A. Kulikov, MD, PhD, Academic Secretary, Associate Professor, Chair of
Endocrinology, Postgraduate Training Faculty, MONIKI (Moscow, Russia)

Managing Editor

Olesya A. Parpara (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Honourable Member: **Nikolay R. Paleev**, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor,
Head of Chair of Therapy, Postgraduate Training Faculty, MONIKI (Moscow, Russia)

Ariel L. Barkan, MD, Professor of Medicine, Professor of Neurosurgery, Department of Medicine,
Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes, Department of Neurosurgery, Co-director of
Pituitary and Neurosurgery Center, University of Michigan (Ann Arbor, USA)

Elena A. Belousova, MD, PhD, Professor, Head of Department of Gastroenterology and Hepatology,
Head of Chair of Gastroenterology, Postgraduate Training Faculty, MONIKI (Moscow, Russia)

Alexandr V. Bogachev-Prokophiev, MD, PhD, Head of Center of the New Surgical Technologies
of NMRC named after E.N. Meshalkin (Novosibirsk, Russia)

Anatol J. Bragin, PhD, Epilepsy Center, Department of Neurology, University of California (Los
Angeles, USA)

Michael Buchfelder, MD, PhD, Professor, Head of Department of Neurosurgery, University Hospital
Erlangen (Erlangen, Germany)

Yury A. Vasyuk, MD, PhD, Professor, Head of Chair of Clinical Functional Diagnostics, MSUMD
(Moscow, Russia)

Bruce H.R. Wolfenbittel, MD, PhD, Professor of Endocrinology and Metabolism, Head of
Department of Endocrinology, University Medical Center Groningen (Groningen, Netherlands)

Elena Z. Golukhova, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Head of Department of Non-
Invasive Arrhythmology, BSCCS (Moscow, Russia)

Andrea Giustina, MD, President of European Society of Endocrinology, Professor of Endocrinology,
Vita-Salute San Raffaele University (Milan, Italy)

Mikhail M. Davydov, Corr. member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Head of Department of Thoracic
Surgery, Research Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin RCRC (Moscow, Russia)

Stefan De Hert, MD, PHD, Chair of ESA Scientific Committee, Professor of Department of
Anaesthesiology and Perioperative Medicine, Ghent University (Ghent, Belgium)

Larisa A. Dobrynina, MD, PhD, Head of the 3rd Department of Neurology, Research Center of
Neurology (Moscow, Russia)

Oksana M. Drapkina, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Director of NMRCPM
(Moscow, Russia)

Mikhail Yu. Kirov, MD, PhD, Professor, Head of Chair of Anesthesiology and Intensive Care
Medicine, Northern State Medical University (Arkhangelsk, Russia)

Nikolay E. Kushlinskii, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Head of Clinical
Biochemistry Laboratory, N.N. Blokhin RCRC (Moscow, Russia)

Rustem I. Litvinov, MD, PhD, Professor, Senior Research Investigator, Department of Cell and
Developmental Biology, School of Medicine, University of Pennsylvania (Philadelphia, USA)

Yurii V. Lobzin, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Director of Scientific and Clinical
Center of Children's Infections (Saint Petersburg, Russia)

Johannes Mayr, MD, Professor of Pediatric Surgery, Department of Pediatric Surgery, University
Children's Hospital Basel (Basel, Switzerland)

Galina A. Mel'nichenko, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Director of Institut of
Clinical Endocrinology, Endocrinology Research Center (Moscow, Russia)

Dafin F. Muresanu, MD, PhD, MBA, FANA, Professor, Chairman of the Neurosciences Department,
Faculty of Medicine, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hatieganu" Cluj-Napoca (Cluj-Napoca,
Romania)

Oleg B. Naimark, ScD in Phys.-Math., Professor, Head of Laboratory of Physical Foundation of
Strength, Institute of Continuous Media Mechanics of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
(Perm, Russia)

Vladimir V. Neroev, Member of Russ. Acad. Sci., MD, PhD, Professor, Director of Helmholtz
Research Institute of Eye Diseases (Moscow, Russia)

Alexey M. Ovezov, MD, PhD, Head of Department of Anaesthesiology, Head of Chair of
Anaesthesiology and Reanimatology, Postgraduate Training Faculty, MONIKI (Moscow, Russia)

Gennadiy N. Ponomarenko, MD, PhD, Professor, General Director of Federal Research Center of
Prosthetics and Rehabilitation of the Disabled named after G.A. Albrecht, Ministry of Labour and Social
Protection (Saint Petersburg, Russia)

Walter Reinisch, MD, Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal
Medicine III, Medical University of Vienna (Vienna, Austria)

Yury S. Romanko, MD, PhD, Professor, Chair of Oncology, Radiotherapy and Plastic Surgery, Institut
of Clinical Medicine, Sechenov University (Moscow, Russia)

Natalia M. Shakhova, MD, PhD, Leading Research Fellow, Biophotonics Laboratory, IAP RAS
(Nizhny Novgorod, Russia)

Ekaterina I. Shishatskaya, Professor of Russ. Acad. Sci., ScD in Biology, PhD, Leading Research
Fellow, Laboratory of Chemoautotrophic Biosynthesis, Biophysics Institute of the Siberian Branch of the
RAS (Krasnoyarsk, Russia)

Chi Yang, DDS, PhD, Professor, Head of Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Shanghai Ninth
People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University (Shanghai, PRC)

Content

Review Article

*K.S. Kochergin-Nikitsky, E.V. Zaklyazminskaya,
A.V. Lavrov, S.A. Smirnikhina*

Cardiomyopathies associated with the DES gene mutations: molecular pathogenesis and gene therapy approaches 603

Invited Article

A. Bragin

Prevention of epileptogenesis as a future strategy for the treatment of epilepsy 614

Point of View

K.I. Agladze

Cell technologies in the regenerative medicine of the heart: main problems and ways of development 623

A.I. Bursov

Application of artificial intelligence in medical data analysis 630

V.V. Rozanov, I.V. Matveychuk

The current state and promising innovative directions to development methods for bioimplant sterilization 634

Articles

*N.V. Sholina, R.A. Akasov, D.A. Khochenkov,
A.N. Generalova, V.A. Semchishen, E.V. Khaydukov*

In vitro and in vivo photodynamic therapy of solid tumors with a combination of riboflavin and upconversion nanoparticles 647

*E.V. Fot, N.N. Izotova, M.V. Vinogradov, V.V. Kuzkov,
M.Y. Kirov*

Prognostic value of lung ultrasonography after on-pump cardiac surgery 654

*D.A. Rogatkin, P.A. Glazkova, D.A. Kulikov, A.A. Glazkov,
S.A. Terpigorev, G.G. Shekhyan, K.A. Kozlova,
M.B. Makmatov-Rys*

Is the microvasculature tone increasing with arterial hypertension? 662

*E.K. Kozlova, V.A. Sergunova, A.P. Kozlov,
E.A. Sherstyukova, O.E. Gudkova*

Changes in the morphology of erythrocytes after in vitro exposure of blood to carbon monoxide 669

Subscription index 81988
in the united Pressa Rossii catalogue

The journal is indexed by Russian Index of Scientific
Citation (RISC): www.elibrary.ru

© 2019 MONIKI
www.monikiweb.ru

ISSN 2072-0505 (print)
ISSN 2587-9294 (online)

The journal is registered by Federal Service for Supervision in the Sphere of Telecom, Information Technologies and Mass Communications. Registration certificate ПИ № ФС77-34730 was issued on December 23, 2008.

Since 2001 the Almanac of Clinical Medicine is included in the List of leading referred journals, recommended by VAK (Higher Attestation Committee) for publication of scientific results of dissertations for the degrees of doctors and candidates of sciences.

Editorial board and the editors are not responsible for claims made in the advertisements published in the journal.

All articles published in this journal are protected by copyright, which covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article. No material published in this journal may be reproduced photographically or stored on microfilm, in electronic data base, on video discs, etc., without first obtaining written permission from the publisher (respective of the copyright owner if other than MONIKI).

Editorial Office

Almanac of Clinical Medicine, MONIKI,
61/2–8 Shchepkina ul., Moscow, 129110,
Russian Federation. Tel.: +7 (495) 688 32 41
E-mail: o_parpara@monikiweb.ru
www.almclinmed.ru



Обзор

Кардиомиопатии, ассоциированные с мутациями гена десмина: молекулярный патогенез и гентерапевтические подходы

Кочергин-Никитский К.С.¹ • Заклязьминская Е.В.^{2,3} • Лавров А.В.^{1,3} • Смирнихина С.А.¹

Кардиомиопатия – широко распространенная группа заболеваний сердечно-сосудистой системы. Генетически обусловленные кардиомиопатии связывают с нарушениями более чем в 100 различных генах, в том числе в гене *DES*, кодирующем белок десмин – один из основных белков промежуточных филаментов, обеспечивающих структурную и функциональную целостность миоцитов. Мутации в гене *DES* приводят к развитию десминзависимых кардиомиопатий, характеризующихся высокой степенью тяжести течения и неблагоприятным прогнозом. До настоящего времени специфического лечения кардиомиопатии не разработано. Имеющиеся консервативные и хирургические подходы направлены на замедление темпов прогрессирования сердечной недостаточности и профилактику внезапной сердечной смерти, но их эффективность ограничена. Развитие методов гентерапии и геномного

редактирования может способствовать созданию эффективных методов этиотропной терапии десминопатий. Опубликован ряд работ, посвященных применению методов гентерапии при кардиомиопатиях различной генетической природы, включая ассоциированные с мутациями в гене *DES*. В области терапии десминопатий методы геномного редактирования пока не используются. Тем не менее многообещающие результаты получены при использовании систем редактирования CRISPR/Cas9 и TALEN для коррекции “gain-of-function” мутаций в некоторых других генах, таких как *MYBPC3* и *PLN*. Имеются данные, указывающие на возможность улучшения симптоматики десминзависимой кардиомиопатии, вплоть до бессимптомного течения после нокаута мутантного аллеля с сохранением функции белка за счет экспрессии только нормального аллеля. Мы считаем, что подходы, основанные на

технологии геномного редактирования, представляют собой перспективное направление для разработки эффективных специфических методов лечения десминопатий.

Ключевые слова: кардиомиопатия, десмин, десминопатия, медицинская генетика, геновая терапия, геномное редактирование, CRISPR/Cas9

Для цитирования: Кочергин-Никитский КС, Заклязьминская ЕВ, Лавров АВ, Смирнихина СА. Кардиомиопатии, ассоциированные с мутациями гена десмина: молекулярный патогенез и гентерапевтические подходы. Альманах клинической медицины. 2019;47(7):603–13. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-025.

Поступила 29.05.2019; принята к публикации 18.06.2019; опубликована онлайн 09.07.2019

Неишемические кардиомиопатии – гетерогенная группа прогрессирующих заболеваний сердца, ассоциированных с различными вариантами структурного ремоделирования миокарда и ведущих к развитию сердечной недостаточности [1, 2]. Термин «кардиомиопатия» впервые предложил Уоллес Бригден (Wallace Brigden) в 1957 г. для описания заболеваний миокарда неясной этиологии без поражения коронарного кровотока [3, 4]. Основа современной классификации была заложена Всемирной организацией здравоохранения в 1995 г. [5], когда с учетом функциональных и этиологических факторов были выделены 4 типа кардиомиопатии: дилатационная (ДКМП), гипертрофическая (ГКМП), рестриктивная (РКМП), аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка (АКПЖ), а также гетерогенная группа неклассифицированных кардиомиопатий, включающая в себя фиброэластоз миокарда, некомпактный миокард, обменные кардиомиопатии и др.

В настоящее время рабочие классификации, используемые американской (АНА, 2006) и европейской (ESC, 2008) кардиологическими ассоциациями, существенно различаются, однако базовым остается выделение морфофункциональных вариантов ремоделирования и деление на первичные (семейные и спорадические) и вторичные формы.

Оба подхода к систематике кардиомиопатии имеют свои ограничения, особенно в случаях трансформирующихся и перекрывающихся фенотипов, а также вследствие неоднозначной связи между этиологическими факторами (в том числе генетическими) и результирующим фенотипом [2, 4, 6–8]. Первичные кардиомиопатии – одно из самых распространенных наследственных заболеваний человека, их суммарная частота в популяции достигает 0,5% [9]. Генетическое разнообразие этой группы заболеваний также очень велико. Идентифицировано более 100 генов, ответственных за различные варианты кардиомиопатий.



В 2014 г. Всемирная федерация сердца (WHF) предложила новый подход, впервые объединяющий не только патоморфологические и функциональные характеристики миокарда, спектр экстракардиальных нарушений, но и генетическую причину заболевания. Данный подход был воплощен в номенклатуре MOGE(S), включающей пять основных категорий: М – морфофункциональный фенотип, О – вовлеченность различных органов и систем, G – модель наследования, E – этиология и S – стадия и функциональный статус [10–12]. Несмотря на определенные сложности с применением данной номенклатуры в клинической практике, различные исследователи подтверждают ее эффективность и потенциал в работе с пациентами и их родственниками [8, 13–15]. Для облегчения использования MOGE(S) был разработан веб-сервис для стандартизированного описания пациентов с кардиомиопатией (<http://moges.biomeris.com/moges.html>). В этой классификации наглядно отражено, что каждая генетическая форма кардиомиопатии является по сути отдельным заболеванием со своими особенностями молекулярного патогенеза, течения и прогноза. В настоящем аналитическом обзоре мы обобщаем современные данные и обсуждаем перспективы геноспецифической терапии десминассоциированных кардиомиопатий (десминопатий).

Клиническое разнообразие первичных десминопатий

Ген *DES* расположен на хромосоме 2 (2q35), содержит 9 экзонов и кодирует белок десмин. Мутации в этом гене могут приводить к клинически различным заболеваниям, сопровождающимся вариабельным вовлечением скелетной мускулатуры и миокарда. Сегодня принято эти заболевания объединять по этиотропному принципу в группу десминопатий.

Около 80% случаев десминопатий наследуется по аутосомно-доминантному типу с полной пенетрантностью. Процент мутаций *de novo* составляет около 14% [16–19]. Описаны также редкие случаи неполной пенетрантности доминантных мутаций [20, 21] и семейных аутосомно-рецессивных десминопатий [22–26], характеризующихся ранней манифестацией и быстрым прогрессированием заболевания [16, 18]. Десминопатии довольно широко распространены, их суммарная частота

Кочергин-Никитский Константин Сергеевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаборатория мутагенеза¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0096-4542>.
✉ 117593, г. Москва, Новоясеневский проспект, 19/4–424, Российская Федерация. Тел.: +7 (977) 830 94 95. E-mail: KochNik.KS@gmail.com

Заклязьминская Елена Валерьевна – д-р мед. наук, заведующая лабораторией медицинской генетики²; доцент кафедры молекулярной и клеточной генетики медико-биологического факультета³; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6244-9546>. E-mail: helenezak@gmail.com

Лавров Александр Вячеславович – канд. мед. наук, вед. науч. сотр., лаборатория редактирования генома¹; доцент кафедры молекулярной и клеточной генетики медико-биологического факультета³; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4962-6947>. E-mail: alexandervlavrov@gmail.com

Смирнихина Светлана Анатольевна – канд. мед. наук, заведующая лабораторией редактирования генома¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1558-3048>. E-mail: smirnikhinas@gmail.com

оценивается в 1:2000 [17]. Средний возраст манифестации большинства десминопатий составляет 20–40 лет [27]. Течение заболевания, как правило, прогрессирующее с высокой летальностью.

Ремоделирование миокарда при десминзависимых кардиомиопатиях наиболее часто развивается по типу дилатации (ДКМП) или рестриктивной дисфункции (РКМП), однако описаны все известные варианты кардиомиопатий. При ремоделировании по типу РКМП наблюдается более ранняя манифестация и низкая продолжительность жизни, около 20% пациентов с десминопосредованной РКМП не доживают до возраста 32 лет. Этот вариант кардиомиопатии развивается у 12% носителей мутаций в гене *DES* [28]. В группе всех случаев РКМП на долю мутаций в гене *DES* приходится 9% [29]. В группе ДКМП на долю десминассоциированных форм приходится около 1–2% [30, 31]. Согласно данным, полученным в метаисследовании К.У. van Spaendonck-Zwarts и соавт., больные с десминопосредованной ДКМП в половине случаев доживают до 54 лет [28]. Гипертрофия миокарда и АКПЖ при мутациях в гене десмина также описаны, но являются более редкими (таблица) [28]. Для первичных десминопатий характерно вовлечение проводящей системы миокарда, что приводит к развитию выраженных нарушений ритма и проводимости. У половины пациентов с различными формами кардиомиопатии наблюдали нарушения проводимости и у 20% – аритмии [28]. Изолированный «сердечный» фенотип отмечен всего у 22% пациентов с мутациями в гене десмина. Более 70% носителей мутаций, охваченных данным метаисследованием, имели различные проявления поражения скелетной мускулатуры в сочетании с кардиомиопатиями [28].

При мутациях в гене *DES*, как правило, развивается десминзависимая скелетная миопатия, которая характеризуется прогрессирующей слабостью дистальных мышц конечностей без явного болевого синдрома. Постепенно слабость распространяется на проксимальную мускулатуру с вовлечением мышц торса, шеи, лицевой мускулатуры, в некоторых случаях развиваются тетрапарезы [16, 28, 32, 33]. При этом часто поражаются дыхательные мышцы, что ведет к дыхательной недостаточности и смерти [28, 34].

Гладкие мышцы при патологии десмина обычно не страдают, вместе с тем при десминопатиях

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1, Российская Федерация

² ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского»; 119991, г. Москва, Абрикосовский переулок, 2, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России; 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1, Российская Федерация



Варианты кардиомиопатии у пациентов с мутациями в гене *DES* [28]

| Вариант ремоделирования | Число пациентов, абс. | Доля, % |
|---|-----------------------|---------|
| Дилатационная кардиомиопатия | 23 | 17 |
| Рестриктивная кардиомиопатия | 16 | 12 |
| Гипертрофическая кардиомиопатия | 8 | 6 |
| Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка | 2 | 1 |
| Смешанная (неспецифическая) кардиомиопатия | 18 | 13 |
| Без кардиомиопатии | 71 | 51 |
| Всего | 138 | 100 |

иногда наблюдаются затруднения глотания, диарея и запоры [27, 28].

Молекулярный патогенез первичных десминопатий

Десмин – структурный белок цитоскелета длиной 470 аминокислот и массой 53 кДа. Он входит в группу из 4 структурных белков, формирующих промежуточные филаменты III типа (виментин, десмин, кислый глиальный белок – GFAP, периферин), а также является основным белком промежуточных филаментов миоцитов. Если белки микротрубочек и микрофиламентов экспрессируются повсеместно в различных тканях, белки промежуточных филаментов тканеспецифичны. Для десмина типична экспрессия главным образом в клетках миокарда и скелетных мышцах [16, 35–38].

Будучи одной из критически важных компонент цитоскелета, десмин участвует в обеспечении механической целостности миоцитов, связывает сократительный аппарат мышечных клеток с внутриклеточными структурами, обеспечивая их правильное пространственное взаимодействие и нормальную структуру миофибрилл. Десмин связывает саркомеры с сарколеммой и экстрацеллюлярным матриксом, обеспечивая передачу усилия в районе Z-дисков, передачу механохимических сигналов. Он непосредственно используется для позиционирования митохондрий, обеспечивающих энергетические потребности сократительного аппарата, вблизи А- и I-полос миофибрилл [16, 19, 38–40]. Данный белок является важным компонентом волокон Пуркиньи и, соответственно, участвует в обеспечении автономного синхронного сокращения миокарда [16, 41].

Недостаток десмина может приводить к мультисистемной патологии с преимущественным поражением мышечных тканей. Нокаутированные по десмину мышцы способны к нормальному формированию и созреванию миофибрилл с последующей их сборкой в первичные и вторичные мышечные трубочки в пренатальном периоде. Однако в постнатальный период мышцы этих мышечных трубочек и миофибрилл в прямой зависимости от нагрузки. Доминирующие повреждения наблюдались в сердечной мышце и наиболее активно работающих скелетных мышцах, таких как диафрагма. В поперечно-полосатой мышечной ткани обнаруживались частично разъединенные миофибриллы и нарушение выравнивания Z-дисков. Спустя 2 недели после рождения волокна с нарушенной организацией превалировали над нормальными вследствие неправильной сборки после повреждений. Вероятно, десмин необходим в процессах регенерации мышечных волокон в постнатальном периоде [42]. Такие мышцы демонстрировали повышенную утомляемость, силовые показатели скелетных мышц были ниже, чем у контрольных мышечных трубочек. Продолжительность их жизни была в среднем вдвое меньше [35, 38, 42]. У *DES* ^{-/-} мышцей развивалась гипертрофическая или дилатационная кардиомиопатия, прогрессирующие дегенерация и некроз кардиомиоцитов. Нарушение выравнивания Z-дисков и организации миофибрилл вело к механическому ослаблению сократительного аппарата сердца, хотя уровни актина и миозина оставались в пределах нормы [19, 38, 43].

Одно из наиболее ранних проявлений патологии, связанной с нарушением функции десмина, – образование скоплений митохондрий под сарколеммой. Наблюдаются морфологические (набухание, деградация матрикса) и функциональные (снижение митохондриального дыхания, аффинности к аденозиндифосфату) изменения [40, 44]. Наблюдаемый повышенный уровень креатинкиназы в митохондриях, вероятно, свидетельствует о компенсации их функциональной недостаточности и дефицита энергии. Последнее может приводить к генерации преапоптотических сигналов. В кардиомиоцитах мышечной *DES* ^{-/-} значительно понижается уровень цитохрома C, изменяется локализация Bcl-2, что провоцирует дегенерацию кардиомиоцитов и развитие кальциноза [38]. Это косвенно подтверждается тем, что суперэкспрессия Bcl-2 в сердцах таких мышечных трубочек приводит к частичной коррекции дефектов, связанных с описанной митохондриальной

патологией, предотвращению развития гипертрофии миокарда и улучшению сердечной функции [38, 45].

Типичным проявлением десминопатий считается накопление десминпозитивных включений в мышцах, представляющих собой гранулезные и фиброзные агрегаты в субсарколеммном и интермиофибрилярном пространствах [27, 32, 39]. Для десминопатий с вовлечением миокарда более характерно центральное, а не субсарколеммное расположение агрегатов аномального десмина и его кластеризация в области вставочных дисков [18]. Причиной накопления протеиновых агрегатов может быть ингибирование процессов аутофагии при избытке «неправильных» белков. Такие амилоидоподобные агрегаты могут приводить к гибели кардиомиоцитов и развитию сердечной недостаточности [39, 46]. Как и при миопатиях, ограниченных скелетной мускулатурой, могут наблюдаться гипертрофия кардиомиоцитов и нарушения структуры миофибрилл [34].

В десмине, как и в остальных белках промежуточных филаментов, выделяют центральный стержнеобразный альфа-спиральный коровый регион размером 307 аминокислот, состоящий из 4 альфа-спиральных субрегионов (1A, 1B, 2A и 2B), разделенных неспиральными линкерами (рис. 1). Коровый домен сформирован 7 аминокислотными повторами из гидрофобных и гидрофильных аминокислот. Повторы позволяют двум полипептидам образовывать гомополимерные спирализованные димеры, являющиеся элементарными звеньями десминовых промежуточных филаментов. N-концевой «головной» и C-концевой «хвостовой» домены обеспечивают взаимодействие между димерами при сборке тетрамеров, в свою очередь собирающихся в структуры более высокого порядка при образовании филаментов. Они также участвуют во взаимодействии с другими белками цитоскелета в процессе формирования сети промежуточных филаментов [16, 18, 27].

Фенотипические проявления зависят от того, какой регион белка затрагивают мутации. Так, мутации в субдомене 2B часто ассоциированы со

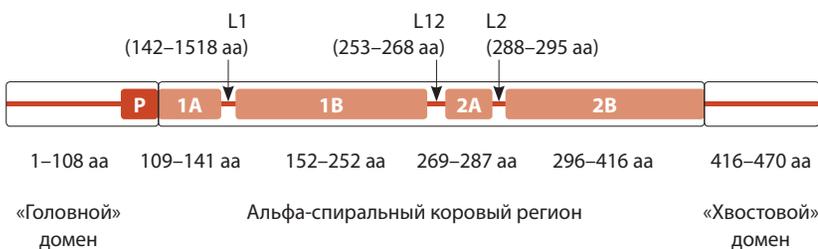


Рис. 1. Структура белка десмина

скелетными миопатиями, при этом вовлечение миокарда может варьировать. А мутации в 1B, «головном» и «хвостовом» доменах часто приводят к развитию тяжелого «сердечного» фенотипа. Мутации в 1B, кроме того, значительно повышают вероятность развития РКМП по сравнению с мутациями в «хвостовом» домене [16, 47]. Большинство идентифицированных патогенных мутаций локализованы в 2B субдомене – «горячем регионе» мутаций [18, 27, 28, 48]. L.G. Goldfarb и соавт. [18] провели анализ гено-фенотипических особенностей 92 пациентов с мутациями в гене *DES*. Оказалось, что мутации в 2B регионе были выявлены у большинства пациентов с клиническими признаками скелетной миопатии и варибельным поражением сердца, тогда как у пациентов с изолированной кардиальной формой мутации чаще выявляли в «хвостовом» домене и 1B субдомене.

Вместе с тем ряд авторов считает, что взаимосвязь между локализацией мутаций и клиническим фенотипом малозначима или вовсе отсутствует [49, 50].

Подходы к лечению десминопатий

При десминзависимых кардиомиопатиях факторами, ограничивающими выживаемость, являются тяжелые аритмии и нарушения проводимости, а также прогрессирование сердечной недостаточности.

Консервативное лечение включает ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, блокаторы рецепторов к ангиотензину II [51–55], для контроля артериального давления широко применяют бета-адреноблокаторы и блокаторы кальциевых каналов [56–58]. Для замедления сердечного ритма и усиления сокращения миокарда, предотвращения фибрилляции и трепетания предсердий в некоторых случаях используют дигоксин [51, 53, 59]. При возникновении застойной сердечной недостаточности применяются различные диуретики. Антагонисты альдостерона, применяемые в комбинации с ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента, могут помочь снизить задержку натрия и избыток жидкости [52, 60, 61]. Антикоагулянты рекомендованы пациентам, у которых нарушения ритма и сердечная недостаточность ассоциированы с высоким риском тромбообразования [62].

Хирургические подходы к лечению нарушений ритма и проводимости включают имплантацию электрокардиостимулятора, кардиовертеров-дефибрилляторов, а для пациентов с выраженной межжелудочковой асинхронией – имплантацию ресинхронизирующих устройств [52, 63–69]. При



сердечной недостаточности часто требуется имплантация устройств вспомогательного кровообращения (LVAD) или трансплантация сердца.

Основная проблема терапии десминопатий состоит в отсутствии специфических методов лечения. Большинство имеющихся подходов (в том числе хирургических) паллиативны, и их эффективность ограничена. Именно поэтому существенным шагом вперед в лечении этой группы заболеваний может стать разработка этиологического лечения, направленного на коррекцию первичного генетического дефекта.

Генотерапевтические подходы при десминзависимой кардиомиопатии

Кодирующая последовательность гена *DES* состоит из 1413 пар оснований. Небольшой размер позволяет осуществить трансфекцию либо трансдукцию кодирующей последовательности этого гена в ткани-мишени. Ранее были опубликованы данные об успешной доставке и суперэкспрессии других генов, связанных с развитием кардиомиопатии, с использованием рекомбинантных адено-ассоциированных вирусов (AAV). Специфическая экспрессия продукта в пределах сердечной мышцы обеспечивается обычно тропизмом выбранного AAV к тканям миокарда, поэтому наиболее часто использовали подтип AAV9 [70–90]. В ряде исследований специфичность дополнительно гарантировалась тканеспецифичными промоторами [87, 91–94]. М.В. Neckmann и соавт. [95] использовали rAAV9 вектор для доставки мышиног десмина в виде комплементарной ДНК (кДНК) в организм модельных мышей с нокаутированным собственным *DES* (-/-). В отличие от наиболее частых ауто-сомно-доминантных десминопатий рецессивные формы характеризуются полным отсутствием экспрессии десмина и ассоциированы с более тяжелыми кардиомиопатиями, часто приводящими к смерти на второй декаде жизни. Авторам удалось частично восстановить экспрессию десмина, что привело к значительному восстановлению сети десминовых филаментов в цитоскелете кардиомиоцитов, снижению вентрикулярного фиброза и гипертрофии по сравнению с контрольными мышами, у которых прогрессировала систолическая дисфункция левого желудочка. Мыши, подвергшиеся генотерапии, показывали умеренное снижение фракции укорочения и отсутствие прироста конечно-диастолического размера левого желудочка на протяжении 10 месяцев эксперимента. Наряду с этим наблюдали значимо более низкий уровень экспрессии маркера

сердечной недостаточности – белка BNP, хотя и более высокий, нежели у нормальных мышей [95].

Более длинные гены также успешно вводили с помощью AAV векторов. Так, *MYBPC3*, кодирующая последовательность которого насчитывает 3837 пар оснований, был эффективно трансдуцирован *in vivo* с использованием AAV9. Однократное системное введение рекомбинантного AAV с *MYBPC3* новорожденным мышам с поврежденным *MYBPC3* предотвращало развитие гипертрофии миокарда [87, 94]. Введение посредством rAAV кДНК *SERCA2α* (3135 п.о.) модельным крысам с гипертрофией миокарда вследствие перегрузки давлением, пониженным уровнем экспрессии *SERCA2α* и тяжелой сократительной дисфункцией позволило скорректировать систолическую и диастолическую дисфункции до нормального уровня [88]. Для доставки длинных последовательностей были успешно использованы двойные и тройные системы AAV векторов. В этом случае для восстановления полной вводимой последовательности гена используются собственные клеточные механизмы. Такую мультивекторную систему успешно применяли для доставки минидистрофина (около 6000 п.о.) и даже целого дистрофина (около 12000 п.о.) в сердце мышей [71, 72]. Данные системы потенциально могут быть использованы для доставки полной последовательности гена *DES* (8363 п.о.).

Часть десминопатий связана с недостаточностью не самого десмина, а белков-шаперонов, таких как *CryAB*. При этом накопление белковых агрегатов может быть обусловлено недостаточной аутофагосомальной функцией. На модельных клетках крыс с заменой p.R120G в *CryAB* трансдукция регулятора аутофагии *Atg7* привела к индуцированию аутофагии. Показано уменьшение уровня окрашивания преамилоида в кардиомиоцитах, количества агрегатов и цитотоксичности без негативного эффекта на выживаемость клеток [96]. Авторы другой работы скрещивали мышей с *CryAB*(R120G) с трансгенными мышами с миокардспецифичной суперэкспрессией *Bcl-2*. Было показано увеличение на 20% продолжительности жизни потомков, несущих оба признака. Авторы также сообщали о сниженном уровне митохондриальных аномалий, накопления агрегатов *CryAB*, восстановлении функций сердечной мышцы, предотвращении развития гипертрофии и ослаблении апоптотических процессов. Однако регуляция аутофагии и альтернативных путей клеточной смерти была нарушена, что приводило к усилению некротических процессов [97].

Защитный эффект α -В-кристаллина в отношении некоторых токсических эффектов, связанных с неправильно сложенным десмином, был продемонстрирован на стабильно трансфицированных клеточных линиях [98]. Индуцированная тканеспецифичная экспрессия шаперона HSP22 в сердцах мышей с CryAV p.R120G позволяла замедлить развитие кардиомиопатии по сравнению с контрольной группой [99].

Доминантные “gain-of-function” мутации десмина требуют более сложного подхода. В этом случае требуется нокдаун мутантного аллеля с повышением экспрессии нормального либо предоставлением дополнительной экзогенной копии гена. I. Karakikes и соавт. [100] показали применимость подобной стратегии на клеточных моделях, несущих мутацию гена PLN c.40_42delAGA (p.Arg14del), выявленную у членов большой греческой семьи с семейной ДКМП. Авторы работы, используя вектор на основе AAV6, несущий интронную микроРНК для нокдауна эндогенного мутантного *PLN* и кодон-оптимизированный функциональный *PLN*, резистентный к вышеуказанной микроРНК, смогли добиться 50% нокдауна эндогенного *PLN* p.R14del в кардиомиоцитах. Суперэкспрессия экзогенного белка, в свою очередь, ингибировала синтез эндогенного, указывая на негативную регуляцию. Было показано падение уровня экспрессии гипертрофических маркеров и частоты аритмогенных эпизодов до уровня нормальных кардиомиоцитов спустя 7 дней после трансдукции вектора [100].

Другой многообещающий подход основывался на аллель-специфическом подавлении экспрессии генов (сайленсинг). Возможности этой методики были продемонстрированы на примере сайленсинга посредством РНК-интерференции мутации *MYH7* p.R403Q. В течение 6 месяцев наблюдения после введения кассеты на основе AAV9 однодневным новорожденным мышам с мутацией p.R403Q авторы не обнаружили развития ГКМП либо фиброза миокарда. Кроме того, по их данным 25% снижения экспрессии мутантного аллеля оказывалось достаточно для подавления развития ГКМП [101].

Геномное редактирование при десминзависимых кардиомиопатиях

Термин «геномное редактирование» применяют в отношении изменения внутриклеточной ДНК посредством сконструированных направляемых эндонуклеаз, таких как TALEN (transcription activator-like effector nucleases), ZFN (zinc finger nucleases) и CRISPR/Cas9 (clustered regulatory interspaced

short palindromic repeats / CRISPR-associated protein 9). Каждая из этих систем включает в себя домен, осуществляющий сиквенс-специфическое связывание с молекулами ДНК, а также домен с неспецифической эндонуклеазной активностью. В системе CRISPR/Cas9 таргетирование осуществляется посредством коротких молекул РНК, имеющих участки, комплементарный целевому региону. Так называемые редакторы оснований, содержащие в составе гибридного эффекторного домена аденин- либо цитидин-дезаминазу, позволяют прицельно заменять отдельные нуклеотиды в цепи ДНК. Все эти молекулярные инструменты могут с высокой точностью редактировать первичную структуру большинства генов. Возможность направления к определенным локусам с точностью до нуклеотида и, в случае CRISPR/Cas9, простота и сравнительно невысокая стоимость процедур делают геномное редактирование весьма привлекательной и многообещающей технологией в приложении к терапии наследственных заболеваний. Наиболее часто используют варианты технологии, включающие такие механизмы репарации двуниевых разрывов ДНК, как негомологичное соединение концов (NHEJ) и гомологичная репарация (HDR). NHEJ, не отличающийся точностью и часто вносящий короткие инсерции и делеции (инделлы), активен во всех фазах клеточного цикла в клетках млекопитающих. Активность HDR, реализуемого через гомологичную рекомбинацию целевой ДНК с эндо- или экзогенной матрицей и отличающегося практически прецизионной точностью, подходящей для таргетного редактирования, ограничена лишь S и G2 фазами, а его эффективность по сравнению с NHEJ весьма невысока.

Большинство мутаций гена *DES*, приводящих к десминзависимым кардиомиопатиям, являются доминантными и представлены в клетке в комбинации с нормальным аллелем. При этом имеются данные, свидетельствующие о том, что мутации в гене *DES*, нарушающие экспрессию мутантного аллеля, в гетерозиготном состоянии не приводят к развитию клинических проявлений десминопатий. В 2013 г. Н.М. McLaughlin и соавт. [102] описали случай десминопатии с ДКМП и миопатией у 27-летней женщины. Ее брат, имевший аналогичную симптоматику в 14 лет, скончался в возрасте 19 лет. У родителей, которые были старше 50 лет, никаких симптомов не наблюдалось. Оба родителя были здоровыми носителями одной из мутаций, каждая из которых нарушала экспрессию мутантного аллеля: *DES* c.600delG (p.Lys201ArgfsX20) и *DES* c.1285C>T (p.Arg429X), в то время как у их детей обе мутации оказались

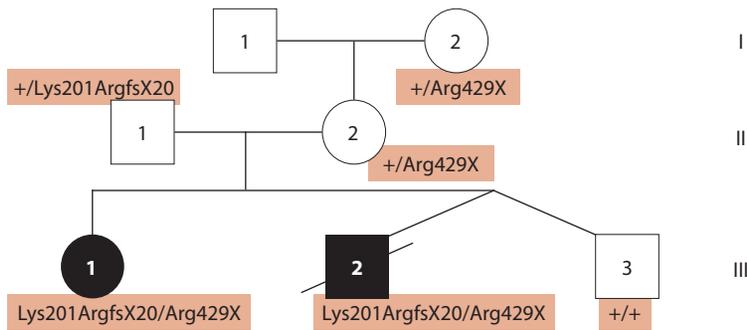


Рис. 2. Сегрегация мутаций *DES* с.600delG (p.Lys201ArgfsX20) и *DES* с.1285C>T (p.Arg429X) [102]

в компаунд-гетерозиготном состоянии (рис. 2) [102]. Данный пример позволяет предположить, что нокаут аллеля с доминантной “gain-of-function” мутацией может восстановить экспрессию исключительно с нормальной копии десмина и потенциально иметь благоприятный эффект. Разработка такого подхода могла бы найти применение для лечения больных с десминопатиями, вызванными доминантными мутациями в гене *DES*. Успешный нокаут аллеля с мутацией посредством геномного редактирования уже был получен в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) от пациента с ДКМП, связанной с мутацией *PLN* с.40_42delAGA (p.Arg14del). При этом использовали систему на основе TALEN и ориентированную NHEJ-зависимую репарацию двунитевых разрывов ДНК (ДНР). Полногеномное секвенирование исходных и отредактированных ИПСК показало низкий уровень индукции нецелевых ДНР. Кардиомиоциты, полученные из отредактированных ИПСК, демонстрировали нормальный фенотип в отличие от контрольных нередактированных клеток [100].

Как и мутации *DES*, аутосомно-доминантные мутации *MYBPC3* часто могут быть ассоциированы с развитием ГКМП с поздней манифестацией. Герминативная делеция g.9836_9839delGAGT в 16-м экзоне *MYBPC3* была отредактирована в эмбриональных клетках человека с использованием подхода на основе CRISPR/Cas9. ИПСК, полученные от пациента, электропорировали плазмидой

с Cas9 и ssODN в качестве матрицы для репарации. Из 61 протестированного клона 17 были отредактированы, и 7 из них – посредством HDR с применением предоставленной ssODN. Однако в эмбриональных клетках HDR проходил с использованием эндогенной матрицы – нормального аллеля. Авторы сообщают о более высокой эффективности редактирования в эмбриональных клетках (72,2%), вероятно, из-за более эффективной доставки, которая проводилась с использованием микроинъекций РНП. Эффективность репарации по пути HDR в случае эмбриональных клеток составляла до 64% отредактированных бластомеров. Авторам удалось избежать мозаицизма и достичь высокого процента гомозиготных эмбрионов, несущих *MYBPC3* дикого типа, при этом не было выявлено нецелевого редактирования [100].

Заключение

Общая тяжесть течения десминопатий, низкое качество жизни пациентов и серьезный прогноз заболевания в сочетании с отсутствием специфической терапии подталкивают к разработке новых подходов, позволяющих воздействовать на непосредственную причину заболевания. Применимость техник генной терапии при лечении кардиомиопатии была показана разными группами исследователей, и некоторые из таких работ были посвящены десминзависимым кардиомиопатиям. Выявлен потенциал таких подходов, как доставка функционального *DES* в виде кДНК в векторах на основе AAV9, суперэкспрессия различных белков-шаперонов, например, СгуАВ, инактивация мутантных аллелей с параллельной доставкой экзогенной копии гена и пр. Однако подходов на основе геномного редактирования мутантного гена *DES* разработано не было. Тем не менее некоторые многообещающие результаты были получены для других генов с “gain-of-function” мутациями, включая *MYBPC3* и *PLN*, при использовании систем CRISPR/Cas9 и TALEN. Мы полагаем, что технология геномного редактирования – перспективное направление в разработке новых эффективных методов лечения десминзависимых кардиомиопатий. ©

Дополнительная информация

Финансирование

Работа частично поддержана грантом Российского научного фонда № 16-15-10421. Результаты, представленные в разделах «Генотерапевтические подходы при десминзависимой кардиомиопатии» и «Геномное редактирование при десминзависимых кардиомиопатиях», получены в рамках государственного задания Минобрнауки России.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в анализ литературы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Литература / References

- Cooper LT. Definition and classification of the cardiomyopathies [Internet]. Accessed at Apr. 15, 2018. Available from: <http://www.uptodate.com/home>.
- McCartan C, Mason R, Jayasinghe SR, Griffiths LR. Cardiomyopathy classification: ongoing debate in the genomics era. *Biochem Res Int*. 2012;2012:796926. doi: 10.1155/2012/796926.
- Abelmann WH. Classification and natural history of primary myocardial disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 1984;27(2):73–94. doi: 10.1016/0033-0620(84)90020-3.
- Cecchi F, Tomberli B, Olivotto I. Clinical and molecular classification of cardiomyopathies. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2012;2012(1):4. doi: 10.5339/gcsp.2012.4.
- Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyrfas I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93(5):841–2.
- Maron BJ. The 2006 American Heart Association classification of cardiomyopathies is the gold standard. *Circ Heart Fail*. 2008;1(1):72–5; discussion 76. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.770826.
- Elliott P. The 2006 American Heart Association classification of cardiomyopathies is not the gold standard. *Circ Heart Fail*. 2008;1(1):77–9; discussion 80. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.770511.
- Благова ОВ, Недоступ АВ. Классификация некоронарогенных заболеваний сердца: наш взгляд на проблему. *Российский кардиологический журнал*. 2017;(2):7–21. doi: 10.15829/1560-4071-2017-2-7-21. [Blagova OV, Nedostup AV. Classification of non-coronary heart diseases. Point of view. *Russian Journal of Cardiology*. 2017;(2):7–21. Russian. doi: 10.15829/1560-4071-2017-2-7-21].
- Charron P, Arad M, Arbustini E, Basso C, Bilinska Z, Elliott P, Helio T, Keren A, McKenna WJ, Monserrat L, Pankuweit S, Perrot A, Rapezzi C, Ristic A, Seggewiss H, van Langen I, Tavazzi L; European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2010;31(22):2715–26. doi: 10.1093/eurheartj/ehq271.
- Arbustini E, Narula N, Dec GW, Reddy KS, Greenberg B, Kushwaha S, Marwick T, Pinney S, Bellazzi R, Favalli V, Kramer C, Roberts R, Zoghbi WA, Bonow R, Tavazzi L, Fuster V, Narula J. The MOGE(S) Classification for a Phenotype-Genotype Nomenclature of Cardiomyopathy: Endorsed by the World Heart Federation. *Glob Heart*. 2013;8(4):355–82. doi: 10.1016/j.gheart.2013.11.001.
- Arbustini E, Narula N, Dec GW, Reddy KS, Greenberg B, Kushwaha S, Marwick T, Pinney S, Bellazzi R, Favalli V, Kramer C, Roberts R, Zoghbi WA, Bonow R, Tavazzi L, Fuster V, Narula J. The MOGE(S) classification of cardiomyopathy: endorsed by the World Heart Federation. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(22):2046–72. doi: 10.1016/j.jacc.2013.08.1644.
- Arbustini E, Narula N, Tavazzi L, Serio A, Grasso M, Favalli V, Bellazzi R, Tajik JA, Bonow RO, Fuster V, Narula J. The MOGE(S) classification of cardiomyopathy for clinicians. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(3):304–18. doi: 10.1016/j.jacc.2014.05.027.
- Westphal JG, Rigopoulos AG, Bakogiannis C, Ludwig SE, Mavrogeni S, Bigalke B, Doenst T, Pauschinger M, Tschöpe C, Schulze PC, Noutsias M. The MOGE(S) classification for cardiomyopathies: current status and future outlook. *Heart Fail Rev*. 2017;22(6):743–52. doi: 10.1007/s10741-017-9641-4.
- Hazebroek MR, Moors S, Dennert R, van den Wijngaard A, Krapels I, Hoos M, Verdonchot J, Merken JJ, de Vries B, Wolffs PF, Crijns HJ, Brunner-La Rocca HP, Heymans S. Prognostic Relevance of Gene-Environment Interactions in Patients With Dilated Cardiomyopathy: Applying the MOGE(S) Classification. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(12):1313–23. doi: 10.1016/j.jacc.2015.07.023.
- Agarwal A, Yousefzai R, Jan MF, Cho C, Shetabi K, Bush M, Khandheria BK, Paterick TE, Treiber S, Sra J, Werner P, Allaqaband S, Bajwa T, Tajik AJ. Clinical application of WHF-MOGE(S) classification for hypertrophic cardiomyopathy. *Glob Heart*. 2015;10(3):209–19. doi: 10.1016/j.gheart.2015.01.001.
- Goldfarb LG, Dalakas MC. Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J Clin Invest*. 2009;119(7):1806–13. doi: 10.1172/JCI38027.
- Clemen CS, Herrmann H, Strelkov SV, Schröder R. Desminopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol*. 2013;125(1):47–75. doi: 10.1007/s00401-012-1057-6.
- Goldfarb LG, Olivé M, Vicart P, Goebel HH. Intermediate filament diseases: desminopathy. *Adv Exp Med Biol*. 2008;642:131–64.
- Brodehl A, Gaertner-Rommel A, Milting H. Molecular insights into cardiomyopathies associated with desmin (DES) mutations. *Biophys Rev*. 2018;10(4):983–1006. doi: 10.1007/s12551-018-0429-0.
- Dalakas MC, Vasconcelos OM, Kaminska A, Kwiesciski H, Hilton-Jones D, Squier W, Goldfarb LG. Desmin myopathy: Distinct filamentopathy caused by mutations in the desmin gene. *Acta Myologica*. 2002;21:138–43.
- Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE, Quiñones MA, Zoghbi WA, Hill R, Bachinski LL, Mann DL, Roberts R. Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1999;100(5):461–4.
- Carmignac V, Sharma S, Arbogast S, Fischer D, Serreri C, Serria M, Stoltenburg G, Maurage CA, Herrmann H, Cuisset JM, Bär H, Ferreira A. A homozygous desmin deletion causes an Emery-Dreifuss like recessive myopathy with desmin depletion. *Neuromuscul Disord*. 2009;19(8–9):600. doi: 10.1016/j.nmd.2009.06.179.
- Goldfarb LG, Park KY, Cervenáková L, Gorokhova S, Lee HS, Vasconcelos O, Nagle JW, Semino-Mora C, Sivakumar K, Dalakas MC. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet*. 1998;19(4):402–3. doi: 10.1038/1300.
- Arbustini E, Pasotti M, Pilotto A, Pellegrini C, Grasso M, Previtali S, Repetto A, Bellini O, Azan G, Scaffino M, Campana C, Piccolo G, Viganò M, Tavazzi L. Desmin accumulation restrictive cardiomyopathy and atrioventricular block associated with desmin gene defects. *Eur J Heart Fail*. 2006;8(5):477–83. doi: 10.1016/j.ejheart.2005.11.003.
- Muñoz-Mármol AM, Strasser G, Isamat M, Coulombe PA, Yang Y, Roca X, Vela E, Mate JL, Coll J, Fernández-Figueras MT, Navas-Palacios JJ, Ariza A, Fuchs E. A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(19):11312–7. doi: 10.1073/pnas.95.19.11312.
- Piñol-Ripoll G, Shatunov A, Cabello A, Larrodé P, de la Puerta I, Pelegrín J, Ramos FJ, Olivé M, Goldfarb LG. Severe infantile-onset cardiomyopathy associated with a homozygous deletion in desmin. *Neuromuscul Disord*. 2009;19(6):418–22. doi: 10.1016/j.nmd.2009.04.004.
- Schröder R, Vrabie A, Goebel HH. Primary desminopathies. *J Cell Mol Med*. 2007;11(3):416–26. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00057.x.
- van Spaendonck-Zwarts KY, van Hessem L, Jongbloed JD, de Walle HE, Capetanaki Y, van der Kooij AJ, van Langen IM, van den Berg MP, van Tintelen JP. Desmin-related myopathy. *Clin Genet*. 2011;80(4):354–66. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01512.x.
- Gallego-Delgado M, Delgado JF, Brossa-Loidi V, Palomo J, Marzoa-Rivas R, Perez-Villa F, Salazar-Mendiguchía J, Ruiz-Cano MJ, Gonzalez-Lopez E, Padron-Barthe L, Bornstein B, Alonso-Pulpon L, Garcia-Pavia P. Idiopathic Restrictive Cardiomyopathy Is Primarily a Genetic Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(25):3021–3. doi: 10.1016/j.jacc.2016.04.024.
- Taylor MR, Slavov D, Ku L, Di Lenarda A, Sinagra G, Carniel E, Haubold K, Boucek MM, Ferguson D, Graw SL, Zhu X, Cavanaugh J, Sucharov CC, Long CS, Bristow MR, Lavori P, Mestroni L; Familial Cardiomyopathy Registry; BEST (Beta-Blocker Evaluation of Survival Trial) DNA Bank. Prevalence of desmin mutations in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2007;115(10):1244–51. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.646778.
- Tesson F, Sylvius N, Pilotto A, Dubosq-Bidot L, Peuchmard M, Bouchier C, Benaiche A, Mangin L, Charron P, Gavazzi A, Tavazzi L, Arbustini E, Komajda M. Epidemiology of desmin and cardiac actin gene mutations in a European



- population of dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2000;21(22):1872–6. doi: 10.1053/ehj.2000.2245.
32. Vajsar J, Becker LE, Freedom RM, Murphy EG. Familial desminopathy: myopathy with accumulation of desmin-type intermediate filaments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993;56(6):644–8. doi: 10.1136/jnnp.56.6.644.
 33. Goebel HH, Voit T, Warlo I, Jacobs K, Johannsen U, Müller CR. *Rev Neurol (Paris)*. Immunohistologic and electron microscopic abnormalities of desmin and dystrophin in familial cardiomyopathy and myopathy. 1994;150(6–7):452–9.
 34. Dagvadorj A, Goudeau B, Hilton-Jones D, Blancato JK, Shatunov A, Simon-Casteras M, Squier W, Nagle JW, Goldfarb LG, Vicart P. Respiratory insufficiency in desminopathy patients caused by introduction of proline residues in desmin c-terminal alpha-helical segment. *Muscle Nerve*. 2003;27(6):669–75. doi: 10.1002/mus.10370.
 35. Milner DJ, Weitzer G, Tran D, Bradley A, Capetanaki Y. Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol*. 1996;134(5):1255–70. doi: 10.1083/jcb.134.5.1255.
 36. Steinert PM, Roop DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem*. 1988;57:593–625. doi: 10.1146/annurev.bi.57.070188.003113.
 37. Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:345–82. doi: 10.1146/annurev.bi.63.070194.002021.
 38. Paulin D, Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res*. 2004;301(1):1–7. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.08.004.
 39. McLendon PM, Robbins J. Desmin-related cardiomyopathy: an unfolding story. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(4):H1220–8. doi: 10.1152/ajpheart.00601.2011.
 40. Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12(8):339–48. doi: 10.1016/S1050-1738(02)00184-6.
 41. Price MG. Molecular analysis of intermediate filament cytoskeleton – a putative load-bearing structure. *Am J Physiol*. 1984;246(4 Pt 2):H566–72.
 42. Li Z, Mericskay M, Agbulut O, Butler-Browne G, Carlsson L, Thornell LE, Babinet C, Paulin D. Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *J Cell Biol*. 1997;139(1):129–44. doi: 10.1083/jcb.139.1.129.
 43. Balogh J, Mericskay M, Li Z, Paulin D, Arner A. Hearts from mice lacking desmin have a myopathy with impaired active force generation and unaltered wall compliance. *Cardiovasc Res*. 2002;53(2):439–50. doi: 10.1016/s0008-6363(01)00500-4.
 44. Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J Cell Biol*. 2000;150(6):1283–98. doi: 10.1083/jcb.150.6.1283.
 45. Weisleder N, Taffet GE, Capetanaki Y. Bcl-2 overexpression corrects mitochondrial defects and ameliorates inherited desmin null cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(3):769–74. doi: 10.1073/pnas.0303202101.
 46. Liu J, Tang M, Mestril R, Wang X. Aberrant protein aggregation is essential for a mutant desmin to impair the proteolytic function of the ubiquitin-proteasome system in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40(4):451–4. doi: 10.1016/j.yjmcc.2005.12.011.
 47. Kostera-Pruszczyk A, Pruszczyk P, Kamińska A, Lee H-S, Goldfarb LG. Diversity of cardiomyopathy phenotypes caused by mutations in desmin. *Int J Cardiol*. 2008;131(1):146–7. doi: 10.1016/j.ijcard.2007.08.095.
 48. Capetanaki Y, Papatathanasiou S, Diokmetzidou A, Vatsellas G, Tsikitis M. Desmin related disease: a matter of cell survival failure. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;32:113–20. doi: 10.1016/j.ceb.2015.01.004.
 49. Batonnet-Pichon S, Behin A, Cabet E, Delort F, Vicart P, Lilienbaum A. Myofibrillar Myopathies: New Perspectives from Animal Models to Potential Therapeutic Approaches. *J Neuromuscul Dis*. 2017;4(1):1–15. doi: 10.3233/JND-160203.
 50. Wahbi K, Béhin A, Charron P, Dunand M, Richard P, Meune C, Vicart P, Laforêt P, Stojkovic T, Bécane HM, Kuntzer T, Duboc D. High cardiovascular morbidity and mortality in myofibrillar myopathies due to DES gene mutations: a 10-year longitudinal study. *Neuromuscul Disord*. 2012;22(3):211–8. doi: 10.1016/j.nmd.2011.10.019.
 51. Liebau G. Therapy of dilated cardiomyopathy with digitalis, diuretics and vasodilators. *Herz*. 1985;10(3):138–42. German.
 52. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michel K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW, Antman EM, Smith SC Jr, Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; American College of Chest Physicians; International Society for Heart and Lung Transplantation; Heart Rhythm Society. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 2005;112(12):e154–235. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.167586.
 53. Барт БЯ, Бенеvская ВФ. Дилатационная кардиомиопатия: клиника, диагностика и лечение. *Лечебное дело*. 2005;(1):3–9. [Bart BYa, Benevskaya VF. Dilated cardiomyopathy: clinics, diagnostics, and treatment. 2005;(1):3–9. Russian].
 54. Colucci WS. Use of angiotensin converting enzyme inhibitors in heart failure with reduced ejection fraction [Internet]. Accessed at Sep. 29, 2018. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/use-of-angiotensin-converting-enzyme-inhibitors-in-heart-failure-with-reduced-ejection-fraction>.
 55. Dzau VJ. Tissue renin-angiotensin system in myocardial hypertrophy and failure. *Arch Intern Med*. 1993;153(8):937–42. doi: 10.1001/archinte.1993.00410080011002.
 56. Waagstein F. The role of beta-blockers in dilated cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol*. 1995;10(3):322–31.
 57. Hjalmarson A, Waagstein F. The role of beta-blockers in the treatment of cardiomyopathy and ischaemic heart failure. *Drugs*. 1994;47 Suppl 4:31–9; discussion 39–40. doi: 10.2165/00003495-199400474-00006.
 58. Facchini E, Degiovanni A, Cavallino C, Lupi A, Rognoni A, Bongo AS. Beta-Blockers and Nitrates: Pharmacotherapy and Indications. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2015;13(1):25–30. doi: 10.2174/1871525713666141219114708.
 59. Colucci WS, Lynne SL. Use of digoxin in heart failure with reduced ejection fraction [Internet]. Accessed at Sep. 30, 2018. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/use-of-digoxin-in-heart-failure-with-reduced-ejection-fraction>.
 60. Nguyen VQ, Celebi MM, Suleman A, Sander GE. Dilated Cardiomyopathy Treatment & Management [Internet]. Accessed at Sep. 27, 2018. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/152696>.
 61. Tang WH, Parameswaran AC, Maroo AP, Francis GS. Aldosterone receptor antagonists in the medical management of chronic heart failure. *Mayo Clin Proc*. 2005;80(12):1623–30. doi: 10.4065/80.12.1623.
 62. Kremastinos DT, Farmakis D. Iron overload cardiomyopathy in clinical practice. *Circulation*. 2011;124(20):2253–63. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.050773.
 63. Reardon L, McKenna PJ, Vicellio P. Restrictive Cardiomyopathy Treatment & Management [Internet]. Accessed at Sep. 27, 2018. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/153062>.
 64. Dzau VJ, Liew CC, editors. *Cardiovascular Genetics and Genomics for the Cardiologist*. John Wiley & Sons; 2008. 316 p.
 65. Bott-Silverman C, Aksut B. Dilated and Restrictive Cardiomyopathies [Internet]. Accessed at Sep. 27, 2018. Available from: <http://www.clevelandcliniced.com/medicalpubs/disease-management/cardiology/dilated-restrictive-cardiomyopathy>.



66. Linde C. Heart. Implantable cardioverter-defibrillator treatment and resynchronization in heart failure. 2004;90(2):231–4. doi: 10.1136/hrt.2003.019695.
67. Bristow MR, Saxon LA, Boehmer J, Krueger S, Kass DA, De Marco T, Carson P, DiCarlo L, DeMets D, White BG, DeVries DW, Feldman AM; Comparison of Medical Therapy, Pacing, and Defibrillation in Heart Failure (COMPANION) Investigators. Cardiac-resynchronization therapy with or without an implantable defibrillator in advanced chronic heart failure. *N Engl J Med.* 2004;350(21):2140–50. doi: 10.1056/NEJMoa032423.
68. Van Bommel RJ, Mollema SA, Borleffs CJ, Bertini M, Ypenburg C, Marsan NA, Delgado V, Van Der Wall EE, Schalij MJ, Bax JJ. Impaired renal function is associated with echocardiographic nonresponse and poor prognosis after cardiac resynchronization therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(5):549–55. doi: 10.1016/j.jacc.2010.06.060.
69. Moss AJ, Hall WJ, Cannom DS, Klein H, Brown MW, Daubert JP, Estes NA 3rd, Foster E, Greenberg H, Higgins SL, Pfeffer MA, Solomon SD, Wilber D, Zareba W; MADIT-CRT Trial Investigators. Cardiac-resynchronization therapy for the prevention of heart-failure events. *N Engl J Med.* 2009;361(14):1329–38. doi: 10.1056/NEJMoa0906431.
70. Yue Y, Binalsheikh IM, Leach SB, Domeier TL, Duan D. Prospect of gene therapy for cardiomyopathy in hereditary muscular dystrophy. *Expert Opin Orphan Drugs.* 2016;4(2):169–83. doi: 10.1517/21678707.2016.1124039
71. Lai Y, Yue Y, Liu M, Ghosh A, Engelhardt JF, Chamberlain JS, Duan D. Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Nat Biotechnol.* 2005;23(11):1435–9. doi: 10.1038/nbt1153.
72. Ghosh A, Yue Y, Lai Y, Duan D. A hybrid vector system expands adeno-associated viral vector packaging capacity in a transgene independent manner. *Mol Ther.* 2008;16(1):124–30. doi: 10.1038/sj.mt.6300322.
73. Bostick B, Shin JH, Yue Y, Duan D. AAV-microdystrophin therapy improves cardiac performance in aged female mdx mice. *Mol Ther.* 2011;19(10):1826–32. doi: 10.1038/mt.2011.154.
74. Bostick B, Shin JH, Yue Y, Wasala NB, Lai Y, Duan D. AAV micro-dystrophin gene therapy alleviates stress-induced cardiac death but not myocardial fibrosis in >21-m-old mdx mice, an end-stage model of Duchenne muscular dystrophy cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53(2):217–22. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.05.002.
75. Bostick B, Yue Y, Lai Y, Long C, Li D, Duan D. Adeno-associated virus serotype-9 microdystrophin gene therapy ameliorates electrocardiographic abnormalities in mdx mice. *Hum Gene Ther.* 2008;19(8):851–6. doi: 10.1089/hum.2008.058.
76. Shin JH, Bostick B, Yue Y, Hajjar R, Duan D. SERCA2a gene transfer improves electrocardiographic performance in aged mdx mice. *J Transl Med.* 2011;9:132. doi: 10.1186/1479-5876-9-132.
77. Hikoso S, Ikeda Y, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hirotsu S, Kashiwase K, Yamada M, Asahi M, Matsumura Y, Nishida K, Matsuzaki M, Hori M, Otsu K. Progression of heart failure was suppressed by inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 via transcortical gene transfer. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(5):453–62. doi: 10.1016/j.jacc.2007.03.053.
78. Qiao C, Wang CH, Zhao C, Lu P, Awano H, Xiao B, Li J, Yuan Z, Dai Y, Martin CB, Li J, Lu Q, Xiao X. Muscle and heart function restoration in a limb girdle muscular dystrophy 2I (LGMD2I) mouse model by systemic FKRP gene delivery. *Mol Ther.* 2014;22(11):1890–9. doi: 10.1038/mt.2014.141.
79. Cannavo A, Komici K, Bencivenga L, D'Amico ML, Gambino G, Liccardo D, Ferrara N, Rengo G. GRK2 as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin Ther Targets.* 2018;22(1):75–83. doi: 10.1080/14728222.2018.1406925.
80. Rengo G, Lymperopoulos A, Zincarelli C, Donniacuo M, Soltys S, Rabinowitz JE, Koch WJ. Myocardial adeno-associated virus serotype 6-betaARKct gene therapy improves cardiac function and normalizes the neurohormonal axis in chronic heart failure. *Circulation.* 2009;119(1):89–98. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.803999.
81. Raake PW, Schlegel P, Ksienzyk J, Reinkober J, Barthelme J, Schinkel S, Pleger S, Mier W, Haberkorn U, Koch WJ, Katus HA, Most P, Müller OJ. AAV6-betaARKct cardiac gene therapy ameliorates cardiac function and normalizes the catecholaminergic axis in a clinically relevant large animal heart failure model. *Eur Heart J.* 2013;34(19):1437–47. doi: 10.1093/eurheartj/ehr447.
82. Williams ML, Hata JA, Schroder J, Rampeaud E, Petrofski J, Jakoi A, Milano CA, Koch WJ. Targeted beta-adrenergic receptor kinase (betaARK1) inhibition by gene transfer in failing human hearts. *Circulation.* 2004;109(13):1590–3. doi: 10.1161/01.CIR.0000125521.40985.28.
83. Kawada T, Nakazawa M, Toyo-Oka T. Somatic gene therapy of dilated cardiomyopathy. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2002;119(1):37–44. Japanese. doi: 10.1254/fj.119.37.
84. Most P, Pleger ST, Völkers M, Heidt B, Boerries M, Weichenhan D, Löffler E, Janssen PM, Eckhart AD, Martini J, Williams ML, Katus HA, Remppis A, Koch WJ. Cardiac adenoviral S100A1 gene delivery rescues failing myocardium. *J Clin Invest.* 2004;114(11):1550–63. doi: 10.1172/JCI21454.
85. Pleger ST, Shan C, Ksienzyk J, Bekeredjian R, Boekstegers P, Hinkel R, Schinkel S, Leuchs B, Ludwig J, Qiu G, Weber C, Raake P, Koch WJ, Katus HA, Müller OJ, Most P. Cardiac AAV9-S100A1 gene therapy rescues post-ischemic heart failure in a preclinical large animal model. *Sci Transl Med.* 2011;3(92):92ra64. doi: 10.1126/scitranslmed.3002097.
86. Watanabe S, Ishikawa K, Fish K, Oh JG, Motloch LJ, Kohlbrenner E, Lee P, Xie C, Lee A, Liang L, Kho C, Leonardson L, McIntyre M, Wilson S, Samulski RJ, Kranias EG, Weber T, Akar FG, Hajjar RJ. Protein Phosphatase Inhibitor-1 Gene Therapy in a Swine Model of Nonischemic Heart Failure. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(14):1744–56. doi: 10.1016/j.jacc.2017.08.013.
87. Mearini G, Stimpel D, Geertz B, Weinberger F, Krämer E, Schlossarek S, Mourou-Filiatre J, Stoehr A, Dutsch A, Wijnker PJ, Braren I, Katus HA, Müller OJ, Voit T, Eschenhagen T, Carrier L. Mybpc3 gene therapy for neonatal cardiomyopathy enables long-term disease prevention in mice. *Nat Commun.* 2014;5:5515. doi: 10.1038/ncomms6515.
88. del Monte F, Williams E, Lebeche D, Schmidt U, Rosenzweig A, Gwathmey JK, Lewandowski ED, Hajjar RJ. Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in a rat model of heart failure. *Circulation.* 2001;104(12):1424–9.
89. del Monte F, Lebeche D, Guerrero JL, Tsuji T, Doye AA, Gwathmey JK, Hajjar RJ. Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(15):5622–7. doi: 10.1073/pnas.0305778101.
90. Peña JR, Szkudlarek AC, Warren CM, Heinrich LS, Gaffin RD, Jagatheesan G, del Monte F, Hajjar RJ, Goldspink PH, Solaro RJ, Wiecek DF, Wolska BM. Neonatal gene transfer of Serca2a delays onset of hypertrophic remodeling and improves function in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(6):993–1002. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.09.010.
91. Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, Bowles NE, Towbin JA. Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2000;106(5):655–62. doi: 10.1172/JCI9224.
92. Goehring C, Rutschow D, Bauer R, Schinkel S, Weichenhan D, Bekeredjian R, Straub V, Kleinschmidt JA, Katus HA, Müller OJ. Prevention of cardiomyopathy in delta-sarcoglycan knockout mice after systemic transfer of targeted adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc Res.* 2009;82(3):404–10. doi: 10.1093/cvr/cvp061.
93. He B, Tang RH, Weisleder N, Xiao B, Yuan Z, Cai C, Zhu H, Lin P, Qiao C, Li J, Mayer C, Li J, Ma J, Xiao X. Enhancing muscle membrane repair by gene delivery of MG53 ameliorates muscular dystrophy and heart failure in delta-Sarcoglycan-deficient hamsters. *Mol Ther.* 2012;20(4):727–35. doi: 10.1038/mt.2012.5.
94. Prondzynski M, Mearini G, Carrier L. Gene therapy strategies in the treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Pflugers Arch.* 2019;471(5):807–15. doi: 10.1007/s00424-018-2173-5.
95. Heckmann MB, Bauer R, Jungmann A, Winter L, Rapti K, Strucksberg KH, Clemen CS, Li Z, Schröder R, Katus HA, Müller OJ. AAV9-mediated gene transfer of desmin ameliorates cardiomyopathy in desmin-deficient mice. *Gene Ther.* 2016;23(8-9):673–9. doi: 10.1038/gt.2016.40.



96. Pattison JS, Osinska H, Robbins J. Atg7 induces basal autophagy and rescues autophagic deficiency in CryABR120G cardiomyocytes. *Circ Res.* 2011;109(2):151–60. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.237339.
97. Maloyan A, Sayegh J, Osinska H, Chua BH, Robbins J. Manipulation of death pathways in desmin-related cardiomyopathy. *Circ Res.* 2010;106(9):1524–32. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.212639.
98. Wang X, Klevitsky R, Huang W, Glasford J, Li F, Robbins J. AlphaB-crystallin modulates protein aggregation of abnormal desmin. *Circ Res.* 2003;93(10):998–1005. doi: 10.1161/01.RES.0000102401.77712.ED.
99. Sanbe A, Daicho T, Mizutani R, Endo T, Miyauchi N, Yamauchi J, Tanonaka K, Glabe C, Tanoue A. Protective effect of geranylgeranylacetone via enhancement of HSPB8 induction in desmin-related cardiomyopathy. *PLoS One.* 2009;4(4):e5351. doi: 10.1371/journal.pone.0005351.
100. Karakikes I, Stillitano F, Nonnenmacher M, Tzimas C, Sanoudou D, Termglinchan V, Kong CW, Rushing S, Hansen J, Ceholski D, Kolokathis F, Kremastinos D, Katoulis A, Ren L, Cohen N, Gho JMIH, Tsiapras D, Vink A, Wu JC, Asselbergs FW, Li RA, Hulot JS, Kranias EG, Hajjar RJ. Correction of human phospholamban R14del mutation associated with cardiomyopathy using targeted nucleases and combination therapy. *Nat Commun.* 2015;6:6955. doi: 10.1038/ncomms7955.
101. Jiang J, Wakimoto H, Seidman JG, Seidman CE. Allele-specific silencing of mutant Myh6 transcripts in mice suppresses hypertrophic cardiomyopathy. *Science.* 2013;342(6154):111–4. doi: 10.1126/science.1236921.
102. McLaughlin HM, Kelly MA, Hawley PP, Darvas BT, Funke B, Picker J. Compound heterozygosity of predicted loss-of-function DES variants in a family with recessive desminopathy. *BMC Med Genet.* 2013;14:68. doi: 10.1186/1471-2350-14-68.

Cardiomyopathies associated with the *DES* gene mutations: molecular pathogenesis and gene therapy approaches

K.S. Kochergin-Nikitsky¹ • E.V. Zaklyazminskaya^{2,3} • A.V. Lavrov^{1,3} • S.A. Smirnikhina¹

Cardiomyopathy (CMP) is a common group of cardiovascular disorders. Genetic (primary) cardiomyopathies are related to abnormalities in more than 100 genes, including the *DES* gene encoding desmin protein. Desmin is an essential member of the intermediate filaments, ensuring the structural and functional integrity of myocytes. Mutations in the *DES* gene result in desmin-related cardiomyopathy with progressive course and poor prognosis. By now, specific therapy for cardiomyopathy has not been developed. Existing conservative and surgical treatment modalities target the rate of heart failure progression and sudden cardiac death prevention but have limited efficacy. The development of gene therapy and genome editing could allow for creating effective and specific methods of gene-based therapy for desminopathies. A number of studies have been published on the use of gene therapy for various genetic cardiomyopathies including those caused by the *DES* gene mutations, while genome editing has not been used yet. However, promising results have been obtained with CRISPR/Cas9 and TALEN editing systems to correct for “gain-of-function

mutations” in some other genes, such as *MYBPC3* and *PLN*. There is also evidence of the possibility to reduce the symptoms of desmin-related cardiomyopathy up to the normal function by knocking out the mutant *DES* allele, and preserved protein function provided by expression of the normal allele. We believe that genome editing approaches have an open perspective into the development of specific and effective methods to treat desminopathies.

Key words: cardiomyopathy, desmin, desminopathy, medical genetics, gene therapy, genome editing, CRISPR/Cas9

For citation: Kochergin-Nikitsky KS, Zaklyazminskaya EV, Lavrov AV, Smirnikhina SA. Cardiomyopathies associated with the *DES* gene mutations: molecular pathogenesis and gene therapy approaches. *Almanac of Clinical Medicine.* 2019;47(7):603–13. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-025.

Received 29 May 2019; accepted 18 July 2019; published online 9 July 2019

Funding

The study was partially supported by the Russian Science Foundation, grant No 16-15-10421. The results of parts “Gene therapy based approaches in desmin-related cardiomyopathies” and “Genome editing in desmin-related cardiomyopathies” were obtained within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Authors' contributions

All the authors have contributed significantly to the literature analysis and manuscript preparation, have read and approved its final version before the publication.

Konstantin S. Kochergin-Nikitsky – PhD (in Biol.), Senior Research Fellow, Laboratory of Mutagenesis¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0096-4542>.

✉ 19/4–424 Novoyasenevskiy prospekt, Moscow, 117593, Russian Federation. Tel.: +7 (977) 830 94 95. E-mail: KochNik.KS@gmail.com

Elena V. Zaklyazminskaya – MD, PhD, Head of Laboratory of Medical Genetics²; Associate Professor, Department of Cell Biology and Molecular Genetics, Medical-Biological Faculty³; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6244-9546>. E-mail: helenezak@gmail.com

Alexander V. Lavrov – MD, PhD, Leading Research Fellow, Laboratory of Genome Editing¹; Associate Professor, Department of Cell Biology and Molecular Genetics, Medical-Biological Faculty³; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4962-6947>. E-mail: alexandervlavrov@gmail.com

Svetlana A. Smirnikhina – MD, PhD, Head of the Laboratory of Genome Editing¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1558-3048>. E-mail: smirnikhinas@gmail.com

¹ Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e ul., Moscow, 115522, Russian Federation

² Petrovsky National Research Center of Surgery; 2 Abrikosovskiy pereulok, Moscow, 119991, Russian Federation

³ Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU); 1 Ostrovityanova ul., Moscow, 117997, Russian Federation



Invited article

Prevention of epileptogenesis as a future strategy for the treatment of epilepsy

A. Bragin¹

Epilepsy affects more than 70 million people worldwide. From 30 to 40% of the patients are resistant to existing medication. This paper describes the current state of the treatment of epilepsy and proposes a future approach to preventative treatment at earlier stages of epileptogenesis. For preventative treatment biomarkers are needed that predict the development of epilepsy at its earlier stages. Pathological high frequency oscillations are the only acceptable biomarker of epileptogenesis. However, the main limitation of this biomarker is the necessity of implanting of recording

electrodes. The search for noninvasive biomarkers of epileptogenesis is one of the hot topics in epilepsy research. There are two potentially interesting directions in this area: search for inflammatory biomarkers in the peripheral blood and analysis of different parameters of imaging methods. In this paper we present approaches for identification of potential epileptogenesis biomarkers by magnetic resonance imaging. Some of magnetic resonance imaging parameters correlate with the existence of pathological high frequency oscillations, may indirectly reflect ongoing

inflammation process in the brain and be potential biomarkers of epileptogenesis.

Key words: epilepsy, pathological high frequency oscillations, biomarkers of epileptogenesis, preventative treatment

For citation: Bragin A. Prevention of epileptogenesis as a future strategy for the treatment of epilepsy. *Almanac of Clinical Medicine*. 2019;47(7):614–22. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-028.

Received 19 June 2019; accepted 24 June 2019; published online 9 July 2019

Epilepsy from epileptic neurons to the multifactorial disease

Each year in the U.S. approximately 150,000 people develop epilepsy [1–3]. In spite of tremendous success in our understanding of its neuronal and molecular mechanisms, from 30 to 40% of patients with epilepsy are resistant to current medical treatments [4–7]. Pharmacoresistant epilepsy is a major health burden worldwide [8, 9]. Within the last 30 years more than 20 new antiepileptic drugs have been introduced to the clinic, however, to the big disappointment of scientists and clinicians the success in the treatment of patients with epilepsy increased only by 2–3% [10–13].

The overarching hypothesis in electrophysiology during the last century was that the epileptic brain consists of a certain number of epileptic neurons with altered properties of receptors and ion channels. A countless number of experiments and publications were in line with this hypothesis, and altered properties of many receptors and channels were discovered in epileptic brain. All new antiepileptic drugs were designed based on these data targeting one or another channel or receptor with the hope that it would stop seizures. The low effectiveness of all new antiepileptic drugs indicated that altered properties at the molecular level are only a part of problems in the epileptic brain. One of the reasons for the low efficiency of the

Anatol Bragin – PhD, DSci, Department of Neurology¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1207-8481>
✉ 710 Westwood Plaza, Los Angeles, CA, 90095, USA.
E-mail: abragin@mednet.ucla.edu

old and new antiepileptic drugs was the expectation that we could control seizure activity by modifying the activity of a certain “magic” channels or receptors. In reality, the deeper we investigate mechanisms of epilepsy, the more we see the complicated nature of the disease. The second issue, complicating the process of epilepsy treatment, was lack of understanding that by the time a patient was visiting a doctor and reporting that he/she had had a seizure, the patient’s brain had undergone a long complicated process of restructuring of brain circuitry prone to generate seizure activity and involving abnormalities in multiple channels and receptors both in neuronal and non-neuronal cells.

The current understanding is symbolized by the recognition that the epileptic brain is associated not only with the existence of neurons with altered membrane properties, but also with altered connections between them. Slowly this notion was transformed into recognition of the concept that epilepsy is a disease of neuronal networks.

Currently it is clear that epilepsy is a multifactorial disorder, involving formation of distributed neuronal networks [14–17], chronic inflammation [18–21], and the existence of a spectrum of psychological problems, such as anxiety, depression and cognitive impairment [22].

¹David Geffen Medical School at University of California, Los Angeles; 710 Westwood Plaza, Los Angeles, CA, 90095, USA



Cognitive performance such as learning, memory and decision making depends on the coordinated activity of multiple brain areas, where hippocampus and prefrontal cortex play key roles [23–25]. These brain areas are also part of distributed neural systems underlying anxiety, emotion and motivation [26].

There is a growing need to understand the role of inflammation during epileptogenesis, but so far no reliable inflammatory biomarker of epileptogenesis has been found in animal models [18, 27, 28]. The Magnetic Resonance Imaging (MRI) approach may help to test inflammatory processes noninvasively and has a great potential as a biomarker of epileptogenesis. Several groups are using functional MRI (fMRI) to study the blood oxygen level dependent (BOLD) signal and changes in microstructure of brain areas under different experimental conditions [29–35]. According to some publications, fMRI and Diffusion Tensor Imaging (DTI) are promising indirect measures of inflammation processes and gliosis [36–38]. Although, fMRI does not directly reflect the level of inflammation, functional connectivity between brain areas, such as striatum and prefrontal cortex, decreases when the level of inflammation increases [39]. One of the DTI parameters, fractional anisotropy (FA), has been shown to correlate with the level of inflammation [40–42], as well as microstructural integrity [40]. FA values both increase and decrease after traumatic brain injury (TBI) [43–45]. In patients with stroke FA values may be useful for prediction of cognitive functional outcomes [46] and can predict recovery of motor function after a stroke during the early subacute phase [47].

The combination of electrographic and imaging methods allows for identification of brain areas, where changes in metabolism and blood flow are associated with the formation of pathological neuronal networks. There is good correspondence between networks detected by electrographic and imaging methods [17, 48–50].

One of the ways to reduce the health burden of epilepsy is to prevent its development after specific epileptogenic insults. There are two key elements critical to the development of preventative therapy: 1) a full understanding of the mechanisms of epileptogenesis and 2) the existence of clinically useful noninvasive biomarkers of epileptogenesis.

It is not clear whether all above mentioned changes at multiple levels observed in patients with epilepsy are related to seizure activity or whether they occur earlier and are long-lasting consequences of an initial brain injury which is invisible without special diagnostic tests that predict later epilepsy. Recognition of this in animal models of chronic epilepsy will allow investigation of their initial mechanisms and discover new targets

for prevention of epileptogenesis, as well as behavioral candidates. A combination of electrophysiological, imaging and behavioral biomarkers could provide better diagnosis, better specificity and sensitivity for detection of the ongoing process of epileptogenesis.

It is likely that a profile of biomarkers will be required for most clinical applications in addition to electroencephalogram (EEG) [51], which will improve the accuracy of epilepsy prediction [52–57]. Compared to electrophysiological methods, MRI has higher spatial resolution and provides valuable contrasting of grey and white matter. Functional MRI and DTI can detect various progressive abnormalities after a brain injury in multiple brain areas [54, 58, 59]. There is a strong coherence between functional connectivity estimated by fMRI signal and changes in the FA map, as well as in structural connectivity estimated by DTI [60]. In addition, changes in the BOLD signal correlate with the energy of smoothed high frequency broadband signals recorded in electrophysiological experiments [61–63].

It is conceptually important to consider that, within the brain framework, there is an interconnectedness between different levels of brain activity, and a complex system where all levels interact with each other to generate emergent behaviors that can be reflected in specific functions, such as an EEG pattern, a metabolic process (as measured by fMRI), or a pathological phenotype [64].

Considering multifactorial nature of epileptogenesis, it is tempting to find noninvasive biomarkers of epileptogenesis. It is crucial for designing of future clinical trials for prevention of epileptogenesis; recognizing this, the U.S. National Institutes of Health (NIH) several years ago began funding an international project for prevention of epileptogenesis, which involves multiple hospitals and laboratories from the USA, Finland and Australia (<https://epibios.loni.usc.edu>). This is a unique translational project, which is aimed to develop the first validated multimodal biomarker panel for preclinical and clinical anti-epileptogenesis trials.

Pathological high frequency oscillations as a bridge for identification of noninvasive biomarkers of epileptogenesis

This section will provide a short description of published and preliminary results of how the research team at the UCLA Seizure Disorder Center is trying to find biomarkers of epileptogenesis. The experiments described here are performed in conjunction with ongoing research of the EpiBios4Rx project.

Pathological high frequency oscillations and epilepsy
In 1999 our laboratory discovered the existence of pathological high frequency oscillations (pHFOs) in

the frequency range 250–500 Hz in the epileptic brain (Fig. 1) [65–67]. These oscillations were observed in epileptic animals, as well as in patients with temporal lobe epilepsy. We have shown that these oscillations are generated by local clusters of pathologically interconnected neurons (PIN-clusters) and reflect hypersynchronous bursts of population spikes generated predominantly by principal cells [68, 69]. Later these data were confirmed in other laboratories in different types of epilepsy [70–75]. It was shown that pHFOs were associated with seizure onset zone, and complete surgical removal of brain areas generating pHFOs was followed by a complete disappearance of seizures [76–78]. Currently this approach is used for pre-surgical localization of seizure onset zone in many hospitals in the USA, Canada and Europe.

Analysis of time of pHFOs occurrence after status epilepticus and traumatic brain injury showed that pHFOs occurred much earlier than recurrent spontaneous seizures; their occurrence after a brain injury allows for prediction which animals would later develop and would not develop epilepsy [79, 80]. We hypothesized that the process of epileptogenesis was associated with the formation of the network of PIN-clusters [14, 68]. Clinical seizures occur when motor areas are involved in this PIN-clusters network (Fig. 2). So far pHFOs are the only acceptable biomarker of epileptogenesis. However, the primary limitation of this biomarker is that it requires invasive recordings of brain activity, which excludes it from being a potential diagnostic tool. There is a need for noninvasive biomarkers for easy identification of epileptogenesis and preventative treatment. Noninvasive imaging biomarkers would have a much greater translational value.

Spatial and temporal distribution of high frequency oscillations during epileptogenesis after status epilepticus and TBI

Recently, we found that epileptogenesis after TBI has electrographic characteristics similar to those in pilocarpine and kainic acid (KA) status epilepticus models [80]. As in the KA model [81], the occurrence of pHFOs within the first two weeks after TBI is a biomarker of epileptogenesis [80]. These pHFOs appeared in the group of animals that later developed epilepsy, and they occurred within the TBI core or perilesional area, which then propagated to other neighboring areas. We described that after TBI, in the group that later developed epilepsy, pHFOs occurred independently, as well as in association with spindle oscillations. They were nested in the troughs of spindle oscillations (Fig. 3) and associated with hypersynchronized discharges of multiunit activity (Fig. 3B and C). In these TBI experiments, only in rats that later developed epilepsy, an increase of normal

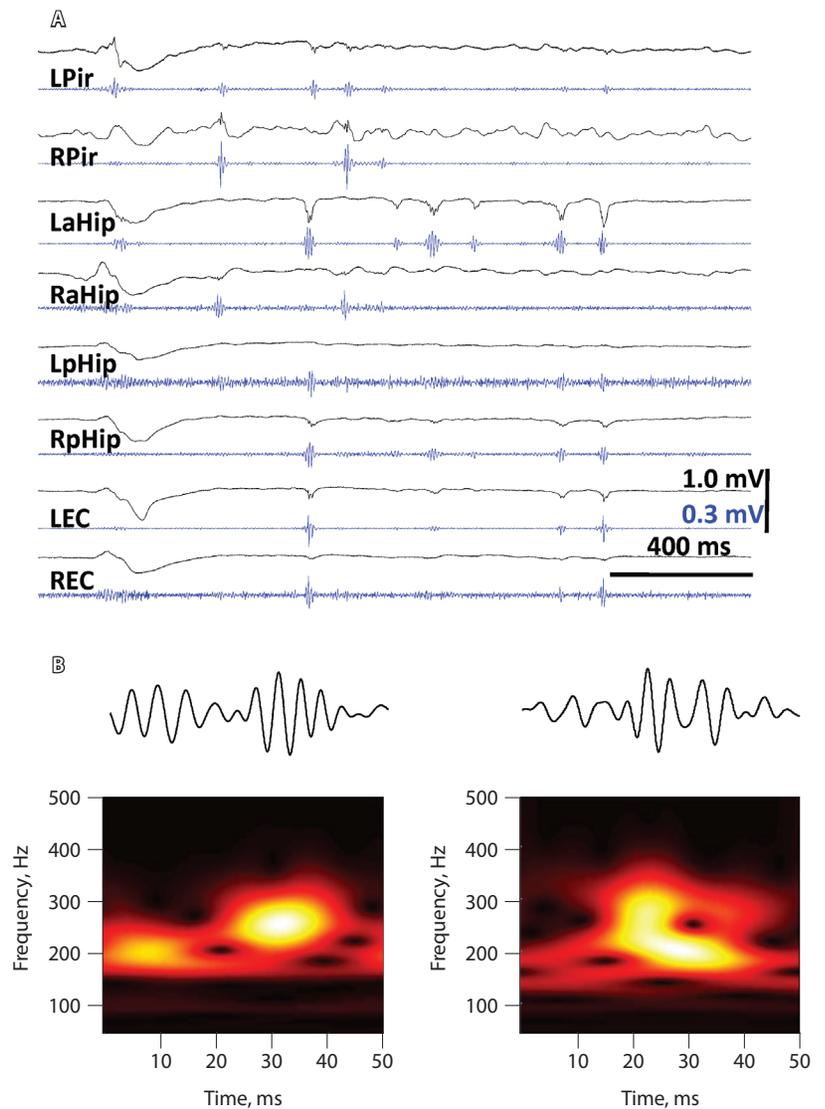


Fig. 1. Pathological high frequency oscillations in an epileptic rat. **A.** Example raw (black) and band pass (100–500 Hz) filtered data (blue) during the inter-ictal period recorded from various brain areas. **B.** Extended examples of pathological high frequency oscillations (top) and their time frequency plots (bottom); L left, R right, a anterior, p posterior, Pir piriform cortex, Hip hippocampus, EC entorhinal cortex

high frequency oscillations rate was observed in multiple brain areas, as was the occurrence of pHFOs. The occurrence of pHFOs outside of the lesioned hippocampus and outside of the TBI area supports the hypothesis of the formation of a PIN-cluster network during epileptogenesis [14, 68]. These PIN-clusters generate pHFOs, as a result of the hypersynchronization of neuronal discharges forming population spikes, maintain fast propagation of epileptiform activity and trigger seizures.

Correlation between pHFOs, PIN-cluster network formation and changes in other modalities of brain function and structure, such as alterations of intrinsic functional brain connectivity, malformation of local

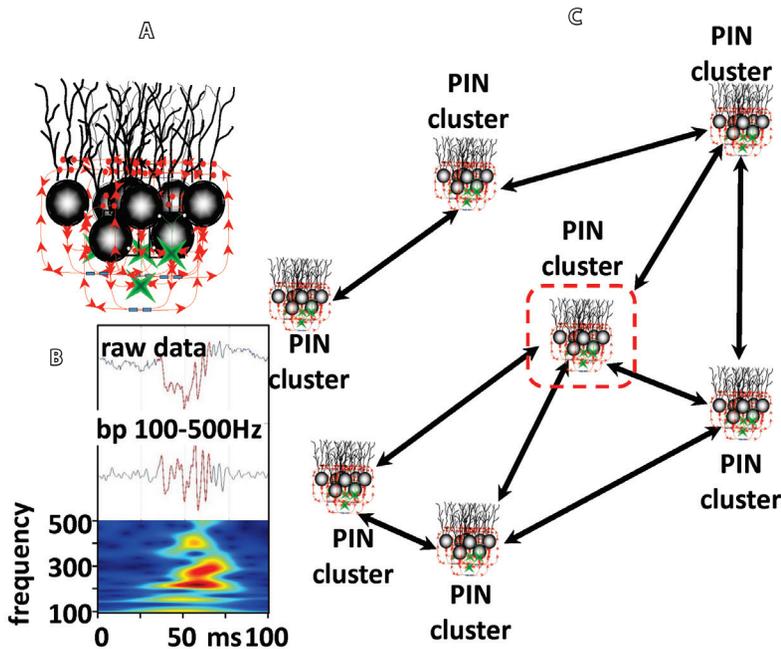


Fig. 2. A schematic presentation of a PIN-cluster (A). Grey, principal cells; green, interneurons. Red lines are abnormal connections between neurons with a PIN-cluster. B, examples of raw (top) band pass filtered (middle) and time frequency plot (bottom) of pathological high frequency oscillation. C, a schematic presentation of a PIN-cluster network. Dashed box is a lesion area

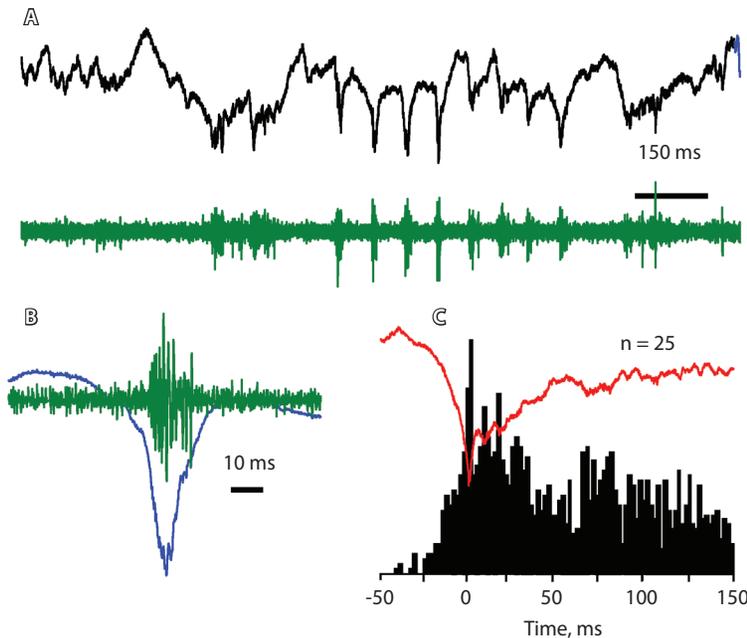


Fig. 3. Coupling of high frequency oscillations and hypersynchronized multiunit discharges with spindle activity in perilesional area 10 days after traumatic brain injury in the rat that later developed epilepsy. A, An example of single spindle oscillation. Black, raw data; green, band pass (100–500 Hz) filtered signal indicating high frequency oscillation activity. B, An example of a single spindle wave. C, Perievent histogram triggered by the 1st spindle event showing hypersynchronization of multiunit discharges with spindle events

structure assemblies and reorganization of large-scale fiber track networks is a major challenge, because they may not be linear [64]. However, studies of such correlative connections should help to build bridges between different levels of brain activity in pathological conditions, such as epilepsy.

Currently the pathophysiology of epileptogenesis has been studied with electrographic methods; however these electrical patterns reflect multiple functional and structural disturbances that might be measured by MRI. Imaging methods have the capability to reveal 3D networks in the brain, while electrographic methods have high temporal, but limited spatial resolution.

fMRI – electrographic correlates of epileptogenesis
At present, the preliminary data on fMRI experiments pertain only to the KA-model of chronic epilepsy. This series of experiments was carried out in 11 rats. In all of these rats baseline fMRI data collection was performed one week before KA and the second fMRI screening was performed 10 days after the KA injection. Immediately after the second MRI, microelectrodes were implanted bilaterally in 8 brain regions: left (L) and right (R) anterior cingulate (LAC and RAC), prelimbic (LPC and RPC), motor cortex (LMC and RMC), thalamus (LTh and RTh) and hippocampus (LHP and RHP). Within this group valuable data were obtained from 9 rats; all of them became epileptic within 2–4 months. The baseline BOLD signal functional connectivity (FC) between LAC/RAC, LPC/RPC, LMC/RMC, LTL/RTL, anterior and posterior hippocampi (combined DG&CA1 signals) was compared before and 10 days after the KA injection. In epileptic rats, we observed a decline of FC between certain brain areas (Fig. 4A) [$p < 0.0001$] and an increase of FC within brain areas (the data values are not shown). Three days after the second fMRI scan, electrographic FC for the same brain areas was assessed on the basis of high gamma frequency band (HGFB), as described in several publications [61–63]. Similar to BOLD signal FC, the HGFB FC showed a concordant decrease between multiple brain areas (Fig. 4B) [$p = 0.011$].

The agreement between the different measures of FC indicates that despite the recording of fMRI and electrographic signals 3 days apart, similar changes in FC were measured. This indicates the existence of consistent changes in the epileptic brain that promote (or maintain) the process of epileptogenesis. Comparing the correlation between BOLD and HGFB functional connectivity we found that during epileptogenesis there was an increase in BOLD-electrographic coupling (Fig. 5A vs B), associated with increased synchrony of multiunit discharges during HGFB events (Fig. 5C vs D).

DTI correlates of epileptogenesis

Our analysis of in-vivo DTI data in 9 TBI rats showed both increases and decreases in FA values 2 weeks after TBI in different brain areas. However, in the major specific areas of interest (the hippocampus, prefrontal cortex and thalamus ipsilateral to TBI) FA was significantly increased in the hippocampus (Fig. 6A), but not in the prefrontal cortex and thalamus, compared to those in the sham-injured control. At the individual level, FA values both increased and decreased in different rats (Fig. 6B). Electrophysiological evaluation of these rats is still in progress and we predict that similar to the KA model, those rats in which FA was not changed significantly (Fig. 6B, black lines), will belong to the group with no subsequent epilepsy, while those with increased FA (Fig. 6B, green lines) will belong to the group that later develop epilepsy.

Behavioral correlates of epileptogenesis

These experiments were performed in 5 rats using the water-cheeseboard maze (WCBM) test (Fig. 7A). Two days before the behavioral experiments the rats were placed on the WCBM table, where all wells were filled with water, twice for 30 minutes to make them familiar with the WCBM environment.

After two days of water deprivation, the learning process experiments began, where only 4 wells were filled with water. The rats were placed in the starting box, the door was opened, and the rats were allowed to search for a well with a water. After finding all of them, the rats were returned to the start box and the procedure was repeated 10 times. The next day the procedures were repeated. All data were recorded and analyzed with “AnyMaze” software. In this task, we analyzed the level of anxiety, which was measured by the time required for the rat go from the start box to the first well with the water (Fig. 7. Time 1). The quality of cognitive performance (memory score) was estimated by the quality of remembering the spatial location of the remaining 3 water wells. It was estimated by measuring the time required for the rat to reach each of them, as well as by measuring the length of the path it took to reach each well and the time (Time 2 + Time 3 + Time 4). The memory score (MS) was calculated by the formula: $MS = (1 - t_{-i}/t_b) \times 100$, where t_{-i} is the time taken to complete the first task on the second experimental day and t_b is the time taken to complete the last task on the first day.

During the test at the end of the second week after the KA injection there was an increase in anxiety in 3 rats and in 2 rats the anxiety level was lower than baseline (Fig. 7, B, orange bars). The same rats that demonstrated higher anxiety, showed poor performance during the memory test (Fig. 7, B, green bars). The behavioral abnormalities in these 3 rats were associated with the occurrence

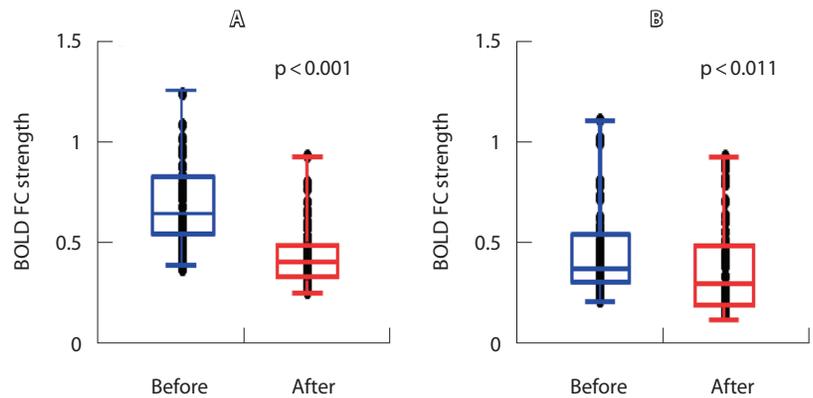


Fig. 4. Changes in functional connectivity before (blue) and after (red) kainic acid injection in E+ group measured by blood oxygen level dependent signal (A) and by HGFB (B). Dots represent each individual rat

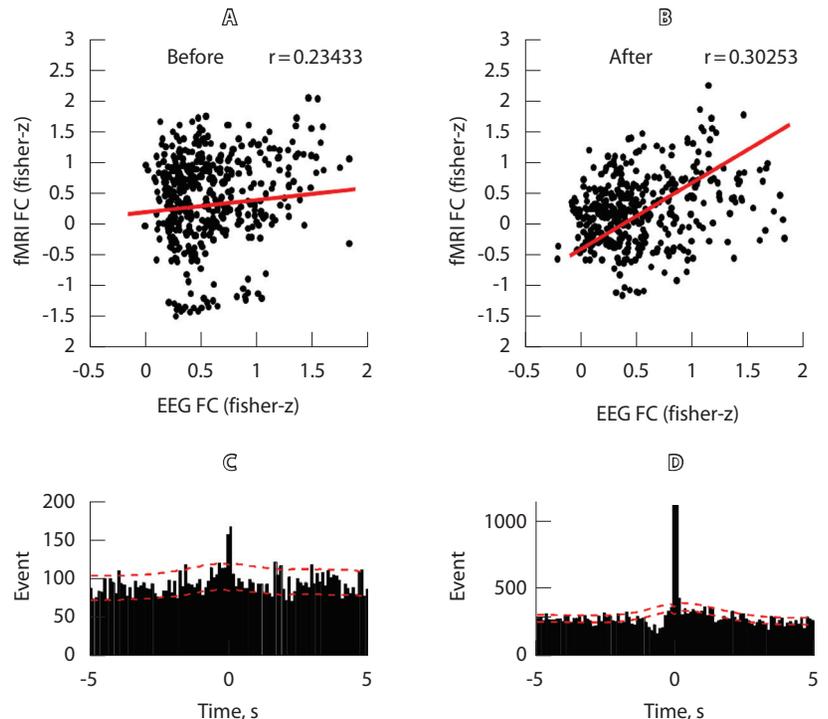


Fig. 5. A–B. Increased coupling between functional magnetic resonance imaging and HGFB functional connectivity during epileptogenesis. Synchrony of multiunit discharges during smoothed gamma events at baseline (C) and during epileptogenesis (D)

of pHFOs in the hippocampus and prefrontal cortex and the occurrence of spindles in the prefrontal cortex triggered by hippocampal pHFOs and later the occurrence of seizures within a 6 month period (data not shown).

Summary

The presented evidence indicates at the neuronal level that epileptogenesis is characterized by the appearance of distributed networks of pHFO generating neuronal

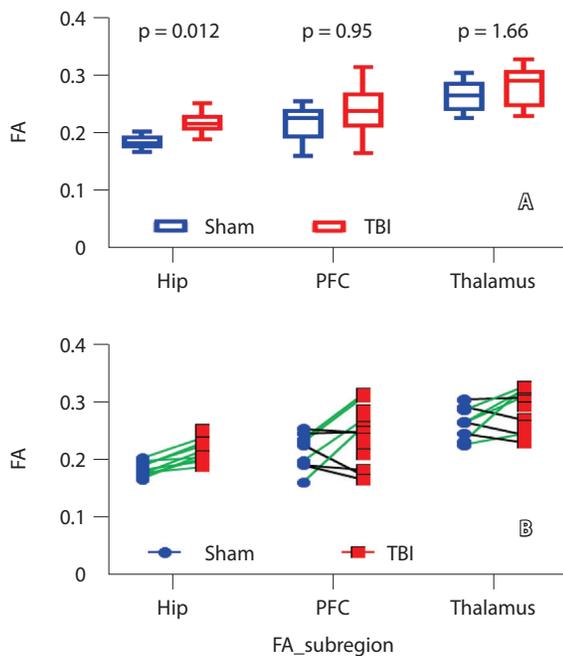


Fig. 6. Changes in fractional anisotropy (FA) values after traumatic brain injury (TBI) in three different brain areas. **A.** Average FA values in hippocampus (Hip), prefrontal cortex (PFC) and thalamus with standard deviation, and *p* values on the top. **B.** FA values in the same areas from individual 9 rats of the sham group (blue) and 9 rats of the TBI group (red)

clusters. These PIN clusters initially appear in the KA or TBI perilesional areas and spread towards other brain areas. Our data also illustrate that functional connectivity between different brain areas estimated by BOLD signals, as well as by electrographic signals (HGFB signal), decreases within the first two weeks after TBI in the group that later developed epilepsy, and that during epileptogenesis the coupling between BOLD and HGFB signals increases. In these preliminary experiments, we also found that FA value in some brain areas is increased in the animals that later developed epilepsy. We provide preliminary evidence that during epileptogenesis the brain undergoes consistent changes detectable by

Additional information

Funding

This study was supported by National Institutes of Health (NIH) grant NS065877.

References

1. Kaiboriboon K, Bakaki PM, Lhatoo SD, Koroukian S. Incidence and prevalence of treated epilepsy among poor health and low-income Americans. *Neurology*. 2013;80(21):1942–9. doi: 10.1212/WNL.0b013e318293e1b4.
2. Tang DH, Malone DC, Warholak TL, Chong J, Armstrong EP, Slack MK, Hsu CH, Labiner DM. Prevalence and Incidence of Epilepsy in an Elderly and Low-Income Population in the United

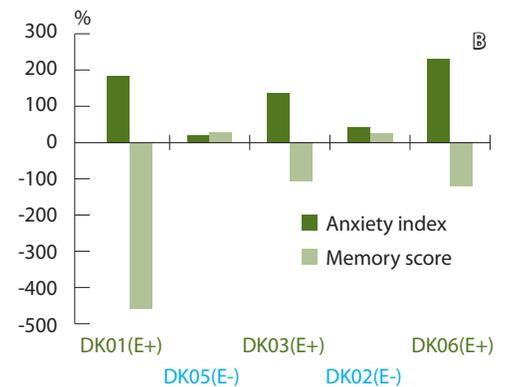
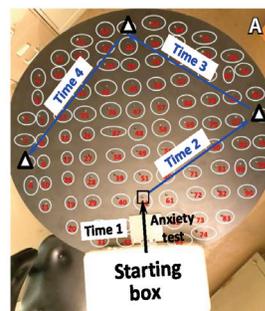


Fig. 7. A. Snapshot from the water-cheeseboard maze task experiment. The 1st well from the starting box is indicated by the red arrow. Other wells with water are outlined by white squares and arrows. **B.** Anxiety index and memory score in the E+ group (red font) and the E- group (blue font) 2 weeks after the kainic acid injection

both electrographic and imaging methods. Although, electrophysiological patterns with increased synchrony of neuronal discharges leading to generation of pHFOs, as well as an increase in BOLD – HGFB coupling, might be expected to result in increased FC between different brain areas, we found FC to be decreased. Our preliminary explanation for this unexpected finding is that pHFOs generate noisy signals disrupting the coherence between brain areas that exist under normal conditions, which results in reduced strength of functional connectivity between them. However, further data are required to explain or reject this hypothesis.

We find that simultaneously with a decrease in FC between neuronal networks, FA increases, and this may be related to heightened inflammatory processes that occur during this post-injury time. Although we do not yet understand the full relationship between electrographic and imaging processes, imaging may yield sensitive non-invasive biomarkers of epileptogenesis, eliminating the need for invasive recording of pHFOs for this purpose.

An increase in anxiety and cognitive decline occurring before the appearance of spontaneous seizures indicates that these parameters could be behavioral biomarkers of epileptogenesis. ©

Conflict of interest

The author declares no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.



- using nationwide health insurance claims data. *J Child Neurol.* 2016;31(6):743–9. doi: 10.1177/0883073815620676.
4. Elger CE. Pharmacoresistance: modern concept and basic data derived from human brain tissue. *Epilepsia.* 2003;44 Suppl 5:9–15. doi: 10.1046/j.1528-1157.44.s6.2.x.
 5. Jamali S, Bartolomei F, Robaglia-Schlupp A, Massacrier A, Peragut JC, Régis J, Dufour H, Ravid R, Roll P, Pereira S, Royer B, Roedel-Trevioli N, Fontaine M, Guye M, Boucraut J, Chauvel P, Cau P, Szepietowski P. Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex. *Brain.* 2006;129(Pt 3): 625–41. doi: 10.1093/brain/awl001.
 6. Badawy RA, Macdonell RA, Berkovic SF, Newton MR, Jackson GD. Predicting seizure control: cortical excitability and antiepileptic medication. *Ann Neurol.* 2010;67(1):64–73. doi: 10.1002/ana.21806.
 7. Doeser A, Dickhof G, Reitze M, Uebachs M, Schaub C, Pires NM, Bonifácio MJ, Soares-da-Silva P, Beck H. Targeting pharmacoresistant epilepsy and epileptogenesis with a dual-purpose antiepileptic drug. *Brain.* 2015;138(Pt 2): 371–87. doi: 10.1093/brain/awu339.
 8. Begley CE, Famulari M, Annegers JF, Lairson DR, Reynolds TF, Coan S, Dubinsky S, Newmark ME, Leibson C, So EL, Rocca WA. The cost of epilepsy in the United States: an estimate from population-based clinical and survey data. *Epilepsia.* 2000;41(3):342–51. doi: 10.1111/j.1528-1157.2000.tb00166.x.
 9. Kobau R, Zahran H, Thurman DJ, Zack MM, Henry TR, Schachter SC, Price PH; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Epilepsy surveillance among adults – 19 States, Behavioral Risk Factor Surveillance System, 2005. *MMWR Surveill Summ.* 2008;57(6):1–20.
 10. French JA, Gazzola DM. New generation antiepileptic drugs: what do they offer in terms of improved tolerability and safety? *Ther Adv Drug Saf.* 2011;2(4):141–58. doi: 10.1177/2042098611411127.
 11. Löscher W, Schmidt D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. *Epilepsia.* 2011;52(4):657–78. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03024.x.
 12. Simonato M, Löscher W, Cole AJ, Dudek FE, Engel J Jr, Kaminski RM, Loeb JA, Scharfman H, Staley KJ, Velišek L, Klitgaard H. Finding a better drug for epilepsy: preclinical screening strategies and experimental trial design. *Epilepsia.* 2012;53(11):1860–7. doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03541.x.
 13. Androsova G, Krause R, Borghei M, Wasseenaar M, Auce P, Avbersek A, Becker F, Berghuis B, Campbell E, Coppola A, Francis B, Wolking S, Cavalleri GL, Craig J, Delanty N, Koeleman BPC, Kunz WS, Lerche H, Marson AG, Sander JW, Sills GJ, Striano P, Zara F, Sisodiya SM, Depondt C; EpiPGX Consortium. Comparative effectiveness of antiepileptic drugs in patients with mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia.* 2017;58(10):1734–41. doi: 10.1111/epi.13871.
 14. Bragin A, Wilson CL, Engel J Jr. Chronic epileptogenesis requires development of a network of pathologically interconnected neuron clusters: a hypothesis. *Epilepsia.* 2000;41 Suppl 6:S144–52. doi: 10.1111/j.1528-1157.2000.tb01573.x.
 15. Blumenfeld H. From molecules to networks: cortical/subcortical interactions in the pathophysiology of idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia.* 2003;44 Suppl 2:7–15. doi: 10.1046/j.1528-1157.44.s11.3.x.
 16. Feldt Muldoon S, Soltesz I, Cossart R. Spatially clustered neuronal assemblies comprise the microstructure of synchrony in chronically epileptic networks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(9): 3567–72. doi: 10.1073/pnas.1216958110.
 17. Blumenfeld H. What is a seizure network? Long-range network consequences of focal seizures. *Adv Exp Med Biol.* 2014;813:63–70. doi: 10.1007/978-94-017-8914-1_5.
 18. Aronica E, Crino PB. Inflammation in epilepsy: clinical observations. *Epilepsia.* 2011;52 Suppl 3:26–32. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03033.x.
 19. Friedman A, Dingledine R. Molecular cascades that mediate the influence of inflammation on epilepsy. *Epilepsia.* 2011;52 Suppl 3:33–9. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03034.x.
 20. Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci.* 2013;36(3):174–84. doi: 10.1016/j.tins.2012.11.008.
 21. Holtman L, van Vliet EA, Aronica E, Wouters D, Wadman WJ, Gorter JA. Blood plasma inflammation markers during epileptogenesis in post-status epilepticus rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2013;54(4):589–95. doi: 10.1111/epi.12112.
 22. Scott AJ, Sharpe L, Hunt C, Gandy M. Anxiety and depressive disorders in people with epilepsy: A meta-analysis. *Epilepsia.* 2017;58(6): 973–82. doi: 10.1111/epi.13769.
 23. Euston DR, Gruber AJ, McNaughton BL. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron.* 2012;76(6):1057–70. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.002.
 24. Rajasethupathy P, Sankaran S, Marshel JH, Kim CK, Ferenczi E, Lee SY, Berndt A, Ramakrishnan C, Jaffe A, Lo M, Liston C, Deisseroth K. Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature.* 2015;526(7575):653–9. doi: 10.1038/nature15389.
 25. Khodagholy D, Gelineas JN, Buzsáki G. Learning-enhanced coupling between ripple oscillations in association cortices and hippocampus. *Science.* 2017;358(6361):369–72. doi: 10.1126/science.aan6203.
 26. Morgane PJ, Galler JR, Mokler DJ. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol.* 2005;75(2): 143–60. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.01.001.
 27. Kobow K, Auvin S, Jensen F, Löscher W, Mody I, Potschka H, Prince D, Sierra A, Simonato M, Pitkänen A, Nehlig A, Rho JM. Finding a better drug for epilepsy: antiepileptogenesis targets. *Epilepsia.* 2012;53(11):1868–76. doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03716.x.
 28. van Vliet EA, Dedeurwaerdere S, Cole AJ, Friedman A, Koeppe MJ, Potschka H, Immonen R, Pitkänen A, Federico P. WONOEP appraisal: Imaging biomarkers in epilepsy. *Epilepsia.* 2017;58(3):315–30. doi: 10.1111/epi.13621.
 29. Laitinen T, Sierra A, Pitkänen A, Gröhn O. Diffusion tensor MRI of axonal plasticity in the rat hippocampus. *Neuroimage.* 2010;51(2):521–30. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.02.077.
 30. Coras R, Milesi G, Zucca I, Mastropietro A, Scotti A, Figini M, Mühlebner A, Hess A, Graf W, Tringali G, Blümcke I, Villani F, Didato G, Frassonni C, Spreafico R, Garbelli R. 7T MRI features in control human hippocampus and hippocampal sclerosis: an ex vivo study with histologic correlations. *Epilepsia.* 2014;55(12):2003–16. doi: 10.1111/epi.12828.
 31. Sierra A, Laitinen T, Gröhn O, Pitkänen A. Diffusion tensor imaging of hippocampal network plasticity. *Brain Struct Funct.* 2015;220(2):781–801. doi: 10.1007/s00429-013-0683-7.
 32. Modo M, Hitchens TK, Liu JR, Richardson RM. Detection of aberrant hippocampal mossy fiber connections: Ex vivo mesoscale diffusion MRI and microtractography with histological validation in a patient with uncontrolled temporal lobe epilepsy. *Hum Brain Mapp.* 2016;37(2):780–95. doi: 10.1002/hbm.23066.
 33. Khoo HM, Hao Y, von Ellenrieder N, Zazubovits N, Hall J, Olivier A, Dubeau F, Gotman J. The hemodynamic response to interictal epileptic discharges localizes the seizure-onset zone. *Epilepsia.* 2017;58(5):811–23. doi: 10.1111/epi.13717.
 34. Khoo HM, von Ellenrieder N, Zazubovits N, Dubeau F, Gotman J. Epileptic networks in action: Synchrony between distant hemodynamic responses. *Ann Neurol.* 2017;82(1):57–66. doi: 10.1002/ana.24973.
 35. Pittau F, Ferri L, Fahoum F, Dubeau F, Gotman J. Contributions of EEG-fMRI to assessing the epileptogenicity of focal cortical dysplasia. *Front Comput Neurosci.* 2017;11:8. doi: 10.3389/fncom.2017.00008.
 36. Dev SI, Moore RC, Soontornniyomkij B, Achim CL, Jeste DV, Eyer LT. Peripheral inflammation related to lower fMRI activation during a working memory task and resting functional connectivity among older adults: a preliminary study. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2017;32(3): 341–9. doi: 10.1002/gps.4482.



37. Budde MD, Janes L, Gold E, Turtzo LC, Frank JA. The contribution of gliosis to diffusion tensor anisotropy and tractography following traumatic brain injury: validation in the rat using Fourier analysis of stained tissue sections. *Brain*. 2011;134(Pt 8):2248–60. doi: 10.1093/brain/awr161.
38. Mihai PG, Otto M, Domin M, Platz T, Hamdy S, Lotze M. Brain imaging correlates of recovered swallowing after dysphagic stroke: A fMRI and DWI study. *Neuroimage Clin*. 2016;12:1013–21. doi: 10.1016/j.nicl.2016.05.006.
39. Felger JC, Li Z, Haroon E, Woolwine BJ, Jung MY, Hu X, Miller AH. Inflammation is associated with decreased functional connectivity within corticostriatal reward circuitry in depression. *Mol Psychiatry*. 2016;21(10):1358–65. doi: 10.1038/mp.2015.168.
40. Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics*. 2007;4(3):316–29. doi: 10.1016/j.nurt.2007.05.011.
41. MacKenzie-Graham AJ, Rinek GA, Avedisian A, Morales LB, Umeda E, Boulat B, Jacobs RE, Toga AW, Voskuhl RR. Estrogen treatment prevents gray matter atrophy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*. 2012;90(7):1310–23. doi: 10.1002/jnr.23019.
42. Hemanth Kumar BS, Mishra SK, Trivedi R, Singh S, Rana P, Khushu S. Demyelinating evidences in CMS rat model of depression: a DTI study at 7 T. *Neuroscience*. 2014;275:12–21. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.05.037.
43. Begonia MT, Prabhu R, Liao J, Whittington WR, Claude A, Willeford B, Wardlaw J, Wu R, Zhang S, Williams LN. Quantitative analysis of brain microstructure following mild blunt and blast trauma. *J Biomech*. 2014;47(15):3704–11. doi: 10.1016/j.jbiomech.2014.09.026.
44. Harris NG, Verley DR, Gutman BA, Sutton RL. Bi-directional changes in fractional anisotropy after experiment TBI: Disorganization and reorganization? *Neuroimage*. 2016;133:129–43. doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.03.012.
45. Kikinis Z, Muehlmann M, Pasternak O, Pelled S, Kulkarni P, Ferris C, Bouix S, Rathi Y, Koerte IK, Pieper S, Yarmarkovich A, Porter CL, Kristal BS, Shenton ME. Diffusion imaging of mild traumatic brain injury in the impact accelerated rodent model: A pilot study. *Brain Inj*. 2017;31(10):1376–81. doi: 10.1080/02699052.2017.1318450.
46. Koyama T, Domen K. Diffusion Tensor Fractional Anisotropy in the Superior Longitudinal Fasciculus Correlates with Functional Independence Measure Cognition Scores in Patients with Cerebral Infarction. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017;26(8):1704–11. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.03.034.
47. Thomalla G, Glauche V, Koch MA, Beaulieu C, Weiller C, Röther J. Diffusion tensor imaging detects early Wallerian degeneration of the pyramidal tract after ischemic stroke. *Neuroimage*. 2004;22(4):1767–74. doi: 10.1016/j.neuroimage.2004.03.041.
48. Gotman J. Epileptic networks studied with EEG-fMRI. *Epilepsia*. 2008;49 Suppl 3:42–51. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01509.x.
49. Bettus G, Ranjeva JP, Wendling F, Bénar CG, Confort-Gouny S, Régis J, Chauvel P, Cozzone PJ, Lemieux L, Bartolomei F, Guye M. Interictal functional connectivity of human epileptic networks assessed by intracerebral EEG and BOLD signal fluctuations. *PLoS One*. 2011;6(5):e20071. doi: 10.1371/journal.pone.0020071.
50. Bertoglio D, Jonckers E, Ali I, Verhoye M, Van der Linden A, Dedeurwaerdere S. In vivo measurement of brain network connectivity reflects progression and intrinsic disease severity in a model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2019;127:45–52. doi: 10.1016/j.nbd.2019.02.012.
51. Jozwiak S, Becker A, Cepeda C, Engel J Jr, Gnatkovsky V, Huberfeld G, Kaya M, Kobow K, Simonato M, Loeb JA. WONOEP appraisal: Development of epilepsy biomarkers – What we can learn from our patients? *Epilepsia*. 2017;58(6):951–61. doi: 10.1111/epi.13728.
52. Mirsattari SM, Wang Z, Ives JR, Bihari F, Leung LS, Bartha R, Menon RS. Linear aspects of transformation from interictal epileptic discharges to BOLD fMRI signals in an animal model of occipital epilepsy. *Neuroimage*. 2006;30(4):1133–48. doi: 10.1016/j.neuroimage.2005.11.006.
53. Dubé CM, Ravizza T, Hamamura M, Zha Q, Keebaugh A, Fok K, Andres AL, Nalcioglu O, Obenaus A, Vezzani A, Baram TZ. Epileptogenesis provoked by prolonged experimental febrile seizures: mechanisms and biomarkers. *J Neurosci*. 2010;30(22):7484–94. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0551-10.2010.
54. Parekh MB, Carney PR, Sepulveda H, Norman W, King M, Mareci TH. Early MR diffusion and relaxation changes in the parahippocampal gyrus precede the onset of spontaneous seizures in an animal model of chronic limbic epilepsy. *Exp Neurol*. 2010;224(1):258–70. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.03.031.
55. Dedeurwaerdere S, Shultz SR, Federico P, Engel J Jr. Workshop on Neurobiology of Epilepsy appraisal: new systemic imaging technologies to study the brain in experimental models of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(6):819–28. doi: 10.1111/epi.12642.
56. Gupta PK, Sayed N, Ding K, Agostini MA, Van Ness PC, Yablou S, Madden C, Mickey B, D'Ambrosio R, Diaz-Arrastia R. Subtypes of post-traumatic epilepsy: clinical, electrophysiological, and imaging features. *J Neurotrauma*. 2014;31(16):1439–43. doi: 10.1089/neu.2013.3221.
57. Salo RA, Miettinen T, Laitinen T, Gröhn O, Sierä A. Diffusion tensor MRI shows progressive changes in the hippocampus and dentate gyrus after status epilepticus in rat – histological validation with Fourier-based analysis. *Neuroimage*. 2017;152:221–36. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.03.003.
58. Shultz SR, Cardamone L, Liu YR, Hogan RE, Maccotta L, Wright DK, Zheng P, Koe A, Gregoire MC, Williams JP, Hicks RJ, Jones NC, Myers DE, O'Brien TJ, Bouillett V. Can structural or functional changes following traumatic brain injury in the rat predict epileptic outcome? *Epilepsia*. 2013;54(7):1240–50. doi: 10.1111/epi.12223.
59. Mishra AM, Bai X, Sanganahalli BG, Waxman SG, Shatillo O, Grohn O, Hyder F, Pitkänen A, Blumenfeld H. Decreased resting functional connectivity after traumatic brain injury in the rat. *PLoS One*. 2014;9(4):e95280. doi: 10.1371/journal.pone.0095280.
60. Liao W, Zhang Z, Pan Z, Mantini D, Ding J, Duan X, Luo C, Wang Z, Tan Q, Lu G, Chen H. Default mode network abnormalities in mesial temporal lobe epilepsy: a study combining fMRI and DTI. *Hum Brain Mapp*. 2011;32(6):883–95. doi: 10.1002/hbm.21076.
61. Miller KJ. Broadband spectral change: evidence for a macroscale correlate of population firing rate? *J Neurosci*. 2010;30(19):6477–9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6401-09.2010.
62. Miller KJ, Honey CJ, Hermes D, Rao RP, denNijs M, Ojemann JG. Broadband changes in the cortical surface potential track activation of functionally diverse neuronal populations. *Neuroimage*. 2014;85 Pt 2:711–20. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.08.070.
63. Foster BL, Rangarajan V, Shirer WR, Parvizi J. Intrinsic and task-dependent coupling of neuronal population activity in human parietal cortex. *Neuron*. 2015;86(2):578–90. doi: 10.1016/j.neuron.2015.03.018.
64. Scott RC, Menendez de la Prida L, Mahoney JM, Kobow K, Sankar R, de Curtis M. WONOEP APPRAISAL: The many facets of epilepsy networks. *Epilepsia*. 2018;59(8):1475–83. doi: 10.1111/epi.14503.
65. Bragin A, Engel J Jr, Wilson CL, Fried I, Buzsáki G. High-frequency oscillations in human brain. *Hippocampus*. 1999;9(2):137–42. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:2<137::AID-HIPO5>3.0.CO;2-0.
66. Bragin A, Engel J Jr, Wilson CL, Fried I, Mathern GW. Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100–500 Hz) in human epileptic brain and in kainic acid-treated rats with chronic seizures. *Epilepsia*. 1999;40(2):127–37. doi: 10.1111/j.1528-1157.1999.tb02065.x.
67. Bragin A, Engel J Jr, Wilson CL, Vizin E, Mathern GW. Electrophysiologic analysis of a chronic seizure model after unilateral hippocampal KA injection. *Epilepsia*. 1999;40(9):1210–21. doi: 10.1111/j.1528-1157.1999.tb00849.x.
68. Bragin A, Mody I, Wilson CL, Engel J Jr. Local generation of fast ripples in epileptic brain.



- J Neurosci. 2002;22(5):2012–21. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-05-02012.2002.
69. Bragin A, Wilson CL, Engel J. Voltage Depth Profiles of High-frequency Oscillations after Kainic Acid-induced Status Epilepticus. *Epilepsia*. 2007;48:35–40.
70. Ponomarenko AA, Korotkova TM, Haas HL. High frequency (200 Hz) oscillations and firing patterns in the basolateral amygdala and dorsal endopiriform nucleus of the behaving rat. *Behav Brain Res*. 2003;141(2):123–9. doi: 10.1016/S0166-4328(02)00327-3.
71. Dzhalal VI, Staley KJ. Mechanisms of fast ripples in the hippocampus. *J Neurosci*. 2004;24(40):8896–906. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3112-04.2004.
72. Akiyama T, Otsubo H, Ochi A, Ishiguro T, Kadokura G, Ramachandranair R, Weiss SK, Rutka JT, Carter Snead O 3rd. Focal cortical high-frequency oscillations trigger epileptic spasms: confirmation by digital video subdural EEG. *Clin Neurophysiol*. 2005;116(12):2819–25. doi: 10.1016/j.clinph.2005.08.029.
73. Jirsch JD, Dubeau F, Urrestarazu E, LeVan P, Gotman J. High frequency activity (100 to 500 Hz) in areas of ictal onset and propagation in patients with focal seizures. *Epilepsia*. 2005;46 Suppl 8:267.
74. Foffani G, Uzcategui YG, Gal B, Menendez de la Prida L. Reduced spike-timing reliability correlates with the emergence of fast ripples in the rat epileptic hippocampus. *Neuron*. 2007;55(6):930–41. doi: 10.1016/j.neuron.2007.07.040.
75. Ochi A, Otsubo H, Donner EJ, Elliott I, Iwata R, Funaki T, Akizuki Y, Akiyama T, Imai K, Rutka JT, Snead OC 3rd. Dynamic changes of ictal high-frequency oscillations in neocortical epilepsy: using multiple band frequency analysis. *Epilepsia*. 2007;48(2):286–96.
76. Jacobs J, Zijlmans M, Zelman R, Chatillon CE, Hall J, Olivier A, Dubeau F, Gotman J. High-frequency electroencephalographic oscillations correlate with outcome of epilepsy surgery. *Ann Neurol*. 2010;67(2):209–20. doi: 10.1002/ana.21847.
77. Brázdil M, Halánek J, Jurák P, Daniel P, Kuba R, Chrástina J, Novák Z, Rektor I. Interictal high-frequency oscillations indicate seizure onset zone in patients with focal cortical dysplasia. *Epilepsy Res*. 2010;90(1–2):28–32. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2010.03.003.
78. Melani F, Zelman R, Mari F, Gotman J. Continuous High Frequency Activity: a peculiar SEEG pattern related to specific brain regions. *Clin Neurophysiol*. 2013;124(8):1507–16. doi: 10.1016/j.clinph.2012.11.016.
79. Bragin A, Wilson CL, Engel J. Spatial stability over time of brain areas generating fast ripples in the epileptic rat. *Epilepsia*. 2003;44(9):1233–7.
80. Bragin A, Li L, Almajano J, Alvarado-Rojas C, Reid AY, Staba RJ, Engel J Jr. Pathologic electrographic changes after experimental traumatic brain injury. *Epilepsia*. 2016;57(5):735–45. doi: 10.1111/epi.13359.
81. Bragin A, Wilson CL, Almajano J, Mody I, Engel J Jr. High-frequency oscillations after status epilepticus: epileptogenesis and seizure genesis. *Epilepsia*. 2004;45(9):1017–23. doi: 10.1111/j.0013-9580.2004.17004.x.

Предотвращение эпилептогенеза как будущая стратегия терапии эпилепсии

Брагин А.Г.¹

Эпилепсией страдают более 70 млн человек во всем мире. От 30 до 40% больных резистентны к существующим лекарственным средствам. В статье описано современное состояние терапии эпилепсии и предложен возможный подход к превентивной терапии на ранних стадиях эпилептогенеза. Для прогнозирования развития эпилепсии на ее ранних стадиях нужны биомаркеры. Единственным приемлемым биомаркером эпилептогенеза следует признать патологические высокочастотные осцилляции. Однако главное ограничение метода – необходимость имплантации электродов для их регистрации. Одной из актуальнейших тем научных исследований эпилепсии представляется поиск неинвазивных биомаркеров эпилептогенеза. В свою очередь, в этой области существуют два потенциально интересных направления: поиск воспалительных биомаркеров в периферической крови и анализ различных параметров, которые дают визуализирующие методы. В этой публикации

мы освещаем подходы к определению потенциальных биомаркеров эпилептогенеза с помощью магнитно-резонансной томографии. Некоторые из параметров магнитно-резонансной томографии коррелируют с наличием патологических высокочастотных осцилляций, могут косвенно отражать текущий воспалительный процесс в головном мозге и стать возможными биомаркерами эпилептогенеза.

Ключевые слова: эпилепсия, патологические высокочастотные осцилляции, биомаркеры эпилептогенеза, превентивная терапия

Для цитирования: Брагин А.Г. Предотвращение эпилептогенеза как будущая стратегия терапии эпилепсии. *Альманах клинической медицины*. 2019;47(7):614–22. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-028.

Поступила 19.06.2019; принята к публикации 24.06.2019; опубликована онлайн 09.07.2019

Брагин Анатолий Григорьевич – д-р биол. наук, науч. сотр. отделения неврологии Центра по эпилепсии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1207-8481>
✉ 90095, Калифорния, Лос-Анджелес, Вествуд Плаза, 710, Соединенные Штаты Америки.
E-mail: abragin@mednet.ucla.edu

Финансирование

Исследование проведено за счет средств Национальных институтов здоровья США (NIH), грант NS065877.

Конфликт интересов

Автор декларирует отсутствие потенциальных конфликтов интересов, связанных с подготовкой и/или публикацией настоящей статьи.

¹Калифорнийский университет (Лос-Анджелес); 90095, Калифорния, Лос-Анджелес, Вествуд Плаза, 710, Соединенные Штаты Америки



Точка зрения

Клеточные технологии в регенеративной медицине сердца: основные проблемы и пути развития

Агладзе К.И.¹

Агладзе Константин Игоревич – канд. физ.-мат. наук, профессор, заведующий лабораторией биофизики возбудимых систем¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9258-436X>

✉ 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9, Российская Федерация.
Тел.: +7 (495) 408 46 45.
E-mail: kagladze@gmail.com

Потенциал сердечной ткани к ауторегенерации невысок и заключается, предположительно, в небольшом количестве нишевых стволовых клеток. Это делает крайне важным развитие регенеративных технологий миокарда, основанных на современных методах, например, клеточном репрограммировании и трехмерной биопечати. Однако нередко бывает трудно отделить регулярно появляющиеся в печати сенсационные сообщения о новых «прорывных» технологиях от таковых, действительно имеющих практические приложения. В статье изложена точка зрения на популярные технологии регенерации сердечной ткани и миокарда в целом, рассмотрены их недостатки. К главным проблемам, стоящим перед активно развиваемым сегодня «биопринтингом», отнесены невысокий уровень дифференцировки при печати стволовыми клетками, не позволяющий создать полноценную сердечную ткань без посторонних вкраплений, а также технологическая невозможность при печати дифференцированными клетками, в процессе доставки клеток в соответствующие места матрикса, задать их связи с другими клетками. Несмотря на оптимистичные сообщения о результативности инъекции стволовых или индуцированно-плюрипотентных

клеток в пораженную зону миокарда, впервые появившиеся около 20 лет назад, в настоящее время эта идея представляется весьма сомнительной, так как в последние годы отмечается практически полное отсутствие положительного эффекта этой процедуры при серьезных рисках осложнений. В отношении выращивания мышечных элементов сердца основной проблемой видится развитие «правильной» васкуляризации выращиваемой мышцы. Вместе с тем подчеркивается практическая осуществимость выращивания относительно небольших элементов миокарда, таких как синусовый узел.

Ключевые слова: миокард, регенерация, стволовые клетки, индуцированно-плюрипотентные стволовые клетки, тканевая инженерия

Для цитирования: Агладзе КИ. Клеточные технологии в регенеративной медицине сердца: основные проблемы и пути развития. Альманах клинической медицины. 2019;47(7):623–9. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-043.

Поступила 25.06.2019; принята к публикации 05.08.2019; опубликована онлайн 23.08.2019

¹ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»; 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9, Российская Федерация

Актуальность регенеративных технологий в кардиологической практике не вызывает сомнений: по оценкам Всемирной организации здравоохранения, в подавляющем большинстве стран мира сердечно-сосудистые заболевания занимают первое место среди причин смертности населения [1]. Значительная доля сердечно-сосудистых заболеваний приходится на нарушения ритма сердца и, в частности, тахикардии. Наиболее опасны

желудочковые тахикардии, часто приводящие к фибрилляции, манифестирующей как внезапная сердечная смерть [2]. В основе большинства сердечных тахикардий, и желудочковых, и наджелудочковых, лежат циркулирующие волны возбуждения – риентри. А они, в свою очередь, возникают, как правило, в поврежденной области миокарда [3]. Типичным примером такого повреждения служит постинфарктный рубец, нарушающий нормальное проведение возбуждения.



Другой пример сердечной патологии – потеря сократительной функции сердца вследствие истончения мышечной стенки или замещения мышечной ткани фиброзной [3].

Потенциал сердечной ткани к ауторегенерации крайне невысок и заключается, предположительно, в небольшом количестве нишевых стволовых клеток [4]. При этом во время инфаркта может быть потеряно около миллиарда кардиомиоцитов [5], замещающихся соединительной тканью. С начала нулевых предпринято достаточно много попыток добиться значительной регенерации сердечной ткани путем инъекции стволовых клеток [6, 7]. И если вначале ожидания были весьма оптимистичными, базируясь на публикациях о якобы имевшем место успешном восстановлении миокарда [7, 8], то по прошествии времени становилось все более ясным, что значимого положительного эффекта инъекции стволовых клеток не приносят, сопровождаясь рядом опасных побочных эффектов [9–11]. Изредка наблюдаемое улучшение сердечной деятельности было обусловлено, вероятнее всего, паракринным эффектом [12–14].

С открытием в 2006 г. Shinya Yamanaka клеточного репрограммирования интерес к регенерации сердечной ткани получил новый импульс, на этот раз в основу положены так называемые индуцированно-плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) [15]. Их использование вместо эмбриональных стволовых клеток представляется тем более заманчивой перспективой, что источником ИПСК выступает сам пациент, вследствие чего полностью снимаются вопросы иммунного отторжения клеточного материала.

Опасность трансплантации стволовых клеток была подтверждена в многочисленных работах [16–18]. В ответ появилась концепция регенерации за счет сформировавшегося из ИПСК аутологичного клеточного материала [17, 19]. В частности, в инфарктную зону вносили дифференцированные из ИПСК кардиомиоциты [20, 21]. Для компенсации слабости синусового узла в миокард вносили дифференцированные из ИПСК пейсмекерные клетки [22–24].

Отсутствие положительных эффектов при подобной клеточной имплантации привело к пониманию, что имплантироваться должны не отдельные клетки в суспензии, а, скорее, выращенные из ИПСК элементы миокардиальной ткани. Прогрессу подобного подхода, обсуждению его *pro* и *contra* и посвящена настоящая статья. Изложенная точка зрения не претендует на исчерпывающую глубину в освещении клеточных

технологий в регенеративной медицине сердца. Это критический взгляд на основные тренды развития данных технологий. Представлено также наше видение путей решения или обхода основных проблем, возникающих в мейнстриме регенерации миокарда.

3D-печать сердца

Если не помогают инъекции клеток в пораженную область, а трехмерная печать породила такой феномен, как биопринтинг, стоит ли мелочиться – не проще ли напечатать новое сердце? Тем более что этот орган, предположительно, может быть напечатан из донорских клеток самого пациента, а значит, как говорилось выше, не должно возникнуть проблем с иммунным отторжением. Первые попытки печати трехмерной сердечной ткани предприняты около 7 лет назад [25] и, по сообщению авторов, были успешными, то есть завершились созданием трехмерных альгинатных блоков, содержащих живые клетки [25]. К сожалению, авторы не выполнили никакого анализа функциональных возможностей полученной «ткани», таких как проведение волны возбуждения и наличие скоординированных сокращений. В последующие годы опубликовано значительное количество работ, посвященных трехмерному биопринтингу миокарда. Однако до нынешнего времени результаты по контрасту с ожиданиями остаются весьма скромными. В некоторых работах [26, 27] в качестве сердцеподобных структур были произведены клеточные сфероиды, имеющие довольно отдаленное отношение к реальным структурам сердца. Другие исследователи [28] сосредоточились на поиске наиболее подходящего материала скаффолда для трехмерной печати, например, децеллюризованной соединительной ткани. Достаточно подробно стратегии трехмерного биопринтинга разобраны в обзорной статье [29]. Так, предлагается печатать «элементарные» единицы органа, например, нефрон у почки. Однако, что могло бы служить подобной элементарной единицей для сердца – неясно. Тем не менее можно считать успешными попытки печати элементов сердечно-сосудистой системы, не обладающих сложной трехмерной структурой и состоящих главным образом из соединительной ткани, например, аортального клапана [30]. С некоторой долей условности к трехмерной печати можно также отнести методы создания сердечного органоида, использующие вторичное заселение стволовыми клетками или дифференцирующимися кардиомиоцитами децеллюризованного матрикса сердца животного [31, 32].

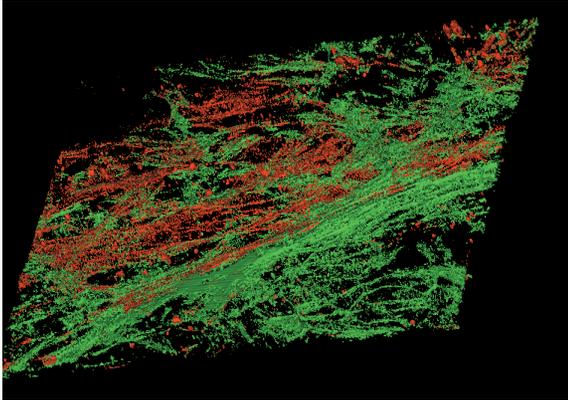


Рис. 1. Самоорганизация сердечной ткани через 15 дней после начала дифференцировки, через 8 дней посева. Оптическое сканирование на конфокальном микроскопе проводилось с шагом 3 мкм; толщина сфотографированного слоя составляет около 57 мкм. Кардиомиоциты были помечены красным альфа-актинином, зеленые антитела – для F-актина. Фотография получена на микроскопе Zeiss LSM-710 в лаборатории биофизики возбудимых систем МФТИ (руководитель К.И. Агладзе)

Остановимся на основных проблемах метода трехмерной печати сердца. Неслучайно среди более чем 100 публикаций на данную тему фактически отсутствует оценка функциональности произведенных органоидов. В лучшем случае авторы ограничиваются констатацией «наличия сокращений» и изменения спонтанной активности клеток под действием фармпрепаратов [25, 32]. Трехмерная печать представляет собой метод доставки материала в необходимую точку трехмерного пространства. Процесс биопринтинга основан на том, что в соответствующую область доставляются как живые клетки, так и материал скаффолда, позволяющий зафиксировать клетку в пространстве. Предполагается, что клетки, помещенные в соответствующие структурные элементы печатаемого сердца, образуют сердечную ткань. Однако эта гипотеза базируется на нескольких допущениях. Считается, что при печати стволовыми клетками или ИПСК клетки благополучно дифференцируются в кардиомиоциты. Но, как известно, даже в очень хорошем случае выход кардиомиоцитов составляет не более 50%, что было подтверждено в наших работах [33, 34]. Более того, дифференцирующиеся клетки имеют тенденцию к образованию кластеров, а организация этих кластеров в структурах более сложных, чем клеточный монослой, совершенно не изучена [33]. Пример изображения самоорганизующегося из ИПСК слоя кардиомиоцитов, полученного с помощью конфокального микроскопа, приведен на рис. 1. Кроме того, печатаемое сердце должно обладать развитой сосудистой системой. А при печати стволовыми клетками совершенно непонятно, каким способом можно дифференцировать рядом расположенные клетки в клетки различных типов. В случае биопечати зрелыми клетками указанные выше проблемы можно, в принципе, преодолеть. Однако остаются нерешенными вопросы: как расположить печатаемые

клетки в необходимой ориентации и как задать необходимые связи между соседними клетками. Полагаться на самоорганизацию тут не придется, а значит, трехмерная биопечать сердца пока не представляется возможной.

Какие направления работы могут быть предложены в этой области? Одно из них – образование сердечного синцития, способного к генерации и проведению возбуждения, – в настоящее время наиболее эффективно проверяется с помощью так называемого оптического картирования, при котором возбуждение, генерируемое в сердечных клетках, регистрируется с помощью флюоресцентных маркеров [35, 36]. Оптическое картирование позволяет визуализировать распространяющуюся волну возбуждения и измерить ее параметры, такие как скорость, рефрактерность и др. Рис. 2 демонстрирует пример регистрируемой волны возбуждения в слое кардиомиоцитов, полученных из человеческих ИПСК. Наличие проведения волны возбуждения в массиве клеток говорит о том, что они связаны в синцитий. Особенно эффективно оптическое картирование в случае тонких квазидвумерных слоев. Интересно было бы напечатать с помощью биопринтера двумерный слой клеток и с помощью оптического картирования исследовать его на формирование синцития, а также определить факторы, приводящие к такому формированию. При получении успешного результата можно было бы провести послойную сборку трехмерной конструкции.

Культивирование элементов клеточной стенки

Как было показано ранее, монослои сердечных клеток, в том числе с заданной полимерными волокнами архитектурой, успешно культивируются [37]. Однако, несмотря на верифицируемую функциональность, то есть способность к проведению возбуждения и к согласованному сокращению, такие монослои развивают механическое усилие, явно недостаточное для того, чтобы успешно заменить часть сократительного миокарда. Предпринимались попытки создать сборку из монослоев кардиомиоцитов [38–41], но они не привели к успеху. Не удалось культивировать конструкцию более чем четырехслойную. Основным ограничением выступили физические факторы, а именно диффузия. Обмен веществ между клеткой и окружающей средой базируется на диффузии. В отсутствие кровеносного русла это – диффузный обмен клетки метаболитами с инкубирующей средой, происходящий через

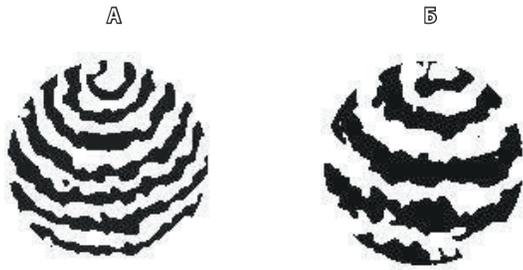


Рис. 2. Оптическое картирование клеточного монослоя кардиомиоцитов, полученных из человеческих индуцированно-плюрипотентных стволовых клеток с помощью Fluo-4. Изохрональная карта распространения волн: стимуляция 1 Гц (А) и 0,5 Гц (Б). Флюоресцентные флюорографии получены с помощью камеры Andor-897-U в лаборатории К.И. Агладзе в Университете Киото (Laboratory at the Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Japan) (публикуются впервые)

клеточные слои. Увеличение пути диффузионного транспорта до 70–80 микрон, что как раз примерно соответствует четырем клеточным слоям, включая межклеточный полимерный матрикс, приводит к сильной ишемии и повреждению удаленных от поверхности клеток. Васкуляризация растущей сердечной структуры базируется на добавлении в инкубирующую среду факторов сосудистого роста, и в отдельных случаях получали успешное сокультурирование кардиомиоцитов и сосудистых клеток [42–45]. Несмотря на некоторые успехи в выращивании кровеносного русла и, соответственно, относительно успешную культивацию 2–3 мм слоев сердечных клеток, для трансплантации подобные мышечные лоскуты оказываются малопригодны, так как сосудистое русло имплантата развивается спонтанно и без всякого соответствия с сосудистым руслом реципиента [46–48].

Ранее мы предложили способ преодоления этой проблемы [37]. Сначала выращиваются отдельные слои клеток на подвешенных полимерных волокнах, дающих ажурную сократительную конструкцию (рис. 3). Далее проводится сборка подобных ажурных слоев в многослойную конструкцию по схеме, изображенной на рис. 4. Таким образом предполагалось получить губчатую пористую мышечную структуру, которая вследствие периодических сокращений

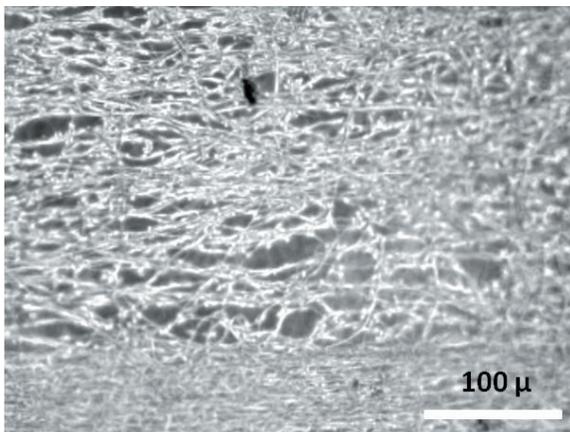


Рис. 3. Слой крысиных неонатальных кардиомиоцитов на субстрате из подвешенных полимерных волокон (полиметилглутаримидные волокна, покрытые слоем фибронектина). Фотография получена в лаборатории биофизики возбудимых систем МФТИ (руководитель К.И. Агладзе) (публикуется впервые)

обеспечивала бы прокачку инкубирующей жидкости (или крови при имплантации), поддерживающую жизнеспособность имплантата во время развития сосудистой системы, прорастающей из тканей реципиента. Следует отметить, что простое помещение клеток в губчатую структуру из альгинатов не обеспечивает межклеточные взаимодействия, ответственные за проведение возбуждения, а слои клеток на подвешенных волокнах, как было показано нами, – обеспечивают [37].

Восстановление проводящей системы сердца

Понимая, что главная сложность в выращивании сердечных имплантатов заключается в их физическом объеме, разумно найти такие элементы сердечно-сосудистой системы, которые не подвержены влиянию факторов объема и могут выживать какое-то время в отсутствие васкуляризации. Проще говоря, представляют собой достаточно небольшие клеточные образования, и их культивирование не проблематично с точки зрения обмена метаболитами со средой. К подобным клеточным образованиям, относится синусовый узел, основной водитель ритма в сердце. При развитии брадикардий вследствие слабости синусового узла используется электрокардиостимуляция. Несмотря на достижения в этой области, превосходная паллиативная стимуляция сопряжена с определенными ограничениями, а именно: плохой ответ на реакцию автономной нервной системы, потребность в мониторинге и технической поддержке системы стимуляции (в том числе необходимость замены батареи устройства/электродов), инфицирование системы стимуляции, а также большая проблема адаптации системы стимуляции к росту и развитию организма у педиатрических пациентов [49].

В получении пейсмекерных клеток в настоящее время существуют две стратегии. Первая – трансфекция обычных желудочковых или предсердных кардиомиоцитов генным материалом, ответственным за синтез канальных белков и сборку мембранных каналов, например, HCN212 [50]. Вторая – получение пейсмекерных клеток из ИПСК пациента [51]. Однако одного наличия пейсмекерных клеток недостаточно для успешного создания биопейсмекера. Попытки имплантировать пейсмекерные клетки путем инъекции в миокард реципиента оказались малоэффективными [22, 23, 50]. Выходом может стать выращивание пейсмекерных клеток на полимерных подложках до состояния тканево-инженерных лоскутов, пригодных для

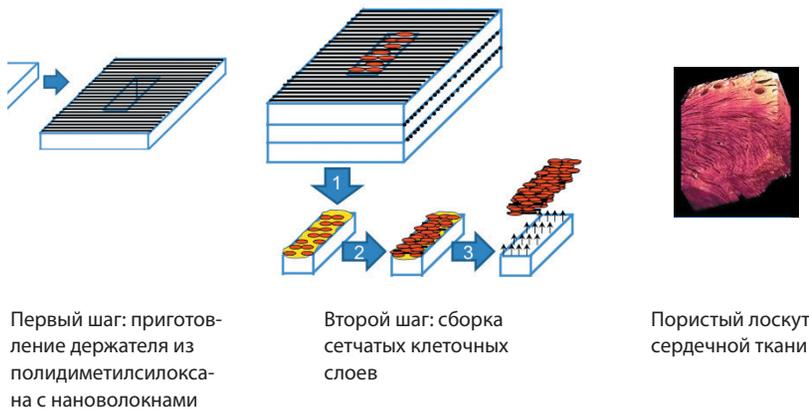


Рис. 4. Проектирование многослойных лоскутов сердечной ткани с контролируемой архитектурой из первичных клеток и индуцированно-плюрипотентных стволовых клеток. Метод предложен и опробован в лаборатории биофизики возбудимых систем МФТИ (руководитель К.И. Агладзе) (схема публикуется впервые)

имплантации, таких, как описано в работах [52, 53]. Альтернативно лоскутам пейсмекерные клетки могут выращиваться на микроносителях,

поскольку известно, что даже единичное полимерное волокно способно обеспечить субстрат для прикрепления и развития сердечной клетки [37]. Таким образом, считаем перспективной разработку микроносителей для клеточного материала на основе фрагментов полимерных волокон, и эти работы в настоящее время ведутся в лаборатории биофизики возбудимых систем МФТИ.

Заключение

Основной преградой на пути развития технологий регенерации сердечной ткани лежит «фактор объема» – невозможность в настоящее время культивировать достаточно объемные («толстые») фрагменты сердечной ткани. В перспективе это препятствие может быть преодолено с помощью методов выращивания васкуляризированной сердечной ткани с заданной архитектурой сосудистого русла. До появления подобных методов, по-видимому, возможно выращивание отдельных относительно небольших элементов миокарда типа синусового узла. ©

Дополнительная информация

Конфликт интересов

Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Благодарности

Часть иллюстративных материалов, использованных в статье, была получена в результате исследований, проводимых по гранту Российского научного фонда № 16-14-10091.

Литература / References

- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics – 2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012;125(1):e2–220. doi: 10.1161/CIR.0b013e31823ac046.
- Zipes DP, Wellens HJ. Sudden cardiac death. *Circulation*. 1998;98(21):2334–51. doi: 10.1161/01.cir.98.21.2334.
- Centurión OA, Alderete JF, Torales JM, García LB, Scavenius KE, Miño LM. Myocardial fibrosis as a pathway of prediction of ventricular arrhythmias and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Crit Pathw Cardiol*. 2019;18(2):89–97. doi: 10.1097/HPC.000000000000171.
- Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, Yasuzawa-Amano S, Trofimova I, Siggins RW, Lecapitaine N, Cascapera S, Beltrami AP, D'Alessandro DA, Zias E, Quaini F, Urbanek K, Michler RE, Bolli R, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(35):14068–73. doi: 10.1073/pnas.0706760104.
- Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med*. 1996;335(16):1182–9. doi: 10.1056/NEJM199610173351603.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410(6829):701–5. doi: 10.1038/35070587.
- Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001;107(11):1395–402. doi: 10.1172/JCI12150.
- Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106(24):3009–17. doi: 10.1161/01.cir.0000043246.74879.cd.
- Bolli R, Chugh AR, D'Amaro D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, Beache GM, Wagner SG, Leri A, Hosoda T, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011;378(9806):1847–57. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61590-0. Retracted article (*Lancet*. 2019;393(10176):1084. doi: 10.1016/S0140-6736(19)30542-2).
- Packer M. The alchemist's nightmare: might mesenchymal stem cells that are recruited to repair the injured heart be transformed into fibroblasts rather than cardiomyocytes? *Cir-*



- ulation. 2018;137(19):2068–73. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032190.
11. Lee SH, Hong JH, Cho KH, Noh JW, Cho HJ. Discrepancy between short-term and long-term effects of bone marrow-derived cell therapy in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):153. doi: 10.1186/s13287-016-0415-z.
 12. Gneccchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.* 2006;20(6):661–9. doi: 10.1096/fj.05-5211.com.
 13. Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008;103(11):1204–19. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.176826.
 14. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9). pii: E1852. doi: 10.3390/ijms18091852.
 15. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
 16. Julian K, Yuhasz N, Hollingsworth E, Imitola J. The "Growing" Reality of the Neurological Complications of Global "Stem Cell Tourism". *Semin Neurol.* 2018;38(2):176–81. doi: 10.1055/s-0038-1649338.
 17. Gapska P, Kurpisz M. Perspective in optimization of stem cell therapies for heart regeneration. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2017;71(0):975–87. doi: 10.5604/01.3001.0010.6665.
 18. Mohammadi D. The dangers of unregulated stem-cell marketing. *Lancet.* 2017;390(10105):1823–4. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32358-9.
 19. Wu SM, Hochedlinger K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol.* 2011;13(5):497–505. doi: 10.1038/ncb0511-497.
 20. Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Perez-Terzic C, Ikeda Y, Terzic A. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation.* 2009;120(5):408–16. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.865154.
 21. Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, Kawamura T, Kuratani T, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation.* 2012;126(11 Suppl 1):S29–37. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.084343.
 22. Morris GM, Boyett MR. Perspectives – biological pacing, a clinical reality? *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2009;3(6):479–83. doi: 10.1177/1753944709345792.
 23. Xiao YF, Sigg DC. Biological approaches to generating cardiac biopacemaker for bradycardia. *Sheng Li Xue Bao.* 2007;59(5):562–70.
 24. Ambesh P, Kapoor A. Biological pacemakers: Concepts and techniques. *Natl Med J India.* 2017;30(6):324–6. doi: 10.4103/0970-258X.239072.
 25. Gaetani R, Doevendans PA, Metz CH, Alblas J, Messina E, Giacomello A, Sluijter JP. Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells. *Biomaterials.* 2012;33(6):1782–90. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.003.
 26. Chimenti I, Massai D, Morbiducci U, Beltrami AP, Pesce M, Messina E. Stem cell spheroids and ex vivo niche modeling: rationalization and scaling-up. *J Cardiovasc Transl Res.* 2017;10(2):150–66. doi: 10.1007/s12265-017-9741-5.
 27. Salvi M, Morbiducci U, Amadeo F, Santoro R, Angelini F, Chimenti I, Massai D, Messina E, Giacomello A, Pesce M, Molinari F. Automated segmentation of fluorescence microscopy images for 3D cell detection in human-derived cardiospheres. *Sci Rep.* 2019;9(1):6644. doi: 10.1038/s41598-019-43137-2.
 28. Pati F, Jang J, Ha DH, Won Kim S, Rhee JW, Shim JH, Kim DH, Cho DW. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun.* 2014;5:3935. doi: 10.1038/ncomms4935.
 29. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):773–85. doi: 10.1038/nbt.2958.
 30. Hockaday LA, Kang KH, Colangelo NW, Cheung PY, Duan B, Malone E, Wu J, Girardi LN, Bonassar LJ, Lipson H, Chu CC, Butcher JT. Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. *Biofabrication.* 2012;4(3):035005. doi: 10.1088/1758-5082/4/3/035005.
 31. Rajabi S, Pahlavan S, Ashtiani MK, Ansari H, Abbasalideh S, Sayahpour FA, Varzideh F, Kostin S, Aghdami N, Braun T, Baharvand H. Human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitor cells efficiently colonize in bFGF-tethered natural matrix to construct contracting humanized rat hearts. *Biomaterials.* 2018;154:99–112. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.054.
 32. Duan B. State-of-the-art review of 3D bioprinting for cardiovascular tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* 2017;45(1):195–209. doi: 10.1007/s10439-016-1607-5.
 33. Слотвицкий ММ, Цвелая ВА, Фролова ШР, Дементьева ЕВ, Агладзе КИ. Исследование функциональности получаемых из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток кардиомиоцитов для моделирования сердечных аритмий при синдроме удлиненного интервала QT. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2018;22(2):187–95. doi: 10.18699/VJ18.346. [Slotvitsky MM, Tsvelaya VA, Frolova SR, Dement'eva EV, Agladze KI. The study of the functionality of cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells for the modeling of cardiac arrhythmias based on long QT syndrome. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2018;22(2):187–95. Russian. doi: 10.18699/VJ18.346.
 34. Slotvitsky M, Tsvelaya V, Frolova S, Dementyeva E, Agladze K. Arrhythmogenicity Test Based on a Human-Induced Pluripotent Stem Cell (iP-SC)-Derived Cardiomyocyte Layer. *Toxicol Sci.* 2019;168(1):70–7. doi: 10.1093/toxsci/kfy274.
 35. Kadota S, Minami I, Morone N, Heuser JE, Agladze K, Nakatsuji N. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. *Eur Heart J.* 2013;34(15):1147–56. doi: 10.1093/eurheartj/ehs418.
 36. Agladze K, Kay MW, Krinsky V, Sarvazyan N. Interaction between spiral and paced waves in cardiac tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(1):H503–13. doi: 10.1152/ajpheart.01060.2006.
 37. Orlova Y, Magome N, Liu L, Chen Y, Agladze K. Electrospun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue. *Biomaterials.* 2011;32(24):5615–24. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.042.
 38. Yang J, Yamato M, Shimizu T, Sekine H, Ohashi K, Kanzaki M, Ohki T, Nishida K, Okano T. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials.* 2007;28(34):5033–43. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.052.
 39. Williams C, Xie AW, Yamato M, Okano T, Wong JY. Stacking of aligned cell sheets for layer-by-layer control of complex tissue structure. *Biomaterials.* 2011;32(24):5625–32. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.050.
 40. Williams C, Tsuda Y, Iseberg BC, Yamato M, Shimizu T, Okano T, Wong JY. Aligned cell sheets grown on thermo-responsive substrates with microcontact printed protein patterns. *Advanced Materials.* 2009;21:2161–4. doi: 10.18699/vj18.346.
 41. Takahashi H, Okano T. Thermally-triggered fabrication of cell sheets for tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;138:276–92. doi: 10.1016/j.addr.2019.01.004.
 42. Stoehr A, Hirt MN, Hansen A, Seiffert M, Conradi L, Uebeler J, Limbourg FP, Eschenhagen T. Spontaneous formation of extensive vessel-like structures in murine engineered heart tissue. *Tissue Eng Part A.* 2016;22(3–4):326–35. doi: 10.1089/ten.TEA.2015.0242.
 43. Kaully T, Kaufman-Francis K, Lesman A, Levenberg S. Vascularization – the conduit to viable engineered tissues. *Tissue Eng Part B Rev.* 2009;15(2):159–69. doi: 10.1089/ten.teb.2008.0193.
 44. Sekine H, Shimizu T, Hobo K, Sekiya S, Yang J, Yamato M, Kurosawa H, Kobayashi E, Okano T. Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. *Circulation.* 2008;118(14 Suppl):S145–52. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.757286.
 45. Sukmana I. Microvascular guidance: a challenge to support the development of vascularised tissue engineering construct. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:201352. doi: 10.1100/2012/201352.



46. Paez-Mayorga J, Hernández-Vargas G, Ruiz-Esparza GU, Iqbal HMN, Wang X, Zhang YS, Parra-Saldivar R, Khademhosseini A. Bioreactors for cardiac tissue engineering. *Adv Healthc Mater.* 2019;8(7):e1701504. doi: 10.1002/adhm.201701504.
47. Christalla P, Hudson JE, Zimmermann WH. The cardiogenic niche as a fundamental building block of engineered myocardium. *Cells Tissues Organs.* 2012;195(1–2):82–93. doi: 10.1159/000331407.
48. Hogan M, Chen YT, Kolhatkar AG, Candelari CJ, Madala S, Lee TR, Birla R. Conditioning of cardiovascular tissue using a noncontact magnetic stretch bioreactor with embedded magnetic nanoparticles. *CS Biomater Sci Eng.* 2016;2(9):1619–29. doi: 10.1021/acsbomaterials.6b00375.
49. Chauveau S, Brink PR, Cohen IS. Stem cell-based biological pacemakers from proof of principle to therapy: a review. *Cytotherapy.* 2014;16(7): 873–80. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.02.014.
50. Morris GM, Kingston PA, Lei M, Dobrzynski H, Robinson RB, Boyett MR. A cardiac biopacemaker created by acceleration of a subsidiary pacemaker via adenovirus mediated expression of a chimaeric pacemaker channel, HCN212. *European Heart Journal.* 2010;31 Suppl 1:77.
51. Chauveau S, Anyukhovskiy EP, Ben-Ari M, Naor S, Jiang YP, Danilo P Jr, Rahim T, Burke S, Qiu X, Potapova IA, Doronin SV, Brink PR, Binah O, Cohen IS, Rosen MR. Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes provide in vivo biological pacemaker function. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2017;10(5):e004508. doi: 10.1161/CIRCEP.116.004508.
52. Balashov VA, Agladze KI. Model implantation of photosensitive cells reveals necessary cluster size needed for pacing of the heart culture. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 2018;50(6):524–5. doi: 10.1007/s10863-018-9775-7.
53. Balashov V, Chepeleva E, Tselaya V, Slotvitsky M, Pavlova S, Ponomarenko A, Dokuchaeva A, Vasilieva M, Krasilnikova A, Strelnikov A, Agladze K, Pokushalov E, Sergeevichev D. Use of Poly(lactic) nanofibrous scaffolds as a substrate for cardiomyocytes cultivation. *AIP Conference Proceedings.* 2018;2051(1):020024. doi: 10.1063/1.5083267.

Cell technologies in the regenerative medicine of the heart: main problems and ways of development

K.I. Agladze¹

The potential of heart tissues for self-regeneration is not high and supposedly limited to a small number of the niche stem cells. This makes it extremely important to develop regenerative technologies for the myocardium based on modern techniques, for instance, cell re-programming and 3D bioprinting. However, it is often difficult to differentiate the sensational reports regularly appearing in mass media on “breakthrough” technologies from those that really have practical applications. The article sets out a point of view on the popular technologies for the regeneration of cardiac tissues and myocardium as a whole and reviews their drawbacks. The main problems of the bioprinting approach being actively developed include a low differentiation level with printing by stem cells that does not allow for a full-fledged cardiac tissue without foreign inclusions, as well as technological impossibility, when printing with stem cells, to set up their links with other cells during cell delivery in their corresponding matrix locations. Despite some optimistic reports on the good performance on stem or induced pluripotent cells injections

into the myocardial injury zone that were first made public about 20 years ago, nowadays this idea seems rather doubtful, because in the recent years there has been virtually no positive effect of this procedure with a serious risk of complications. As far as growing of heart muscle elements is concerned, the main challenge is the development of the “proper” vascularization of the muscle being grown. At the same time, one has to emphasize practical feasibility of growing relatively small myocardial elements, such as sinus node.

Key words: myocardium, regeneration, stem cells, induced pluripotent stem cells, tissue engineering

For citation: Agladze KI. Cell technologies in the regenerative medicine of the heart: main problems and ways of development. *Almanac of Clinical Medicine.* 2019;47(7):623–9. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-043.

Received 25 June 2019; accepted 5 August 2019; published online 23 August 2019

Konstantin I. Agladze – PhD (in Physics and Mathematics), Professor, Head of the Laboratory of Biophysics of Excitable Systems¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9258-436X> ✉ 9 Institutskiy pereulok, Dolgoprudny, Moskovskaya oblast', 141701, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 408 46 45. E-mail: kagladze@gmail.com

Conflict of interests

The author declares that he has no conflict of interest.

Acknowledgments

A proportion of the illustrations used in the article has been created as the results of the studies performed under the Russian Research Foundation grant No. 16-14-10091.

¹ Moscow Institute of Physics and Technology; 9 Institutskiy pereulok, Dolgoprudny, Moskovskaya oblast', 141701, Russian Federation



Точка зрения

Применение искусственного интеллекта для анализа медицинских данных

Бурсов А.И.¹

Искусственный интеллект (ИИ) и машинное обучение успешно применяются в медицине и решают широкий круг задач, постепенно превращаясь из вспомогательного инструмента в хороших помощников медицинского персонала. В основе работы ИИ лежит анализ медицинских данных и их обработка по заданным алгоритмам. В настоящее время анализируются не только данные объективного осмотра и анамнеза пациента, но и результаты анализов и обследований на медицинском оборудовании. Применение подобных инструментов повышает эффективность врача, избавляя его от выполнения ряда рутинных операций, таких как ведение

части медицинской документации и описание нормы при проведении обследований. Одна из значимых проблем применения ИИ в медицине – подготовка корректных медицинских данных для обучения алгоритмов, так как для этого требуется большое количество времени специалистов узкого профиля. Возможным решением видится создание объединенной платформы хранения медицинских данных, где врачи смогут готовить данные для применения ИИ в своей специальности. Это позволит в будущем повысить эффективность применения машинного обучения в медицине благодаря анализу разноплановых данных из различных источников.

Ключевые слова: искусственный интеллект, анализ медицинских данных, машинное обучение в медицине

Для цитирования: Бурсов АИ. Применение искусственного интеллекта для анализа медицинских данных. Альманах клинической медицины. 2019;47(7):630–3. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-071.

Поступила 01.10.2019; доработана 18.11.2019; принята к публикации 26.11.2019; опубликована онлайн 09.12.2019

В настоящее время искусственный интеллект (ИИ) и машинное обучение применяются в различных областях медицины и позволяют решать широкий круг задач: от определения патологии на рентгенологических снимках до постановки диагноза и составления плана лечения на основании данных из истории болезни пациента [1]. В настоящей статье рассматриваются некоторые пути приложения ИИ к анализу различных типов медицинских данных и основные возможности, которые подобные решения предоставляют врачу-клиницисту и пациенту.

Анализ графической информации

Радиология была одним из первых направлений в медицине, где ИИ начали применять для анализа изображений. Врачи-рентгенологи получили возможность обрабатывать изображения в автоматическом режиме, отфильтровывать норму и делать заключения только для снимков, помеченных программой как патологические [2]. Позднее, благодаря накоплению новых данных, системы ИИ научились классифицировать снимки по различным патологиям, определяя то или иное состояние с вероятностью от 0 до 100% [3]. Сегодня происходит переход от ретроспективного анализа к прогностической модели – алгоритмы

Бурсов Андрей Игоревич – советник по информационным технологиям в медицине и здравоохранении¹
✉ 109004, г. Москва, ул. А. Солженицына, 25, Российская Федерация. Тел.: +7 (495) 912 46 14. E-mail: bursov@ispras.ru

учатся определять риск развития таких патологий, как инсульт или распространение метастазов при новообразованиях головы и шеи, до их фактического появления. В перспективе это может способствовать оказанию помощи на раннем этапе заболевания и уменьшению потенциального риска для здоровья [4, 5].

Одна из областей применения ИИ – офтальмология, где алгоритмы машинного обучения используются для поиска патологических изменений на глазном дне: диабетической ретинопатии, возрастной макулярной дегенерации, новообразованных сосудов. На изображениях переднего отрезка глаза распознаются врожденная катаракта, кератоконус, эктазия роговицы [6, 7]. Это позволяет врачу-офтальмологу тратить меньше времени на идентификацию патологии и, потенциально, использовать подобные решения в скрининговых исследованиях.

Искусственный интеллект активно применяется в лабораторной диагностике, микроскопии, микробиологии, патоморфологии. С помощью фото- и видеофиксации можно использовать алгоритмы анализа изображений и машинного обучения для автоматической идентификации тканей, сегментирования отдельных клеток, определения и измерения патологических очагов непосредственно

¹ ФГБУН Институт системного программирования им. В.П. Иванникова РАН; 109004, г. Москва, ул. А. Солженицына, 25, Российская Федерация



в процессе исследования. Подобные результаты нашли широкое применение в таких областях медицины, как онкология, гепатология, кардиология, внося свой вклад в повышение качества диагностики и лечения [8].

Современные системы анализа изображений способны генерировать текстовые описания результатов своей работы, что избавляет специалиста от необходимости писать заключение вручную.

Перспективным направлением для исследований и разработок в области анализа изображений представляется анализ изображений низкого качества и отсканированных с бумажных носителей. Информация, хранимая на бумажных носителях (амбулаторные карты, истории болезни, распечатки исследований), при оцифровке составит более полную картину состояния здоровья пациента. С технологической точки зрения подобные разработки позволят более точно обучать существующие системы ИИ.

Анализ медицинских данных с приборов

Среди наиболее востребованных направлений анализа медицинских данных с приборов выделяется дистанционное снятие и расшифровка электрокардиограммы. Процесс выстраивается следующим образом: пациент использует мобильный кардиограф, устройство передает данные на смартфон, откуда они отправляются в облачное хранилище для расшифровки, после чего заключение и рекомендации приходят на мобильный телефон или электронную почту пользователя [9].

По описанной схеме работают и другие приборы, например, термометры, тонометры и прочие носимые устройства [10, 11], информация с которых может сохраняться и использоваться для последующего анализа [12].

Для дальнейших исследований представляет интерес применение данных с носимых спортивных устройств (пульсометры) в медицинских целях. В настоящее время портативные пульсометры и фитнес-браслеты по точности данных уступают стационарному медицинскому оборудованию. Но ежегодно выпускаются новые модели устройств, что дает основания надеяться на постепенное повышение точности данного класса приборов. Возможность получать и обрабатывать данные о пульсе, сне и активности человека видится важной технологической и медицинской задачей. Таким образом решается вопрос о мониторинге состояния здоровья человека в постоянном режиме (фитнес-браслеты) и периодически, например, во время тренировок несколько раз в неделю

(пульсометры), в отличие от более информативного, но гораздо менее регулярного посещения врача.

Обработка естественного языка

Обработка естественного языка (англ. natural language processing, NLP) – научная область на стыке информатики, ИИ и лингвистики, изучающая проблемы компьютерного анализа и синтеза текстов и речи на естественных языках.

В медицине NLP применяется в нескольких направлениях. Одно из них – семантический анализ медицинских текстов и информационный поиск, когда система анализирует записи врача и категоризирует их по заданным параметрам. Это позволяет машине корректно фильтровать различающиеся формулировки одного и того же диагноза у разных специалистов [13]. Другое направление сопряжено с извлечением информации, то есть обработкой большого объема текстовых данных. В частности, при анализе результатов клинических исследований алгоритм выделяет в тексте термины и темы, а также формирует короткий отчет [14].

К малоизученным направлениям исследований в области анализа естественного языка относится сопоставление и анализ медицинских данных и информации из социальных сетей. Так, если после операции по протезированию коленного сустава пациент решает пробежать марафон, система анализирует профиль пользователя в социальной сети, фиксирует повышение нагрузки и изнашиваемости сустава и отправляет пациенту уведомление о необходимости прохождения контрольного осмотра раньше срока, назначенного врачом.

Анализ речи

Анализ речи используется в логопедии для обнаружения и диагностики речевых нарушений [15, 16]. А в перспективе можно будет проводить количественную оценку улучшения состояния речевых функций пациента в процессе и после лечения (в противовес субъективной оценке динамики).

Другая область применения анализа речи – психиатрия, где с помощью этой технологии определяют уровень стресса [17] и апатии у взрослых [18].

В клинической практике используются голосовые помощники. Они дают возможность перевести речь врача в текст, например, при ведении медицинской документации, или выполнить простейшие действия на компьютере [18, 19].

В настоящее время количество технологий распознавания голоса невелико, наиболее интересным вектором развития этого направления



представляется усовершенствование голосовых помощников для работы с различными языками, акцентами, медицинскими специальностями, в условиях присутствия посторонних шумов и других мешающих факторов.

Проблематика разметки медицинских данных

Для обучения алгоритмов необходимо, чтобы данные, которые они анализируют, были корректно размечены (например, на рентгеновском снимке специалист обрисовывает область затемнения и помечает ее для программы как патологический очаг). Сейчас большинство медицинских данных размечаются врачами в ручном режиме. У этого подхода есть ряд недостатков: децентрализация – отсутствие единой платформы, где врачи могут размечать медицинские данные; дороговизна – высокая стоимость рабочего времени квалифицированного специалиста; отрыв от работы – специалист во время разметки данных не может заниматься лечебной деятельностью; необходимость достаточной квалификации – качественную разметку данных может проводить только специалист узкого профиля.

Возможным решением проблемы видится создание указанной платформы, собирающей медицинские данные из разных источников и позволяющей медицинским работникам размечать их в формате краудсорсинга (мобилизация ресурсов большого количества людей с целью решения определенных задач [20]).

Проблематика внедрения искусственного интеллекта в медицину

Одной из наиболее значимых проблем полноценного внедрения ИИ в медицину остается отсутствие сформированной законодательной базы

и регулирующих органов. Первым шагом к решению данной задачи стал закон о телемедицине, вступивший в силу 1 января 2018 года. Однако на момент написания данной статьи закона, разъясняющего применение ИИ в медицине, не принято.

Следующим проблемным моментом является недостаточность верифицированных медицинских данных и сам подход к верификации, поскольку мнения двух специалистов могут различаться в каждом конкретном клиническом случае, и не представляется возможным приоритизировать решение одного из них (при условии схожести квалификации и опыта работы).

Нельзя не упомянуть трудности, связанные с защитой информации. Наибольшую опасность здесь представляет передача данных с медицинских приборов, так как многие из них обладают низкой степенью защиты, что позволяет третьим лицам не только получать незащищенные медицинские данные, но и подделывать их, саботируя работу медицинского персонала [21].

Заключение

Искусственный интеллект все больше проникает в медицину. Количество коммерческих компаний, разрабатывающих технологические решения для нужд здравоохранения, растет с каждым годом. Уже сейчас ИИ может стать хорошим помощником врача для определения одной или нескольких патологий. К сожалению, область применения ИИ преимущественно ограничивается решением точечных проблем. Это связано с малым количеством верифицированных данных, низкой степенью защиты медицинских приборов и отсутствием законодательной базы. В перспективе наибольшую эффективность будут иметь системы, способные комплексно анализировать разноплановые данные из различных источников. ©

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Конфликт интересов

Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Литература / References

1. Mintz Y, Brodie R. Introduction to artificial intelligence in medicine. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2019;28(2):73–81. doi: 10.1080/13645706.2019.1575882.
2. Amisha, Malik P, Pathania M, Rathaur VK. Overview of artificial intelligence in medicine. *J Family Med Prim Care.* 2019;8(7):2328–31. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc_440_19.
3. Choy G, Khalilzadeh O, Michalski M, Do S, Samir AE, Pianykh OS, Geis JR, Pandharipande PV, Brink JA, Dreyer KJ. Current applications and future impact of machine learning in radiology. *Radiology.* 2018;288(2):318–28. doi: 10.1148/radiol.2018171820.
4. Panzarasa S, Quaglini S, Miciceli G, Marcheselli S, Pessina M, Pernice C, Cavallini A, Stefanelli M. Improving compliance to guidelines through workflow technology: implementation and results in a stroke unit. *Stud Health Technol Inform.* 2007;129(Pt 2):834–9.
5. Forghani R, Chatterjee A, Reinhold C, Pérez-Lara A, Romero-Sanchez G, Ueno Y, Bayat M, Alexander JWM, Kadi L, Chankowsky J, Seuntjens J, Forghani B. Head and neck squamous



- cell carcinoma: prediction of cervical lymph node metastasis by dual-energy CT texture analysis with machine learning. *Eur Radiol.* 2019;29(11):6172–81. doi: 10.1007/s00330-019-06159-y.
6. Aeffner F, Zarella MD, Buchbinder N, Bui MM, Goodman MR, Hartman DJ, Lujan GM, Molani MA, Parwani AV, Lillard K, Turner OC, Vemuri VNP, Yuil-Valdes AG, Bowman D. Introduction to digital image analysis in whole-slide imaging: a white paper from the digital pathology association. *J Pathol Inform.* 2019;10:9. doi: 10.4103/jpi.jpi_82_18.
 7. Roach L. Artificial Intelligence. *EyeNet Magazine.* 2017;11:77–83.
 8. Padhy SK, Takkar B, Chawla R, Kumar A. Artificial intelligence in diabetic retinopathy: A natural step to the future. *Indian J Ophthalmol.* 2019;67(7):1004–9. doi: 10.4103/ijo.IJO_1989_18.
 9. Hsieh JC, Hsu MW. A cloud computing based 12-lead ECG telemedicine service. *BMC Med Inform Decis Mak.* 2012;12:77. doi: 10.1186/1472-6947-12-77.
 10. Goumopoulos C. A high precision, wireless temperature measurement system for pervasive computing applications. *Sensors (Basel).* 2018;18(10):3445. doi: 10.3390/s18103445.
 11. Yetisen AK, Martinez-Hurtado JL, Ünal B, Khademhosseini A, Butt H. Wearables in Medicine. *Adv Mater.* 2018;30(33):e1706910. doi: 10.1002/adma.201706910.
 12. Benke K, Benke G. Artificial intelligence and big data in public health. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(12):2796. doi: 10.3390/ijerph15122796.
 13. Chen PH. Essential elements of natural language processing: what the radiologist should know. *Acad Radiol.* 2019;S1076–6332(19):30417–9. doi: 10.1016/j.acra.2019.08.010.
 14. Garg R, Oh E, Naidech A, Kording K, Prabhakaran S. Automating ischemic stroke subtype classification using machine learning and natural language processing. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2019;28(7):2045–51. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.02.004.
 15. Powell ME, Rodriguez Cancio M, Young D, Nock W, Abdelmessih B, Zeller A, Perez Morales I, Zhang P, Garrett CG, Schmidt D, White J, Gelbard A. Decoding phonation with artificial intelligence (DeP AI): Proof of concept. *Laryngoscope Investig Otolaryngol.* 2019;4(3):328–34. doi: 10.1002/liv.2.259.
 16. Wu H, Soraghan J, Lowit A, Di Caterina G. Convolutional neural networks for pathological voice detection. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2018;2018:1–4. doi: 10.1109/EMBC.2018.8513222.
 17. Slavich GM, Taylor S, Picard RW. Stress measurement using speech: Recent advancements, validation issues, and ethical and privacy considerations. *Stress.* 2019;22(4):408–13. doi: 10.1080/10253890.2019.1584180.
 18. König A, Linz N, Zeghari R, Klinge X, Tröger J, Alexandersson J, Robert P. Detecting apathy in older adults with cognitive disorders using automatic speech analysis. *J Alzheimers Dis.* 2019;69(4):1183–93. doi: 10.3233/JAD-181033.
 19. Sun O, Chen J, Magrabi F. Using voice-activated conversational interfaces for reporting patient safety incidents: A technical feasibility and pilot usability study. *Stud Health Technol Inform.* 2018;252:139–44.
 20. Хау Дж. Краудсорсинг. Коллективный разум как инструмент развития бизнеса. М.: Альпина Паблишер; 2012. 288 с. [Howe J. Crowdsourcing: Why the power of the crowd is driving the future of business. Crown Business; 2009. 336 p.]
 21. BGU researchers first to show how hackers can dupe radiologists and A.I. software by manipulating lung cancer scans. Ben-Gurion University of the Negev. 04.09.2019 [Internet]. Available from: https://in.bgu.ac.il/en/pages/news/scans_hacking.aspx.

Application of artificial intelligence in medical data analysis

A.I. Bursov¹

Artificial intelligence (AI) and machine learning are successfully used in medicine and solve a wide spectrum of tasks, gradually evolving from an additional tool into good assistants of medical personnel. The AI functioning is based on the analysis of medical data and their managements according to preset algorithms. Currently not only data obtained by objective examination and history assessment of the patient are used, but also results of the laboratory work-up and instrumental investigations. The use of such tools improves a physician's efficacy, releasing him from performance of a number of routine procedures, such as maintenance of a part of medical records and description of normal results of assessments. One of the important challenges of the AI use in medicine is the preparation of correct medical data for algorithm learning that requires a lot of time allocated by subject matter specialists. A potential

solution could be a creation of a unified platform for medical findings archiving, where clinicians would be able to prepare data for the use of AI in their specialties. In future, it would make it possible to improve the efficacy of machine learning in medicine due to analysis of diverse data from various sources.

Key words: artificial intelligence, medical data analysis, machine learning in medicine

For citation: Bursov AI. Application of artificial intelligence in medical data analysis. *Almanac of Clinical Medicine.* 2019;47(7):630–3. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-071.

Received 1 October 2019; revised 18 November 2019; accepted 26 November 2019; published online 9 December 2019

Conflict of interests

The author declares that he has no conflict of interests.

Andrey I. Bursov – Advisor for Information Technologies in Medicine and Healthcare¹
 ✉ 25 A. Solzhenitsyna ul., Moscow, 109004, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 912 46 14.
 E-mail: bursov@ispras.ru

¹Ivannikov Institute for System Programming of the Russian Academy of Sciences; 25 A. Solzhenitsyna ul., Moscow, 109004, Russian Federation



Точка зрения

Современное состояние и перспективные инновационные направления развития способов стерилизации биоимплантатов

Розанов В.В.^{1,2} • Матвейчук И.В.²

Розанов Владимир Викторович – канд. физ.-мат. наук, д-р биол. наук, доцент, вед. науч. сотр. научного центра гидрофизических исследований физического факультета, профессор кафедры физики ускорителей и радиационной медицины физического факультета¹; заведующий лабораторией научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3243-8782>; ResearcherID: E-5959-2017

✉ 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1/2, МГУ, физический факультет, Центр гидрофизических исследований, Российская Федерация. Тел.: +7 (495) 939 13 44. E-mail: vrozanov@mail.ru

Матвейчук Игорь Васильевич – д-р биол. наук, профессор, руководитель научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6220-4429>; ResearcherID: AAE-8495-2019

✉ 123056, г. Москва, ул. Красина, 2, НИЦ БМТ ФГБНУ ВИЛАР, Российская Федерация. Тел.: +7 (499) 254 46 49. E-mail: nizbmtvilar@gmail.com

Авторами проанализировано современное состояние способов стерилизации костных имплантатов. Проблема создания эффективных способов стерилизации биоимплантатов еще далека от оптимального решения и остается актуальной. Среди причин, ограничивающих дальнейшее развитие основных методов стерилизации биоматериалов, выделяется наличие ограничений, связанных с применением каждого из существующих способов в отдельности, а также использование технологий стерилизующего воздействия. Сравнительный анализ основных методик стерилизации биоимплантатов, используемых в медико-биологических приложениях (обработка оксидом этилена, радиационное воздействие, обработка влажным теплом, использование жидких сред, озонная стерилизация), позволяет сделать вывод о преимуществах применения радиационной стерилизации. Однако при таком выборе возникает дилемма: повышение дозы облучения усиливает стерилизационный эффект радиационной обработки, но в то же время приводит к многочисленным морфологическим изменениям тканей, ухудшению их механических характеристик, разрушению морфогенетических белков и, как прямое следствие, – к снижению эффективности процесса репаративного остеогенеза. В результате отмеченных изменений пластический материал может оказаться непригодным для клинического применения. Одним из реальных подходов к решению указанной проблемы представляется максимально возможное снижение дозы поглощения в процессе радиационной обработки биоматериалов, по крайней мере до величины порядка 15 кГр. Разработки авторов последних лет показывают, что

достижение такого результата может быть обеспечено путем использования комбинированных методик стерилизации, основанных на сочетанном воздействии на стерилизуемый пластический материал физических и химических факторов. При взаимном усилении стерилизующего воздействия этих факторов создаются предпосылки для их синергетического эффекта, а интенсивность воздействия каждого из факторов может быть снижена. Это позволяет уменьшить и степень вредного побочного действия каждого из них в отдельности при усилении суммарного эффекта. Успех поиска инновационных подходов к решению актуальных проблем стерилизации костных биоимплантатов, к разработке современных здоровьесберегающих технологий может быть обеспечен только благодаря объединению усилий специалистов смежных наук, что позволит создать прорывные технологии в области стерилизации и оптимизировать данный процесс при достижении его высокой эффективности.

Ключевые слова: биоимплантология, костная ткань, озон, стерилизация, радиационное воздействие

Для цитирования: Розанов ВВ, Матвейчук ИВ. Современное состояние и перспективные инновационные направления развития способов стерилизации биоимплантатов. Альманах клинической медицины. 2019;47(7):634–46. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-063.

Поступила 08.07.2019; доработана 06.11.2019; принята к публикации 07.11.2019; опубликована онлайн 22.11.2019

¹ ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1, Российская Федерация

² ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» Минобрнауки России; 117216, г. Москва, ул. Грина, 7, Российская Федерация



Биологический пластический материал, используемый при проведении реконструктивно-восстановительных операций в травматологии, ортопедии, челюстно-лицевой, спинальной хирургии, при хирургических вмешательствах, связанных с заменой тех или иных фрагментов органов и тканей, должен удовлетворять различным специфическим условиям и требованиям, главным из которых можно считать непременно высокий уровень безопасности, исключающий возможность внесения любых инфекций в организм реципиента. В этой связи технологические процессы, обеспечивающие стерильность пересаживаемых имплантатов, постоянно находятся в центре внимания. Наряду с этим существует и другая задача, решению которой в настоящее время уделяется недостаточно внимания, – обеспечение безопасности персонала тканевых банков. Эти сотрудники находятся в постоянном контакте с биоматериалом на всех этапах изготовления биоимплантатов, начиная с момента заготовки и первичной обработки биоматериала.

При наличии жестких правил отбора донорского материала и обязательного контроля за их выполнением на практике всегда сохраняется высокая степень риска, связанная с исходным инфицированием донорских тканей, как костной, так и мягких, крови и костного мозга. При этом удаление костного мозга с последующим вымораживанием фрагментов кортикальной и спонгиозной костной ткани, по данным специальных исследований [1], не обеспечивает надежной нейтрализации вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Аналогичные данные имеются и по другим биотканям, например, по крови. А эксперименты по криоконсервации при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 17 недель реберных хрящей, взятых у умерших от СПИДа доноров, показали лишь некоторое снижение вирусной активности без надежных гарантий безопасности для будущих реципиентов [2].

Даже при заготовке тканей в стерильных условиях при исследованиях аллоимплантатов на стерильность выявляются микроорганизмы с низкой патогенностью (а у 3% и с высокой – главным образом кожные штаммы) [3]. Исходная обсемененность заготавливаемого биоматериала может быть вызвана многими неконтролируемыми факторами – от инфицирования донора до нестерильных условий обработки и изготовления имплантата. Следовательно, на всех стадиях технологического процесса необходимы как тщательный контроль, так и выбор адекватных методов обработки и стерилизации биоматериала.

Сложность практического решения проблемы достижения необходимого уровня стерильности имплантатов связана еще и с тем, что любое стерилизующее воздействие (гипертермия, химическая, радиационная обработка и др.) может приводить к определенным изменениям свойств и характеристик биологических тканей. В свою очередь, это может негативно сказаться на возможности их дальнейшего использования как пластического материала [4–8]. Вышесказанное касается как изменения архитектоники образцов, так и денатурации белковых структур биоимплантатов [9].

Вопросы стерилизации биоимплантатов вообще и костных имплантатов в частности регулируются в Российской Федерации рядом национальных государственных и межгосударственных стандартов. Государственный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 14602-99 устанавливает, что требования к стерилизации имплантатов должны соответствовать положениям раздела 9 ГОСТ Р ИСО 14630-2017. При этом в существующих стандартах (как национальных, так и межгосударственных) в первую очередь определяется допустимая степень стерильности для имплантатов с финишной стерилизацией. Эта величина устанавливается как вероятностная характеристика, а именно как «вероятность того, что микроорганизм может выжить независимо от степени проведенной обработки». Подразумевается, что эффективность уничтожения патогенных микроорганизмов, достигаемая с помощью физических и химических воздействий в процессе стерилизации медицинских изделий, может быть описана экспоненциальной зависимостью. В этом случае всегда существует определенная вероятность выживания некоторого количества патогенов. Стандарт устанавливает: «...для имплантатов с финишной стерилизацией, маркированных надписью «СТЕРИЛЬНО», теоретическая вероятность присутствия жизнеспособных микроорганизмов должна быть не более 1×10^{-6} ».

В дополнение к этому важно подчеркнуть, что стерильные изделия медицинского назначения и в частности биоимплантаты относятся к той особой категории продукции, уровень стерильности которой невозможно проверить у каждого изделия путем осмотра или испытания. В силу данной особенности устанавливается, что «процессы стерилизации должны подвергаться валидации перед использованием, а выполнение процесса должно постоянно контролироваться». Более того, в последней редакции межгосударственного



стандарта ГОСТ ISO 11135-2017, действующего с 1 сентября 2018 г., прямо указывается: «...экспозиция правильно валидированному и точно контролируемому процессу стерилизации не является единственным фактором, связанным с обеспечением надежной гарантии того, что продукт стерилен и в этом отношении пригоден к использованию по назначению». Именно поэтому уделено внимание еще нескольким факторам, включающим в себя:

- а) «микробиологическое состояние входящих сырьевых материалов и/или компонентов;
- б) валидацию и текущее управление любыми процедурами очистки и дезинфекции, используемыми с продуктом;
- в) управление окружающей средой, в которой продукт производится или перерабатывается, собирается и упаковывается;
- г) управление оборудованием и процессами:
 - ✓ управление персоналом и его гигиеной;
 - ✓ способы упаковки и материалы, в которые продукт упаковывается;
 - ✓ условия хранения продукта».

Все эти вопросы и процессы регулируются специальной серией стандартов ГОСТ Р ИСО 9000. Уместно перечислить нормативные документы, которыми следует руководствоваться при использовании основных видов стерилизации. Так, применение при стерилизации имплантатов оксида этилена регламентируется ГОСТ ISO 11135-2017. Если имплантаты стерилизуют методом радиационной обработки, применяются ГОСТ ISO 11137-1-2011 и ГОСТ ISO 11137-2-2011. При использовании технологии паровой стерилизации необходимо руководствоваться ГОСТ ISO 17665-1-2009 (см. ГОСТ Р 56893-2016/ISO/TS 17665-2:2009). Для случая стерилизации жидкими средами имплантатов, содержащих материалы животного происхождения, применяется ГОСТ Р ИСО 14160-2003. Если имплантаты стерилизуют любым другим методом стерилизации, должен применяться ГОСТ Р ИСО 14937-2012.

Основные виды стерилизации биоимплантатов

Руководствуясь приведенным перечнем видов стерилизации, остановимся несколько подробнее на особенностях и характеристиках каждого из них.

Обработка оксидом этилена

Стерилизация оксидом этилена – довольно старый, достаточно универсальный и весьма распространенный метод низкотемпературной

стерилизации. Несмотря на имеющиеся критические замечания, этот метод и сегодня еще охватывает половину рынка. К его неоспоримым преимуществам можно отнести высокую эффективность, низкую стоимость и применимость для самых разных материалов. Это также ни в коем случае не единственный метод стерилизации, который создает потенциальную опасность в месте работы, и, подобно другим методам, устранение этих опасностей не включает решения, которые могут подорвать смысл и прибыльность его использования [10]. Достоинства метода также включают высокую проникающую способность газообразного реагента. Эксперименты показывают, что лиофилизированная губчатая и кортикальная кость не создают барьера для быстрой диффузии газа [11]. Некоторые исследователи считают, что для более эффективного проникновения окиси этилена в пористую структуру костной ткани целесообразно предварительно произвести ее очистку путем обезжиривания и сублимационной сушки [12]. При этом, по их мнению, удастся несколько снизить и отрицательное действие оксида этилена через уменьшение остаточного уровня содержания этиленоксида и его токсичных побочных продуктов после стерилизации. Вообще при реализации данной технологии уровню остаточного содержания оксида этилена в готовом изделии уделяется особое внимание. Эта величина должна быть не выше значения, установленного в специальном стандарте ГОСТ Р ИСО 10993-7-2009.

В целом вся процедура стерилизации биоимплантатов оксидом этилена жестко регламентирована положениями соответствующего стандарта (ГОСТ ISO 11135-2017). На подготовительном этапе в обязательном порядке проводится планирование процедуры стерилизации с определением целого ряда важных параметров, таких как температура, влажность, бионагрузка, время аэрации, целесообразность использования биологического индикатора для аттестации оборудования, текущего контроля и др. При необходимости для обеспечения оптимальных условий технологического процесса рекомендуется проводить предварительное кондиционирование обрабатываемого образца (выдерживание в условиях определенной температуры и влажности) для уменьшения продолжительности цикла стерилизации. Затем в камере стерилизатора выполняется обработка стерилизуемой загрузки с соблюдением равномерности распределения оксида этилена в объеме камеры, стабильности параметров (давления, температуры) в процессе



всего цикла обработки. На завершающей стадии в связи с высокой токсичностью стерилизующего агента особое внимание уделяется тщательному проведению цикла аэрации – выведения остаточного реагента из пористого объекта стерилизации. Процесс осуществляется с применением последовательных циклов понижения давления (вакуумирования) в стерилизационной камере и последующего заполнения ее стерильным воздухом. Процесс заканчивается загрузкой продукции в стерильную упаковку.

Как следует даже из такого краткого описания технологии стерилизации оксидом этилена, устанавливаемого в ГОСТ 11135-2017, этот процесс – достаточно сложный, многоступенчатый и длительный. Все выполняемые процедуры подробно прописаны и четко регламентированы, начиная от подготовки оборудования и заканчивая контролем за степенью стерилизации и обеспечением безопасности персонала. Опыт применения имплантатов, стерилизация которых осуществлялась по такой методике, свидетельствует о достаточно надежной стерильности пластического материала. Тем не менее отрицательные эффекты все же есть и их необходимо учитывать, хотя по этому вопросу существуют различные мнения.

С одной стороны, как уже отмечалось выше, метод газовой стерилизации с использованием оксида этилена сегодня занимает практически половину мирового рынка стерилизации оборудования, инструментария, изделий биомедицинского назначения. При этом положительные отзывы о его использовании датируются не только девяностыми годами прошлого века [13, 14], есть и совсем современные, основанные на результатах последних исследований, например, по поиску решения проблем использования эндоскопического оборудования [15]. Существует мнение, что несмотря на высокую токсичность используемого рабочего вещества, этот метод более безопасен и меньше повреждает ткани, чем автоклавирование или радиационное воздействие, и весьма эффективен для инактивации антигенных структур HBV, HCV и HIV в биоимплантатах. В вопросе влияния газовой стерилизации оксидом этилена на сохранность морфогенетических белков в костных имплантатах также нет единства и существуют прямо противоположные точки зрения [16, 17]. Ряд исследователей уверенно заявляют, что оксид этилена не только токсичен, но и способен вызывать иммунное отторжение имплантатов и даже мутагенный эффект у растений, бактерий и лабораторных животных [18]. Вместе

с тем и сегодня, в XXI веке, сторонники метода в некоторых странах (к примеру, в Польше) продолжают утверждать, что стерилизация оксидом этилена является наиболее универсальным и распространенным методом низкотемпературной стерилизации, который характеризуется высокой эффективностью, низкой стоимостью и пригодностью для широкого спектра материалов, а по степени его потенциальной опасности вполне сравним с другими технологиями [10].

Радиационная стерилизация

Использование ионизирующего излучения для целей стерилизации в последние десятилетия получает все более широкое распространение [4, 7]. Общий объем этих услуг в мире в стоимостном выражении занимает сегодня место, сопоставимое с долей стерилизации оксидом этилена. При этом радиационная обработка обладает рядом несомненных достоинств. Во-первых, это низкотемпературная технология, что крайне важно для биологических материалов; во-вторых, ее характеризует высокая проникающая способность и возможность обрабатывать материалы, помещенные в герметичную упаковку, которая не допускает вторичное инфицирование биоимплантатов, подвергающихся радиационному воздействию. Главным параметром такого воздействия является величина поглощенной дозы. В Российской Федерации, как и в большинстве стран, оптимальной считается доза в 25 кГр, что соответствует рекомендациям МАГАТЭ. Для обоснования именно такого значения был выполнен большой цикл специальных исследований [19]. Однако в некоторых банках тканей Европы и Америки такая доза считается недостаточной и приняты значения в 30 кГр и даже выше. Но и доза в 25 кГр весьма высокая и может приводить к существенным деструктивным изменениям тканей [20, 21].

Учитывая это, на всех стадиях изготовления имплантатов необходим тщательный промежуточный контроль, порядок которого регламентируется соответствующим государственным стандартом (ГОСТ Р ИСО 13485-2004).

В настоящее время преобладают комплексы радиационной стерилизации, основанные на постоянных источниках гамма-излучения. При этом интенсивно растет количество установок, где в качестве излучателей используются линейные ускорители электронов.

Наиболее простым и относительно недорогим считается метод с неподвижным источником гамма-излучения, в качестве



которого обычно используется радиоактивный изотоп ^{60}Co . В заводских условиях пеналы с радиоактивным изотопом помещают в специальные гамма-ячейки, через которые проходят стерилизуемые продукты, упакованные в герметичную тару. Обработка продолжается несколько часов, в течение которых обеспечивается получение необходимой поглощенной дозы. При этом обязателен контроль за уровнем активности изотопа, который характеризуется определенным временем полураспада.

Промышленные установки для стерилизации, использующие ускорители электронов высокой мощности, привлекательны тем, что их пропускная способность очень высока, а стоимость обработки на единицу продукции часто оказывается конкурентоспособной с традиционно используемыми методами химической стерилизации.

Появление в последние годы электронно-лучевых ускорителей следует рассматривать в качестве возможной альтернативы в радиационной стерилизации, так как они обладают рядом преимуществ по сравнению с источниками гамма-излучения, такими как: отсутствие проблем хранения, транспортировки и использования радиоактивных материалов; возможность сопряжения с процессом производства для непрерывной обработки; высокая производительность.

Для ускорителей электронов, которые используются для радиационной стерилизации, принята следующая классификация:

- низкоэнергетические: ускорители с энергией в диапазоне 400–700 кэВ, ширина луча от 0,5 до 1,5 м. Применяются для стерилизации поверхности тонких пленок, покрытий поверхности древесины и т.д.;
- среднеэнергетические: ускорители в диапазоне энергий от 1 до 5 МэВ. Данный тип ускорителей может обеспечить луч шириной от 0,5 до 1,8 м;
- высокоэнергетические: ускорители с энергией в диапазоне от 5 до 10 МэВ обеспечивают высокое проникновение и лучше всего подходят для массового облучения продукта. Данный тип ускорителей может обеспечить луч шириной до 1,8 м. Глубина проникновения электронов с энергией 10 МэВ обычно составляет 50 см (при облучении с обеих сторон) при плотности продукта порядка $0,2 \text{ г/см}^3$. Эта категория ускорителей обычно используется для медицинской стерилизации продукта, пищевой дезинсекции, очистки сточных вод.

Для облучения костных имплантатов лучше всего подходят высокоэнергетические

ускорители, поскольку обеспечивают достаточную глубину проникновения. Соединительные ткани имплантатов – кости, хрящи, сухожилия, связки – имеют неоднородности по молекулярному составу. В связи с этим должна быть максимальная проникающая способность при разумных дозах – в пределах 20 кГр.

Однако существующие методы не позволяют обеспечить идеальные условия стерилизации.

Любое радиационное воздействие на биологические ткани приводит не только к уничтожению патогенных микроорганизмов, но и к целому ряду нежелательных эффектов. В первую очередь следует указать на классический радиолит, происходящий в тканях при наличии в них воды. Процесс этот сопровождается разложением химических соединений. Продуктами радиолита являются свободные радикалы, перекисные радикалы с высокой реакционной способностью. Происходит формирование радиотоксинов, при взаимодействии свободных радикалов с белковыми молекулами нарушается структура белка, что, в свою очередь, может приводить к нарушению гормональной, рецепторной, ферментативной и других функций белка. Излучение негативно влияет и на мембранные структуры клеток.

Не менее существенны изменения, производимые ионизирующим излучением на макроуровне. При радиационном воздействии на биоткани *in vivo* эти изменения отмечаются уже при крайне малых поглощенных дозах. Результаты цикла комплексных исследований таких проявлений изложены в работе [22], где убедительно показано, что, начиная с дозы в 9 Гр, отмечаются первые структурные изменения. Выраженная rareфикация костной ткани, формирование микропереломов, образование грыж Шморля в позвонках, нарушение микроциркуляции в тканях, изменение структуры стенок сосудов – вот далеко не полный перечень морфологических и физиологических изменений и нарушений под действием ионизирующего излучения в тканях и органах живого организма. Следует также отметить, что те или иные эффекты могут проявляться не сразу после воздействия излучения, а через различные промежутки времени – от нескольких дней до нескольких лет.

Исследования разных авторов [4, 21, 23–25] показывают, что при воздействии *in vitro* изменения в тканях и различные морфофункциональные нарушения возникают при значительно (на 3 порядка) больших значениях поглощенной дозы. Отмечается, в частности, выраженная фрагментация коллагеновых волокон,



расщепление коллагеновых пучков, а при больших значениях дозы (25–60 кГр) – деструктивные изменения ткани с ее локальной гомогенизацией, разрушением волокон эндо- и перитенония, оплетающих коллагеновые пучки. Выраженные изменения свойств и характеристик биотканей наблюдаются как при воздействии гамма-облучения, так и при использовании пучков быстрых электронов. Существенно изменяются и механические характеристики тканей – уменьшается прочность при сжатии (до 35% при дозе 28 кГр) и растяжении (до 10% при дозе 35 кГр) [25]. Прочность на изгиб снижается на 11% при дозе 17 кГр, на 22% – при 30 кГр и даже до 65% при дозе в 65 кГр. С более подробным анализом этих и других изменений можно ознакомиться в обзоре [21]. Главный вывод, который можно сделать из этого анализа, состоит в том, что ионизирующее излучение является эффективным методом стерилизации биоматериалов, однако при высоких дозовых нагрузках, начиная с величины поглощенной дозы в 15 кГр, радиационное воздействие приводит к существенным морфофункциональным изменениям биологических имплантатов, и, следовательно, необходимо стремиться к максимально возможному снижению дозовой нагрузки (ниже 15 кГр), что позволяет сохранить характеристики биотканей. В то же время есть данные о том, что необходимую степень стерильности костных имплантатов в ряде случаев можно получить и при поглощенной дозе в 11 кГр [26].

Обработка влажным теплом

Технологии стерилизации изделий медицинского назначения, использующие влажное тепло, известны и практически применяются на протяжении не одного десятилетия. Эффективность стерилизационного воздействия при этом определяется оптимальным сочетанием двух основных параметров – температуры и продолжительности воздействия. Примеры комбинации минимальных рекомендуемых значений этих параметров приведены в ГОСТ Р 56893-2016/ISO/TS 17665-2:2009: при температуре 121 °C требуется обработка в течение 15 минут, при 126 °C – 10 минут, а при повышении температуры до 134 °C достаточно 3-минутной обработки.

В данном стандарте особо подчеркивается, что «все перечисленные комбинации базируются на концепции «полной гибели» с фактором безопасности, который был установлен для насыщенного пара или воды, имеющих контакт с микроорганизмом». При этом акцентируется

внимание на двух аспектах, связанных с эффективностью и безопасностью методики. Первый касается перегретого пара, который, как установлено, не обеспечивает дополнительных гарантий стерилизации, а, напротив, «ведет себя в большей степени подобно сухому воздуху (газу) и имеет низкую микробицидную активность по сравнению с насыщенным паром». Второй аспект относится к примесям, которые могут содержаться в стерилизующем агенте из-за наличия в воде, которую нагревают и превращают в пар, либо попадать в воду при контакте с материалами и поверхностями при выпаривании и подаче пара в стерилизатор. В любом случае наличие таких токсичных примесей должно контролироваться на всех этапах процесса, включая утилизацию отработанной жидкости.

Важен и параметр давления, так как необходимая температура может быть зачастую достигнута лишь при повышении давления. В различных справочных руководствах приводятся следующие средние цифры, характеризующие температуру водяного пара при кипении воды при различных значениях давления: при 1 атм – 120 °C, при 1,5 атм – 127 °C, при 2 атм – 134 °C. Соответственно, при использовании автоклавов длительность процесса стерилизации должна составлять при давлении 1 атм – 1 ч, при 1,5 атм – 45 мин, а при 2 атм – 30 мин. Однако такая обработка рекомендована для металлических и изделий медицинского назначения. Такое длительное высокотемпературное воздействие на биологические ткани сопряжено с деструктивными последствиями, связанными как с процессами денатурации белка, так и с возможными деформациями и локальными нарушениями структуры.

Вместе с тем имеются сообщения [27] о достаточно успешном применении паровой стерилизации при преобладающем мнении, что паростерилизованная кость обладает низкой механической стабильностью и ограниченной оссификацией, основанной на ремоделировании костной ткани с низкой деформацией. При этом существуют и оптимистические мнения относительно возможности тепловой инактивации ВИЧ-инфекции в аллоимплантатах при специальном режиме обработки [28, 29] с сохранением пластических свойств материала. Для инактивации вирусов в костных имплантатах предложен метод автоклавирувания в течение 30 минут при температуре 134 °C. Тем не менее широкого распространения данные разработки не получили.



Стерилизация с использованием жидких сред

Использование разнообразных жидких сред в качестве стерилизующего агента нашло более широкое применение в практике банков тканей. Эти методики неоднократно подвергались справедливой критике со стороны специалистов. В общем случае относительно процессов стерилизации медицинских изделий, содержащих материалы животного происхождения, соответствующий государственный стандарт (ГОСТ Р ИСО 14160-2003) содержит прямое указание на то, что «жидкие химические стерилизующие средства, традиционно используемые для стерилизации животных тканей в медицинских изделиях, могут быть неэффективны для инактивации патогенных агентов трансмиссивных губчатых форм энцефалопатий...». Тем не менее существует и положительный опыт стерилизации костных имплантатов с использованием жидких сред [30], свидетельствующий о том, что в этих случаях эффективная стерилизация сопровождалась сохранением исходных морфомеханических характеристик костных фрагментов.

Озоновая стерилизация

Особого внимания заслуживает описание технологии стерилизации с использованием озона. Известно, что озон характеризуется мощным стерилизующим действием.

Первые попытки медицинского использования озона предпринимались еще в XIX веке, о чем свидетельствует выданный в 1896 г. Николе Тесле патент на первый генератор озона. Начиная с 1910 г. он наладил их выпуск для медицинских целей.

В начале 30-х гг. XX века стартовало медицинское применение озона в Европе. В настоящее время он широко используется в косметологии, дерматологии, травматологии и ортопедии, ангиологии, гинекологии, гастроэнтерологии, проктологии, ревматологии, урологии, стоматологии, хирургии и др.

Заслуживает внимания тот факт, что в 1972 г. было создано Европейское медицинское общество по применению озона в профилактике и терапии, а в 1992 г. – Ассоциация российских озонотерапевтов, члены которой за прошедшие годы выполнили большой объем научных исследований по изучению механизмов действия озона на организм человека и животных, разработали научно обоснованные технологии использования озона в медицине, утвержденные Минздравом России.

Значителен антибактериальный и противовирусный эффект применения озона, использованный медиками во время военных действий. В определенных концентрациях он является дешевым и эффективным дезинфицирующим средством, экологически безопасным. Не случайно в 2001 г. FDA (Food and Drug Administration – Федеральное управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США) официально удостоило озон статуса GRAS (признанный безвредным), которым маркируются лекарства и пищевые продукты.

Основные характеристики и возможности выпускаемого сегодня оборудования для озонной стерилизации можно проиллюстрировать на примере продукции отечественной фирмы ООО «Орион-Си» [31, 32] – портативном озонаторе «Орион-Си» (ОП1-М). Он позволяет получать на выходе озон-кислородную смесь с концентрацией озона не менее 250 мг/м³ с максимальной производительностью не менее 6 г/ч, осуществлять экспресс-дезинфекцию и экспресс-стерилизацию. Другой пример – многофункциональный озоновый стерилизатор «Орион». Он обеспечивает экспресс-стерилизацию медицинских инструментов, оборудования и изделий с использованием специальных камер-боксов объемом от 0,7 до 250 л. Отсоединенный от камеры-бокса аппарат осуществляет деконтаминацию окружающей среды.

Озон известен как эффективный окислитель, способный уничтожить множество видов бактерий, вирусов, токсинов. Он окисляет фенолы, пестициды, действуя быстрее и эффективнее хлора. Озон способен убивать такие опасные микроорганизмы, как *Escherichia coli*, *Listeria*, *Streptococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis* и многие другие.

Известно, что его бактерицидное действие проявляется, начиная с ничтожных концентраций в дезинфицирующем растворе – всего несколько микрограммов на литр воды. Не менее эффективно действие озона и в газовой фазе.

Такие уникальные возможности озонной стерилизации экспериментально подтверждены в цикле исследований, одним из результатов которых стала запатентованная сотрудниками научно-исследовательской лаборатории биомедицинских технологий (совместная лаборатория НИЦ БМТ ФГБНУ ВИЛАР и МГУ им. М.В. Ломоносова) технология изготовления костных имплантатов [33], составной частью которой является осуществление предварительной и окончательной (финишной) стерилизации костных фрагментов



озоно-кислородной смесью. Применение озоновой стерилизации на этапе заготовки и механической обработки фрагментов кости обусловлено необходимостью обеспечения безопасности персонала банка тканей, контактирующего с биологическим материалом до завершающего этапа изготовления имплантатов.

Вопрос оптимизации параметров процесса озоновой стерилизации биоимплантатов заслуживает отдельного рассмотрения. Все известные способы и устройства для газовой стерилизации медицинского инструментария, образцов биотканей, биоимплантатов работают в соответствии с заранее заданным режимом обработки. Его параметры – концентрация реагентов, продолжительность обработки и др. – устанавливаются на основе предварительных экспериментов, которые должны учитывать ряд факторов: особенности обрабатываемых объектов, виды и степень их обсемененности, параметры режимов обработки, включая температуру, влажность, продолжительность воздействия и пр. Учитывая возможность наличия на практике множества различных вариантов, для обеспечения гарантированно высокой степени эффективности процесса стерилизации параметры процесса необходимо выбирать с достаточным «запасом прочности». Но реализация такого подхода неизбежно связана с дополнительными затратами времени, энергии, реагентов, создает неизбежную повышенную нагрузку на стерилизуемый объект, что может негативно отразиться на морфофункциональных характеристиках, остеоиндуктивных свойствах биоимплантатов.

Для оптимизации процесса озоновой стерилизации авторами было предложено технологическое решение, которое позволяет оптимизировать процесс стерилизации, не устанавливая конкретное время обработки, а определяя момент достижения стерильности объекта по мере приближения к запрограммированному значению концентраций на входе и выходе стерилизационной камеры. Предлагаемый подход позволяет, с одной стороны, автоматически учитывать влияние текущих внешних параметров – температуры, влажности, освещенности, флуктуации концентрации смеси, с другой – обеспечить экономию временных и энергетических затрат в процессе стерилизации. При этом обеспечивается сохранение остеоиндуктивных свойств образцов, морфологическая и биопластическая неизменность стерилизуемых объектов, возможность использования для массовой заготовки имплантатов из компактного и губчатого вещества

кости под постоянным контролем разницы концентраций озоно-кислородной смеси на входе и выходе стерилизационной камеры. Допустимое значение пороговой разницы в концентрациях устанавливается с учетом скорости естественной диссоциации молекул озона. Созданное устройство защищено патентом Российской Федерации [34].

В отдельных исследованиях получают свое развитие и другие методики стерилизации биоимплантатов с использованием различных физических и химических факторов, таких, например, как микроволновое и ультрафиолетовое облучение, криообработка, воздействие низкотемпературной плазмы, насыщение лекарственными средствами и др. [4, 35, 36].

Комбинированные методики стерилизации
Сравнительная оценка перечисленных выше основных методов стерилизации дает общее представление об их достоинствах и недостатках (таблица).

Рассмотрение совокупности приведенных параметров и характеристик данных методик стерилизации биоимплантатов позволяет сделать вывод о преимущественном использовании технологии радиационной стерилизации. Однако при ее применении возникает дилемма – повышение дозы облучения усиливает стерилизационный эффект радиационной обработки, но в то же время способствует многочисленным морфологическим изменениям тканей, ухудшению их механических характеристик. Кроме того, увеличение радиационной дозы может приводить к разрушению морфогенетических белков и, как прямое следствие, – к снижению эффективности процесса репаративного остеогенеза [6, 21]. В результате может возникнуть ситуация, когда пластический материал в силу отмеченных морфологических и биохимических изменений может оказаться непригодным для клинического применения. Таким образом, было бы предпочтительно максимально возможно снизить дозу поглощения в процессе обработки биоматериалов – по крайней мере до величины порядка 15 кГр.

Разработки последних лет показывают, что достижение такого результата принципиально возможно при использовании комбинированных методик стерилизации, основанных на воздействии на стерилизуемый пластический материал совокупности физических и химических факторов. В том случае когда удастся получить взаимное усиление стерилизующего воздействия



Сравнение характеристик различных методов стерилизации

| Метод стерилизации | Недостатки метода, его ограничения | Достоинства метода | Источники литературы |
|---|--|---|----------------------|
| Оксид этилена | Высокая токсичность реагента, побочных продуктов обработки Значительная опасность для окружающей среды, персонала Необходимость дополнительной обработки для пористых материалов Необходимость тщательной очистки и аэрации после стерилизации Длительность и многоступенчатость технологического процесса Возможность побочных эффектов (иммунное отторжение имплантатов, мутагенный эффект у лабораторных животных) | Низкотемпературная технология Высокая эффективность Низкая стоимость Применимость для широкого круга материалов Хорошее проникновение в пористые структуры | [10–18] |
| Радиационная стерилизация | Высокая стоимость оборудования Высокие требования к обеспечению защиты от ионизирующего облучения персонала, окружающей среды Большая длительность производственного цикла (для гамма-облучения) Возможность негативного влияния продуктов радиолиза, радиотоксинов на белковые структуры Изменения (при высоких значениях поглощенной дозы) структуры и свойств биоимплантатов | Низкотемпературная технология Высокая проникающая способность Возможность обработки изделий в герметичной упаковке Высокая производительность обработки (при использовании пучков быстрых электронов) | [4, 6, 19–26] |
| Паровая стерилизация (автоклавирование) | Высокотемпературный метод Не применим для термонеустойчивых биоимплантатов Требует строгого контроля состава и характеристик используемого пара | Простота, доступность метода Низкая стоимость технологического процесса Безопасность для окружающей среды Кратковременность процесса Отсутствие токсичности | [27–29] |
| Жидкие среды (формальдегид) | Потенциальная опасность для персонала, окружающей среды (токсичность, канцерогенность, аллергенность) Низкая производительность Длительность процесса Эффективен не для всех видов патогенов | Низкотемпературная технология Низкая стоимость Сохранность исходных морфомеханических характеристик обрабатываемых объектов | [30] |
| Озоновая стерилизация | Невозможность стерилизации упакованных изделий | Низкотемпературная технология Высокая эффективность воздействия на различные патогены Низкая токсичность Безопасность для окружающей среды Кратковременность процесса Низкая стоимость Хорошее проникновение в пористые структуры | [5, 31–34] |

этих факторов, создаются предпосылки для синергетического эффекта их взаимного действия. При этом интенсивность воздействия каждого из факторов может быть снижена, благодаря чему уменьшается степень вредного побочного действия каждого из них в отдельности при усилении суммарного эффекта.

Рассматриваемый подход, апробированный группой авторов с учетом детального анализа опыта многочисленных предшественников – как исследователей, так и практиков, позволил заключить, что существенной особенностью и главным ограничением основных методов

стерилизации биоимплантатов является «одноэтапность процедуры стерилизации и однородность (химическая или физическая) применяемых для этого средств» [37]. В качестве возможного варианта выхода из этой ситуации был испытан способ стерилизации образцов в два этапа.

На первом этапе осуществляли химическую обработку костных фрагментов (как нативных, так и деминерализованных) в растворе, содержащем семидесятипроцентный этанол (15% по массе), димексид (10%), тимол (0,25%), остальное – дистиллированная вода. Процесс обработки



осуществляли в течение 24 часов при температуре 7 °С. Затем трансплантаты извлекали из стерилизационного раствора, проводили дегидратацию (промакивание салфетками), герметично упаковывали в стерильную тару и помещали в морозильную камеру, где хранили при температуре -70 °С.

На втором этапе замороженные трансплантаты подвергали радиационной обработке гамма-квантами от источника ⁶⁰Со и снова помещали в морозильную камеру до момента клинического применения. При этом, по утверждению авторов, достигалась достаточная эффективность процесса стерилизации при дозе радиационного облучения в 12 кГр. Такая дозовая нагрузка не влияла на эффективность репаративного остеогенеза пластического материала. По мнению авторов, «техническим результатом изобретения являются: а) значительное снижение уровня радиоактивного облучения трансплантатов (с 2,5 до 1,2 Мрад), что способствует лучшему сохранению их морфологических и биопластических качеств; б) усиление стерилизующей активности способа за счет комбинированного использования гамма-лучей и антисептических средств химического происхождения» [37].

Показательно, что эффект снижения дозы облучения весьма значителен. Однако и это техническое решение не лишено существенных недостатков. Во-первых, для химической обработки на начальном этапе комбинированной стерилизации используется раствор со значительным содержанием воды. Присутствие ее в растворе, а соответственно, и в костном образце, создает существенные проблемы при последующей радиационной стерилизации. После такой обработки необходимо тщательное высушивание образца, а затем его глубокое вымораживание. Наличие воды в костной ткани может приводить к нежелательным побочным процессам гидролиза при радиационном воздействии. Во-вторых, следует обратить внимание на температурные режимы не только в процессе радиационной обработки, но и в ходе роста и инкубации бактерий, так как это может быть существенным фактором, влияющим на эффективность стерилизующего действия излучения [38].

Указанные выше недостатки методики комбинированного стерилизующего воздействия оказалось возможным преодолеть путем использования на первом этапе обработки костного имплантата озono-кислородной смесью при комнатной температуре [5, 6, 33]. В качестве экспериментальных образцов использовали прямоугольные фрагменты костной ткани быка с исходной контаминацией смешанной микрофлорой. На первом этапе костные образцы в течение 15–20 минут выдерживали в атмосфере газообразной озono-кислородной смеси, в проточном режиме с концентрацией 6–8 мг/л. Работы проводили в НИЦ БМТ ФГБНУ ВИЛАР. На втором этапе осуществляли облучение потоком быстрых электронов на ускорителе непрерывного действия УЭЛР-1-25-Т-001 с энергией 1 МэВ на базе НИИЯФ имени М.В. Ломоносова. Последующие микробиологические исследования, проведенные в НИЦ БМТ ФГБНУ ВИЛАР, показали, что такая двухэтапная стерилизация костных образцов оказывается эффективной при поглощенных дозах от 11 кГр. Такие дозы не приводят к изменениям остеоиндуктивных свойств и морфомеханических характеристик костной ткани. Разработанная технология защищена патентом Российской Федерации № 2630464 «Комбинированный способ стерилизации костных имплантатов» [39].

Заключение

Представленные данные свидетельствуют о том, что проблема создания эффективных способов стерилизации биоимплантатов еще далека от оптимального решения и остается актуальной. Поиск инновационных подходов к ее решению, как и других актуальных медико-биологических проблем, составляет основу федеральных целевых программ последних десятилетий, в которых значительное внимание уделено здоровьесберегающим технологиям. На успешное решение этой важной задачи направлены в настоящее время усилия специалистов смежных наук, что позволит создать прорывные технологии в области стерилизации и обеспечить оптимизацию данного процесса при достижении его высокой эффективности. ☺

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Оба автора внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.



Литература

1. Nemzek JA, Arnoczky SP, Swenson CL. Retroviral transmission in bone allotransplantation. The effects of tissue processing. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;(324):275–82.
2. Marthy S, Richter M. Human immunodeficiency virus activity in rib allografts. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998;56(4):474–6. doi: 10.1016/s0278-2391(98)90716-9.
3. Martinez OV, Buck BE, Hernandez M, Malinin T. Blood and marrow cultures as indicators of bone contamination in cadaver donors. *Clin Orthop Relat Res.* 2003;(409):317–24. doi: 10.1097/01.blo.0000053343.97749.21.
4. Singh R, Singh D, Singh A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. *World J Radiol.* 2016;8(4):355–69. doi: 10.4329/wjr.v8.i4.355.
5. Пантелеев ВИ, Розанов ВВ, Матвейчук ИВ, Лекишвили МВ, Сысоев НН, Шутеев СА, Альков СВ, Андреева ТМ. Медицинские озонные технологии. Новые задачи, возможности, оборудование. *Биомедицинская радиоэлектроника.* 2013;(2):3–11.
6. Матвейчук ИВ, Розанов ВВ, Пантелеев ВИ, Агалакова ЛМ, Кирилова ИА. Инновационные подходы к совершенствованию процесса стерилизации для решения задач биомимплатологии. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2013;(11):92–8.
7. Алимов АС, Близнюк УА, Борщеговская ПЮ, Варзарь СМ, Еланский СН, Ишханов БС, Литвинов ЮЮ, Матвейчук ИВ, Николаева АА, Розанов ВВ, Студеникин ФР, Черняев АП, Шведун ВИ, Юров ДС. Применение пучков ускоренных электронов для радиационной обработки продуктов питания и биоматериалов. *Известия Российской академии наук. Серия физическая.* 2017;81(6):819–23.
8. Розанов ВВ, Матвейчук ИВ, Лекишвили МВ, Литвинов ЮЮ, Андреева ТМ, Николаева АА. Инновационные подходы к стерилизации костных имплантатов. *Технологии живых систем.* 2015;12(4):74–6.
9. Aho AJ, Hirn M, Aro HT, Heikkilä JT, Meurman O. Bone bank service in Finland. Experience of bacteriologic, serologic and clinical results of the Turku Bone Bank 1972–1995. *Acta Orthop Scand.* 1998;69(6):559–65. doi: 10.3109/17453679808999255.
10. Czapliński J. Sterilisation with ethylene oxide – economics and safety. *Forum Zakażeń.* 2014;5(4):235–7. doi: dx.doi.org/10.15374/FZ2014041.
11. Kearney JN, Bojar R, Holland KT. Ethylene oxide sterilisation of allogenic bone implants. *Clin Mater.* 1993;12(3):129–35. doi: 10.1016/0267-6605(93)90063-d.
12. Kakiuchi M, Ono K. Preparation of bank bone using defatting, freeze-drying and sterilisation with ethylene oxide gas. Part 2. Clinical evaluation of its efficacy and safety. *Int Orthop.* 1996;20(3):147–52. doi: 10.1007/s002640050052.
13. Kakiuchi M, Ono K, Nishimura A, Shiokawa H. Preparation of bank bone using defatting, freeze-drying and sterilisation with ethylene oxide gas. Part 1. Experimental evaluation of its efficacy and safety. *Int Orthop.* 1996;20(3):142–6. doi: 10.1007/s002640050051.
14. Arizono T, Iwamoto Y, Okuyama K, Sugioka Y. Ethylene oxide sterilization of bone grafts. Residual gas concentration and fibroblast toxicity. *Acta Orthop Scand.* 1994;65(6):640–2. doi: 10.3109/17453679408994621.
15. Muscarella LF. Use of ethylene-oxide gas sterilisation to terminate multidrug-resistant bacterial outbreaks linked to duodenoscopes. *BMJ Open Gastroenterol.* 2019;6(1):e000282. doi: 10.1136/bmjgast-2019-000282.
16. Tshamala M, Cox E, De Cock H, Goddeeris BM, Mattheeuws D. Antigenicity of cortical bone allografts in dogs and effect of ethylene oxide-sterilization. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999;69(1):47–59. doi: 10.1016/s0165-2427(99)00042-2.
17. Russell JL, Block JE. Clinical utility of demineralized bone matrix for osseous defects, arthrodesis, and reconstruction: impact of processing techniques and study methodology. *Orthopedics.* 1999;22(5):524–31.
18. Dzedzic-Goclawska A. The effect of radiation sterilization on connective tissue allografts. *Proceedings of 2nd World Congress on Tissue Banking “Allograft against disability”.* Warsaw; 1999. p. 48.
19. Tallentire A. The spectrum of microbial radiation sensitivity. *Radiation Physics and Chemistry.* 1977;15(1):83–9. doi: 10.1016/0146-5724(80)90101-6.
20. Schmidt T, Hoberg A, Broziat C, Smith MD, Gohs U, Pruss A, Scheffler S. Sterilization with electron beam irradiation influences the biomechanical properties and the early remodeling of tendon allografts for reconstruction of the anterior cruciate ligament (ACL). *Cell Tissue Bank.* 2012;13(3):387–400. doi: 10.1007/s10561-011-9289-6.
21. Розанов ВВ, Матвейчук ИВ, Черняев АП, Николаева НА. Изменения морфомеханических характеристик костных имплантатов при радиационной стерилизации. *Известия Российской академии наук. Серия физическая.* 2019;83(10):1435–40. doi: 10.1134/S0367676519040203.
22. Осипенкова-Вичтомова ТК. Судебно-медицинская экспертиза костей. М.: Бинном; 2017. 272 с.
23. Шангина ОР, Нигматуллин РТ. Влияние радиационной стерилизации на структуру и свойства биоматериалов. *Морфология.* 2006;129(3):44–7.
24. Nguyen H, Cassady AI, Bennett MB, Gineys E, Wu A, Morgan DA, Forwood MR. Reducing the radiation sterilization dose improves mechanical and biological quality while retaining sterility assurance levels of bone allografts. *Bone.* 2013;57(1):194–200. doi: 10.1016/j.bone.2013.07.036.
25. Akkus O, Belaney RM. Sterilization by gamma radiation impairs the tensile fatigue life of cortical bone by two orders of magnitude. *J Orthop Res.* 2005;23(5):1054–8. doi: 10.1016/j.orthres.2005.03.003.
26. Nguyen H, Morgan DA, Forwood MR. Validation of 11 kGy as a radiation sterilization dose for frozen bone allografts. *J Arthroplasty.* 2011;26(2):303–8. doi: 10.1016/j.arth.2010.03.032.
27. Draenert GF, Delius M. The mechanically stable steam sterilization of bone grafts. *Biomaterials.* 2007;28(8):1531–8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.11.029.
28. Le Huec JC. Experimental study of the thermic effect on bone at 60 degrees C, as applied to bone allograft. *Chirurgie.* 1992;118(6–7):397–404. French.
29. Kühne JH, Refior HJ, Jansson V, DeToma G, Liepold KP, Verpoorten U. Initial clinical results with heat-treated homologous bone transplants. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1994;132(2):102–11. German. doi: 10.1055/s-2008-1039827.
30. Rauh J, Despang F, Baas J, Liebers C, Pruss A, Gelinsky M, Günther KP, Stiehler M. Comparative biomechanical and microstructural analysis of native versus peracetic acid-ethanol treated cancellous bone graft. *Biomed Res Int.* 2014;2014:784702. doi: 10.1155/2014/784702.
31. Сибельдина ЛА. Стерилизация озонном. *Медицина и здоровье.* 2007;11(19):24–5.
32. Сибельдина ЛА. Дезинфектанты: защита или угроза? *Медицина и здоровье.* 2009;9(41):28–9.
33. Быков ВА, Розанов ВВ, Матвейчук ИВ, Пантелеев ВИ, Шутеев СА, Литвинов ЮЮ, Воронников АИ, авторы; ГНУ ВИЛАР Россельхозакадемии, патентообладатель. Способ изготовления костных имплантов. Пат. 2526429 Рос. Федерация. Оpubл. 20.08.2014.
34. Пантелеев ИВ, Розанов ВВ, Матвейчук ИВ, Бахтин НА, Журнаков ЕА, Сидельников НИ, авторы; ФГБНУ ВИЛАР, патентообладатель. Устрановка для стерилизации биоматериалов. Пат. 180532 Рос. Федерация. Оpubл. 15.06.2018.
35. Nather A, Chew JLL, Aziz Z. Types of Terminal Sterilization of Tissue Grafts. In: Nather A, Yusof N, Hilmy N. *Radiation in Tissue Banking.* World Scientific; 2007. p. 3–9. doi: 10.1142/9789812708649_0001.
36. Dalmaso JP, Mielnik TJ, inventors; Steris Corp, assignee. Method of sterilization of bone tissue. United States patent 5788941A. 1998 Apr 8.
37. Савельев ВИ, Булатов АА, Рыков ЮА, авторы; ФГУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена Росмедтехнологии», патентообладатель. Комбинированный способ стерилизации костных трансплантатов. Пат. 2356224 Рос. Федерация. Оpubл. 27.05.2009.
38. Эйдус ЛХ. Мембранный механизм биологического действия малых доз. М.; 2001.
39. Матвейчук ИВ, Розанов ВВ, Гордонова ИК, Никитина ЗК, Сидельников НИ, Литвинов ЮЮ, Николаева АА, Черняев АП, Пантелеев ИВ, авторы; ФГБНУ ВИЛАР, патентообладатель. Комбинированный способ стерилизации костных имплантатов. Пат. 2630464 Рос. Федерация. Оpubл. 08.09.2017.



References

- Nemzek JA, Arnoczky SP, Swenson CL. Retroviral transmission in bone allotransplantation. The effects of tissue processing. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;(324):275–82.
- Marthy S, Richter M. Human immunodeficiency virus activity in rib allografts. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998;56(4):474–6. doi: 10.1016/s0278-2391(98)90716-9.
- Martinez OV, Buck BE, Hernandez M, Malinin T. Blood and marrow cultures as indicators of bone contamination in cadaver donors. *Clin Orthop Relat Res.* 2003;(409):317–24. doi: 10.1097/01.blo.0000053343.97749.21.
- Singh R, Singh D, Singh A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. *World J Radiol.* 2016;8(4):355–69. doi: 10.4329/wjr.v8.i4.355.
- Pantelev VI, Rozanov VV, Matveychuk IV, Lekishvili MV, Sysoev NN, Shuteev SA, Al'kov SV, Andreeva TM. Medical ozon technologies: new problems, possibilities, equipment. *Biomedical Radioelectronics.* 2013;(2):3–11. Russian.
- Matveychuk IV, Rozanov VV, Pantelev VI, Agalakova LM, Kirilova IA. Innovative approaches to improvement of process of sterilization for the solution of problems of bioimplantology. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2013;(11):92–8. Russian.
- Alimov AS, Bliznyuk UA, Borchevovskaya PU, Varzar SM, Elansky SN, Ishkhanov BS, Litvinov UU, Matveychuk IV, Nikolaeva AA, Rozanov VV, Studenikin FR, Chernyaev AP, Shvedunov VI, Yurov DS. Using accelerated electron beams for the radiation processing of foodstuffs and biomaterials. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics.* 2017;81(6):743–7.
- Rozanov VV, Matveychuk IV, Lekishvili MV, Litvinov YY, Andreeva TM, Nikolaeva AA. Innovative approaches of implants' sterilization. *Journal Technologies of Living Systems.* 2015;12(4):74–6. Russian.
- Aho AJ, Hirn M, Aro HT, Heikkilä JT, Meurman O. Bone bank service in Finland. Experience of bacteriologic, serologic and clinical results of the Turku Bone Bank 1972–1995. *Acta Orthop Scand.* 1998;69(6):559–65. doi: 10.3109/17453679808999255.
- Czapliński J. Sterilisation with ethylene oxide – economics and safety. *Forum Zakazeń.* 2014;5(4):235–7. doi: dx.doi.org/10.15374/FZ2014041.
- Kearney JN, Bojar R, Holland KT. Ethylene oxide sterilisation of allogenic bone implants. *Clin Mater.* 1993;12(3):129–35. doi: 10.1016/0267-6605(93)90063-d.
- Kakiuchi M, Ono K. Preparation of bank bone using defatting, freeze-drying and sterilisation with ethylene oxide gas. Part 2. Clinical evaluation of its efficacy and safety. *Int Orthop.* 1996;20(3):147–52. doi: 10.1007/s002640050052.
- Kakiuchi M, Ono K, Nishimura A, Shiokawa H. Preparation of bank bone using defatting, freeze-drying and sterilisation with ethylene oxide gas. Part 1. Experimental evaluation of its efficacy and safety. *Int Orthop.* 1996;20(3):142–6. doi: 10.1007/s002640050051.
- Arizono T, Iwamoto Y, Okuyama K, Sugioka Y. Ethylene oxide sterilization of bone grafts. Residual gas concentration and fibroblast toxicity. *Acta Orthop Scand.* 1994;65(6):640–2. doi: 10.3109/17453679408994621.
- Muscarella LF. Use of ethylene-oxide gas sterilisation to terminate multidrug-resistant bacterial outbreaks linked to duodenoscopes. *BMJ Open Gastroenterol.* 2019;6(1):e000282. doi: 10.1136/bmjgast-2019-000282.
- Tshamala M, Cox E, De Cock H, Goddeeris BM, Mattheeuws D. Antigenicity of cortical bone allografts in dogs and effect of ethylene oxide-sterilization. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999;69(1):47–59. doi: 10.1016/s0165-2427(99)00042-2.
- Russell JL, Block JE. Clinical utility of demineralized bone matrix for osseous defects, arthrodesis, and reconstruction: impact of processing techniques and study methodology. *Orthopedics.* 1999;22(5):524–31.
- Dziedzic-Goclawska A. The effect of radiation sterilization on connective tissue allografts. *Proceedings of 2nd World Congress on Tissue Banking "Allograft against disability".* Warsaw; 1999. p. 48.
- Tallentire A. The spectrum of microbial radiation sensitivity. *Radiation Physics and Chemistry.* 1977;15(1):83–9. doi: 10.1016/0146-5724(80)90101-6.
- Schmidt T, Hoburg A, Broziat C, Smith MD, Gohs U, Pruss A, Scheffler S. Sterilization with electron beam irradiation influences the biomechanical properties and the early remodeling of tendon allografts for reconstruction of the anterior cruciate ligament (ACL). *Cell Tissue Bank.* 2012;13(3):387–400. doi: 10.1007/s10561-011-9289-6.
- Rozanov VV, Matveychuk IV, Chernyaev AP, Nikolaeva NA. Changes in the morphological and mechanical characteristics of bone implants upon radiation sterilization. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics.* 2019;83(10):1311–5.
- Osipenkova-Vichtomova TK. Forensic histological expert evaluation of the bone. *Moscow: Binom;* 2017. 272 p. Russian.
- Shangina OR, Nigmatullin RT. Effect of radiation sterilization on biomaterial structure and properties. *Morphology.* 2006;129(3):44–7. Russian.
- Nguyen H, Cassady AI, Bennett MB, Gineyts E, Wu A, Morgan DA, Forwood MR. Reducing the radiation sterilization dose improves mechanical and biological quality while retaining sterility assurance levels of bone allografts. *Bone.* 2013;57(1):194–200. doi: 10.1016/j.bone.2013.07.036.
- Akkus O, Belaney RM. Sterilization by gamma radiation impairs the tensile fatigue life of cortical bone by two orders of magnitude. *J Orthop Res.* 2005;23(5):1054–8. doi: 10.1016/j.orthres.2005.03.003.
- Nguyen H, Morgan DA, Forwood MR. Validation of 11 kGy as a radiation sterilization dose for frozen bone allografts. *J Arthroplasty.* 2011;26(2):303–8. doi: 10.1016/j.arth.2010.03.032.
- Draenert GF, Delius M. The mechanically stable steam sterilization of bone grafts. *Biomaterials.* 2007;28(8):1531–8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.11.029.
- Le Huec JC. Experimental study of the thermic effect on bone at 60 degrees C, as applied to bone allograft. *Chirurgie.* 1992;118(6–7):397–404. French.
- Kühne JH, Refior HJ, Jansson V, DeToma G, Liepold KP, Verpoorten U. Initial clinical results with heat-treated homologous bone transplants. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1994;132(2):102–11. German. doi: 10.1055/s-2008-1039827.
- Rauh J, Despang F, Baas J, Liebers C, Pruss A, Gelinsky M, Günther KP, Stiehler M. Comparative biomechanical and microstructural analysis of native versus peracetic acid-ethanol treated cancellous bone graft. *Biomed Res Int.* 2014;2014:784702. doi: 10.1155/2014/784702.
- Sibel'dina LA. Ozone sterilization. *Meditcina i zdorov'e.* 2007;11(19):24–5. Russian.
- Sibel'dina LA. Disinfectants: protection or a threat? 2009;9(41):28–9. Russian.
- Bykov VA, Rozanov VV, Matveychuk IV, Pantelev VI, Shuteev SA, Litvinov YuYu, Vorotnikov AI, authors; GNU VILAR Rossel'khozakademii, assignee. A method to manufacture bone implants. Russian Federation patent 2526429. 2014 Aug 20.
- Pantelev IV, Rozanov VV, Matveychuk IV, Bakhtin NA, Zhurnakov EA, Sidel'nikov NI, authors; FGBNU VILAR, assignee. A device for biomaterial sterilization. Russian Federation patent 180532. 2018 Jun 15.
- Nather A, Chew JLL, Aziz Z. Types of Terminal Sterilization of Tissue Grafts. In: Nather A, Yusof N, Hilmy N. *Radiation in Tissue Banking.* World Scientific; 2007. p. 3–9. doi: 10.1142/9789812708649_0001.



36. Dalmasso JP, Mielnik TJ, inventors; Steris Corp, assignee. Method of sterilization of bone tissue. United States patent 5788941A. 1998 Apr 8.
37. Savel'ev VI, Bulatov AA, Rykov YuA, inventors; FGU "RNIITO im. R.R. Vredena Rosmedtekh-nologiy", assignee. Combined method of sterilization of bone transplants. Russian Federation patent 2356224. 2009 May 27.
38. Eydus LKh. Membrane mechanism of biological effects of low dose. Moscow; 2001. Russian.
39. Matveychuk IV, Rozanov VV, Gordonova IK, Nikitina ZK, Sidel'nikov NI, Litvinov YuYu, Nikolaeva AA, Chernyaev AP, Panteleev IV, inventors; FGBNU VILAR, assignee. Combined method of sterilization of bone implants. Russian Federation patent 2630464. 2017 Sep 8.

The current state and promising innovative directions to development methods for bioimplant sterilization

V.V. Rozanov^{1,2} • I.V. Matveychuk¹

We have analyzed the state-of-the-art methods for sterilization of bone implants. The problem of finding effective bioimplant sterilization methods is still far from its optimal solution and remains as urgent as before. The factors limiting further development of the main biomaterial sterilization methods include limitations related to each existing method and the use of technologies with sterilizing effect. Comparative analysis of the main techniques for bioimplant sterilization that are used in medical and biological areas (treatment with ethylene oxide, radiation, wet warmth, liquid media, and ozone) allows for a conclusion on the advantages of the radiation sterilization. However, the choice is challenged by the dilemma: higher radiation dose would increase the sterilization effect, but at the same time can lead to multiple morphological abnormalities in the tissues, deterioration of their mechanical characteristics, destruction of morphogenetic proteins and consequently to lower efficacy of the reparative bone formation. As a result, the material can become unsuitable for clinical use. One of the real approaches to solve this problem is to use as low absorbed radiation dose as possible during irradiation of biomaterials, at least to 15 kGy. The developments made by the authors within the last years have shown that such a result can be achieved by the use of combines sterilization techniques based on combines effects

of a number of physical and chemical factors on the biomaterial being sterilized. Mutual enhancement of the sterilizing effects of these factors creates prerequisites for their synergy, whereby the intensity of each factor can be reduced. This makes it possible to decrease the degree of harmful adverse events associated with each individual factor with higher total effect. The search for innovative solutions for the urgent problems of the bone bioimplant sterilization, for the development of the state-of-the-art health-sparing technologies can be successful only with unification of the efforts by specialists from related sciences. This would allow for creating of breakthrough technologies for sterilization and for optimization of this procedure with achievement of its high efficacy.

Key words: bioimplantology, bone tissue, ozone, sterilization, irradiation

For citation: Rozanov VV, Matveychuk IV. The current state and promising innovative directions to development methods for bioimplant sterilization. *Almanac of Clinical Medicine*. 2019;47(7):634–46. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-063.

Received 8 July 2019; revised 6 November 2019; accepted 7 November 2019; published online 22 November 2019

Vladimir V. Rozanov – PhD (in Phys. and Math.), Doctor of Biol. Sci., Associate Professor, Leading Research Fellow of Scientific Centre of Hydro-physics Researches, Professor of the Chair of Accelerators Physics and Radiation Medicine, Faculty of Physics¹; Head of Laboratory, Scientific and Educational-methodic Centre of Bio-medical Technologies²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3243-8782>; ResearcherID: E-5959-2017

✉ 1/2 Leninskie gory, Scientific Centre of Hydro-Physics Researches, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 939 13 44. E-mail: vrozanov@mail.ru

Igor V. Matveychuk – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of Scientific and Educational-methodic Centre of Bio-medical Technologies²; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6220-4429>; ResearcherID: AAE-8495-2019

✉ 2 Krasina ul., Moscow, 123056, Russian Federation. Tel.: +7 (499) 254 46 49. E-mail: nizbmtvilar@gmail.com

Conflict of interests

Both authors declare no potential conflict of interests that would necessitate any disclosure in this publication.

Authors' contributions

Both authors have significantly contributed to the study conduct and paper preparation, have read and approved the final version before publication.

¹ Lomonosov Moscow State University; 1/2 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation

² All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants; 7 Grina ul., Moscow, 117216, Russian Federation



Оригинальная статья

Фотодинамическая терапия солидных опухолей *in vitro* и *in vivo* с применением комбинации рибофлавина и наноразмерных апконвертирующих фосфоров

Шолина Н.В.^{1,2,3} • Акасов Р.А.^{2,3} • Хоченков Д.А.¹ • Генералова А.Н.^{3,4} • Семчишен В.А.³ • Хайдуков Е.В.^{2,3}

Шолина Наталья Валериевна – аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза¹, мл. науч. сотр. лаборатории фотонной биоинженерии отдела биомедицинской инженерии Института молекулярной медицины², мл. науч. сотр. лаборатории лазерной биомедицины³; ORCID: 0000-0001-9866-2878
✉ 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация. Тел.: +7 (926) 957 96 63. E-mail: SholinaNV@gmail.com

Акасов Роман Александрович – PhD, науч. сотр. лаборатории фотонной биоинженерии отдела биомедицинской инженерии Института молекулярной медицины², науч. сотр. лаборатории лазерной биомедицины³; ORCID: 0000-0001-6486-8114

Хоченков Дмитрий Александрович – канд. биол. наук, заведующий лабораторией биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза¹; ORCID: 0000-0002-5694-3492

Генералова Алла Николаевна – канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаборатории лазерной биомедицины³, ст. науч. сотр. лаборатории полимеров для биологии⁴; ORCID: 0000-0001-9646-1693

Семчишен Владимир Анатольевич – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. лаборатории лазерной биомедицины³; ORCID: 000-0003-1035-3013

Хайдуков Евгений Валерьевич – канд. физ.-мат. наук, заведующий лабораторией фотонной биоинженерии отдела биомедицинской инженерии Института молекулярной медицины²; заведующий лабораторией лазерной биомедицины³; ORCID: 0000-0002-3900-2949

Обоснование. Рибофлавин (витамин В₂) считается одним из наиболее перспективных агентов для фотодинамической терапии. Однако его применение ограничено возбуждением в ультрафиолетовом (УФ) и синем диапазонах спектра и, как следствие, малой (не более нескольких миллиметров) глубиной проникновения в биоткань. Решением данной проблемы видится разработка подходов, обеспечивающих фотовозбуждение молекул рибофлавина под действием инфракрасного (ИК) света в глубине опухолевой ткани. В качестве посредника, способного эффективно преобразовывать возбуждающее излучение ближнего ИК диапазона, проникающее в биоткань на глубину до 3 см, в фотолюминесценцию УФ и видимого диапазона спектра, могут быть рассмотрены наноразмерные апконвертирующие фосфоры (НАФ). **Цель** – оценить эффективность использования НАФ для ИК-опосредованной активации рибофлавина в глубине опухолевой ткани при проведении фотодинамической терапии. **Материал и методы.** Водорастворимая форма рибофлавина – флавиномононуклеотид (ФМН) (Фармстандарт-УфаВИТА, Россия) – был использован в качестве фотосенсибилизатора в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Эксперименты *in vitro* выполнены на клеточных линиях аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, глиобластомы человека U-87 MG и глиомы крысы С6. Карцинома легкого Льюис, перевитая мышам-гибридам BDF1, была использована в качестве модели для демонстрации доставки ФМН в опухолевую ткань. Для фотоактивации ФМН *in vivo* применялись НАФ со структурой «ядро/оболочка» [NaYF₄:Yb³⁺, Tm³⁺/NaYF₄]. Фотодинамическая терапия на основе ФМН, НАФ и лазерного излучения 975 нм проводилась на ксенографтах мыши SK-BR-3. **Результаты.** Показано, что ФМН может выступать в качестве эффективного фотосенсибилизатора *in vitro* в отношении клеточных линий

SK-BR-3, U-87 MG и С6. Значения IC₅₀ для клеток глиомы составляли ~30 мкМ ФМН, а для клеток карциномы молочной железы SK-BR-3 ~50 мкМ ФМН (24 ч инкубации, облучение 4,2 Дж/см²). С использованием модели карциномы легкого Льюис установлено, что соответствующая концентрация ФМН (30 мкМ и выше) может быть достигнута в опухоли в результате системного введения ФМН (через 2 и 24 часа после введения). На ксенографтах мыши SK-BR-3 продемонстрирован эффект фотодинамической терапии с использованием света ближнего ИК диапазона для НАФ-опосредованного возбуждения ФМН, торможение роста опухоли при этом составило 90±5%. **Заключение.** Продемонстрирована возможность применения рибофлавина (витамина В₂) в качестве фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии. Использование подхода, основанного на фотовозбуждении ФМН через антистоксовую фотолюминесценцию НАФ, позволяет реализовать метод фотодинамической терапии с применением света из ближнего ИК диапазона спектра.

Ключевые слова: рибофлавин, наноразмерные апконвертирующие фосфоры, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, свет ближнего инфракрасного диапазона

Для цитирования: Шолина НВ, Акасов РА, Хоченков ДА, Генералова АН, Семчишен ВА, Хайдуков ЕВ. Фотодинамическая терапия солидных опухолей *in vitro* и *in vivo* с применением комбинации рибофлавина и наноразмерных апконвертирующих фосфоров. Альманах клинической медицины. 2019;47(7):647–53. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-057.

Поступила 05.07.2019; доработана 17.10.2019; принята к публикации 24.10.2019; опубликована онлайн 01.11.2019

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация

² ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Российская Федерация

³ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН; 119333, г. Москва, Ленинский проспект, 59, Российская Федерация

⁴ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН; 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Российская Федерация

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – перспективный метод лечения онкологических заболеваний, который основан на способности фотосенсибилизаторов (ФС) селективно накапливаться в опухолевой ткани. Под действием энергии лазерного излучения в сенсibilизированных клетках и тканях развиваются фотохимические реакции с выделением синглетного кислорода и свободных радикалов, что приводит к гибели и разрушению опухолевых клеток без негативного влияния на здоровые ткани и органы. ФДТ не сопровождается токсическими эффектами, осложнениями и может быть повторно проведена в зоне предшествующего лечения. По сравнению с хирургическим вмешательством ФДТ менее инвазивна, восстановительный период более короткий и благоприятный [1]. Фототерапия существенно расширяет арсенал методов лечения опухолей различной локализации, она также рекомендована при опухолях, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [2].

В настоящее время в практике используются ФС, относящиеся к порфиринам (первое поколение), хлоринам (второе поколение) и фталоцианинам. Все они обладают низкой эффективностью и неравномерностью накопления в опухоли, требуется их повторное введение по причине быстрого фотообесцвечивания в ходе облучения, и, как следствие, препараты проявляют системную токсичность при небольшой результативности [3].

Поиск более эффективных и менее токсичных соединений, лишенных недостатков ФС первого и второго поколения, – одна из основных стратегий улучшения ФДТ. В качестве альтернативы органическим ФС может быть предложен природный рибофлавин, также обладающий фотосенсибилизирующими свойствами [4]. При высокой концентрации кислорода в среде он служит даже более эффективным продуцентом синглетного кислорода, чем порфирин, наиболее широко используемый в ФДТ [5]. В недавних работах рибофлавин использовался в качестве фотосенсибилизатора для лечения рака шейки матки HeLa [6] и меланомы V16 [7] *in vitro*. Основное ограничение использования водорастворимой формы рибофлавина – флавиномононуклеотида (ФМН) – в качестве ФС связано с тем, что синий свет, необходимый для его активации, наименее эффективно проникает в биоткань [8].

В качестве решения проблемы мы предлагаем использовать наноразмерные апконвертирующие фосфоры (НАФ), способные эффективно

преобразовывать возбуждающее излучение ближнего инфракрасного (ИК) диапазона, традиционно применяемое для ФДТ, в фотолуминесценцию видимого и ультрафиолетового (УФ) диапазонов спектра и таким образом активировать рибофлавин на глубине ткани [9, 10]. Целью данной работы была оценка эффективности использования НАФ для ИК-опосредованной активации рибофлавина в глубине опухолевой ткани при проведении ФДТ.

Материал и методы

Исследование фототоксичности флавиномононуклеотида *in vitro*

Клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, глиобластомы человека U-87 MG и глиомы крысы C6 высевали в 96-луночные планшеты (5×10^4 /мл, 100 мкл на лунку) в полной среде RPMI-1640 (Thermo Fisher, США). Через 24 часа среду заменяли на свежую, содержащую 10–100 мкМ ФМН (Фармстандарт-УфаВИТА, Россия), и инкубировали в темноте 90 минут. Затем среду удаляли, клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7,4) и облучали лазером (ООО «Полироник», Россия, мощность 7 мВт/см²) на длине волны 450 нм в течение 10 мин. Через 24 часа жизнеспособность клеток оценивали путем добавления 0,5 мг/мл МТТ (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромид, Sigma, США) на 4 часа с последующей элюцией образовавшегося формазана в диметилсульфоксид. Результат оценивали спектрофотометрически на длине волны 540 нм (Multiscan FC, Thermo Scientific, США). Выживаемость клеток рассчитывали по формуле: OD экспериментальной группы / OD контрольная $\times 100\%$. Всего было проведено три независимых эксперимента, каждый из которых включал в себя не менее трех повторов для каждой экспериментальной точки.

Накопление флавиномононуклеотида в мышинной модели карциномы легкого Льюис Мышам-гибридам BDF1 (C57Bl/6 \times DBA2) перевивали модель карциномы легкого Льюис (LLC) из банка опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. На 10-й день после перевивки мышам системно (через ретроорбитальный синус) вводили ФМН в объеме 150 мкл с концентрацией 10 мг/мл. Через 2 и 24 часа по 2 мыши выводили из эксперимента, кожный лоскут удаляли и сканировали открытую область непрерывным полупроводниковым лазером с длиной волны 450 нм при



помощи эпилюминесцентной имиджинговой системы, разработанной в Институте фотонных технологий РАН (г. Троицк) по предложенной ранее технологии [11]. Спектральная полоса регистрации флуоресценции составляла 500–570 нм. Полученные изображения были обработаны в программном обеспечении XCAP for Windows, версия 3.7.120907.083752, позволяющем перевести люминесцентные изображения в относительные единицы люминесценции ФМН для любой области изображения. Для каждого изображения в программе XCAP было сделано по 10 измерений в области опухоли и по 10 измерений в области нормальных тканей.

Синтез наноразмерных апконвертирующих фосфоров и их поверхностная модификация для биомедицинского применения

Синтез НАФ на основе фторидной матрицы NaYF_4 , допированной ионами лантаноидов (тулия Tm^{3+} , иттербия Yb^{3+}), и модификация их поверхности биосовместимым полимерным покрытием на основе гидроксида тетраметиламмония проводилась в соответствии с описанными ранее методиками [11, 12].

Фотодинамическая терапия *in vivo*

ФДТ проводили на модели ксенографтов аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 у мышей. Для этого клетки SK-BR-3 (5×10^5 клеток) имплантировали подкожно в правый бок иммунодефицитных мышей линии Balb nu/nu (НПП «Питомник лабораторных животных» ИБХ РАН, г. Пущино). Динамику роста оценивали по формуле: $V = (\text{длина} \times [\text{ширина}]^2) / 2$. Терапию проводили при достижении опухоли размеров $120 \pm 15 \text{ мм}^3$. Мышам перитуморально вводили комбинацию ФМН (50 мкл, 500 мкМ) и НАФ (25 мкг); через 1,5 часа после введения опухоль облучали лазером АТС-С4000-200-АМФ-975 (Semiconductor devices, Россия) на длине волны 975 нм (900 Дж/см^2 , импульсный режим). В качестве контроля использовали опухоли с аналогичной комбинацией веществ, но без последующего лазерного воздействия. Противоопухолевую активность определяли как торможение роста опухоли $[\text{ТРО, \%}] = (\text{контроль ТРО} - \text{экспериментальная группа ТРО}) / \text{Контроль ТРО} \times 100\%$, в течение 50 дней. Для оценки тканевой реакции на терапию по 2 мыши из каждой группы выводились из эксперимента через сутки после воздействия. Гистологические образцы исследовали путем окрашивания гематоксилином и эозином.

Этическая экспертиза. Работа выполнена в соответствии с этическими принципами проведения биомедицинских исследований, отраженными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, и утверждена этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (номер документа 2018-034).

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad, США). Для сравнения групп применяли U-критерий Манна – Уитни, различия принимали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Оценка токсичности фотоактивированного флавиномононуклеотида *in vitro*

Была оценена темновая и световая токсичность ФМН в отношении ряда опухолевых клеток *in vitro*, в том числе впервые был изучен цитотоксический эффект ФМН в отношении клеток глиомы U-87 MG и C6. Показано, что облучение синим светом (450 нм , $4,2 \text{ Дж/см}^2$) среды, содержащей 50 мкМ ФМН, через 24 ч приводило к снижению жизнеспособности клеток карциномы молочной железы человека SK-BR-3 до $52 \pm 8\%$ относительно контроля (среднее \pm SD), в то время как для

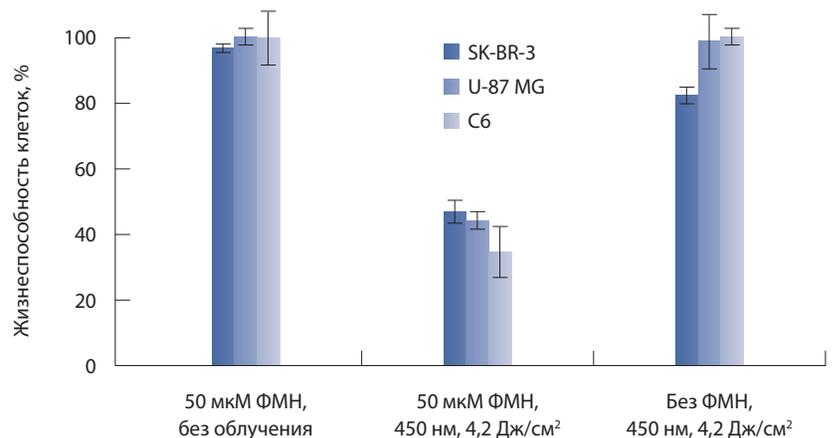


Рис. 1. Жизнеспособность клеток SK-BR-3, U-87 MG и C6. Клетки инкубировали в присутствии 50 мкМ ФМН в течение 90 мин и облучали синим светом (450 нм , $4,2 \text{ Дж/см}^2$), жизнеспособность оценивали методом МТТ-теста через 24 часа (см. подробное описание в разделе статьи «Материал и методы»). Выживаемость интактных клеток (контроль) принимали за 100%. Оценивали также темновую токсичность 50 мкМ флавиномононуклеотида (ФМН) (без облучения) и выживаемость при облучении клеток в среде, не содержащей ФМН. На гистограмме приведены средние значения \pm SD трех независимых экспериментов. Для сравнения групп применяли U-критерий Манна – Уитни, была найдена статистически значимая ($p < 0,05$) разница между экспериментальной группой (50 мкМ ФМН + облучение) и контролем, а также между экспериментальной группой (50 мкМ ФМН + облучение) и двумя другими экспериментальными группами (50 мкМ ФМН без облучения; облучение без ФМН)

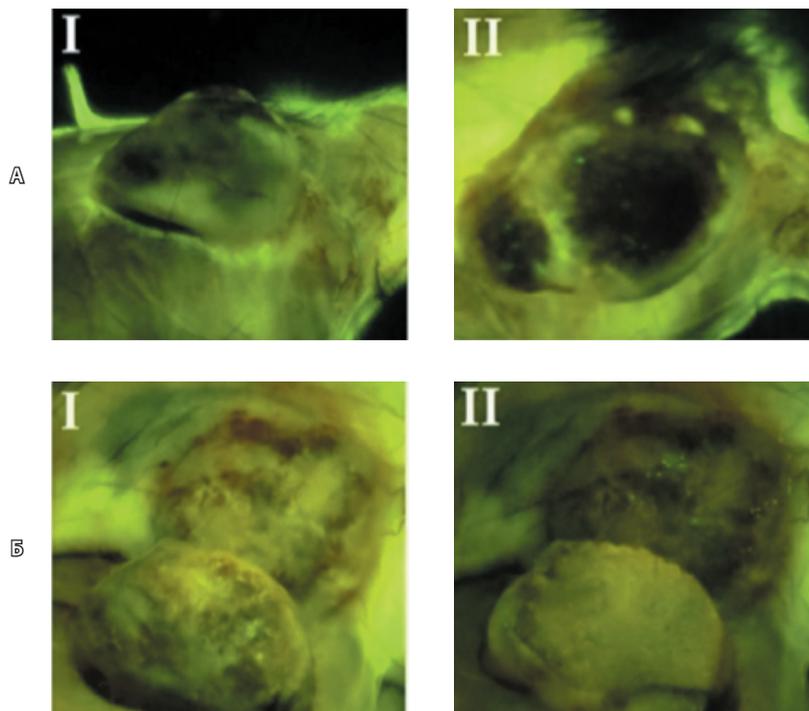


Рис. 2. Эпифлуоресцентные фотографии мыши BDF1 с карциномой легкого Льюис (LLC), привитой на дорсальной стороне животного с откинутым кожным лоскутом. Возбуждение 450 нм, спектральная полоса регистрации флуоресценции 500–570 нм. **А:** I. Поверхность опухоли через 2 часа после системного введения флавинмононуклеотида (ФМН); II. Та же область, срез через центр опухоли. **Б:** I. Поверхность опухоли через 24 часа после системного введения ФМН; II. Та же область, срез через центр опухоли

клеток глиомы U-87 MG и С6 снижение выживаемости составило 35 ± 7 и $40 \pm 4\%$ соответственно (среднее \pm SD) (рис. 1). При этом в темновых условиях инкубация с ФМН в течение тех же 24 ч не приводила к гибели клеток вплоть до концентрации 5 мМ.

Накопление флавинмононуклеотида в опухолевой ткани *in vivo*

Было показано, что ФМН способен накапливаться в перевитой карциноме легкого Льюис в результате системного введения. Так, через 24 ч после введения флуоресцентный сигнал ФМН в опухоли превышал сигнал прилегающих нормальных тканей, при этом визуальный контраст составлял 1:5 (рис. 2). Абсолютные значения флуоресценции были измерены в программе ХСАР. Для каждого животного ($n=2$) было сделано по 10 измерений в области опухоли и по 10 измерений в области нормальных тканей. На основе калибровочных измерений концентрация ФМН в опухоли при этом была оценена как 30 мкМ и выше. Важно также отметить, что в течение 2 часов с момента введения флуоресценция ФМН

была сосредоточена на периферии опухоли, в богатой кровеносными сосудами области, тогда как после 24 ч ФМН был распределен по всему объему опухоли.

Фотодинамическая терапия с использованием флавинмононуклеотида и наноразмерных апконвертирующих фосфоров *in vivo* ФДТ с использованием света ближнего ИК-диапазона (975 нм) для НАФ-опосредованного возбуждения ФМН приводила к значительно уменьшению объема опухоли по сравнению с контрольной группой, ТРО при этом составило $90 \pm 5\%$ (среднее \pm SD) через 50 дней после облучения (рис. 3) ($p < 0,05$). Через 24 ч после сеанса ФДТ по 2 животных из каждой группы выводились из эксперимента для патоморфологического анализа процессов, протекающих в опухолевой ткани. Результаты гистологического исследования опухолей в контрольной группе характеризовались наличием неповрежденных опухолевых клеток без каких-либо изменений. Напротив, опухоли, содержащие комбинацию ФМН и НАФ, продемонстрировали резкое снижение плотности ядро-содержащих клеток. Большинство из них имели вакуолизированную цитоплазму и разрушенные цитоплазматические мембраны. Ядра имели округлую или неправильную форму, были отекающими, с разрывами кариолеммы. Процедура ФДТ также вызывала разрыв кровеносных сосудов с обширными кровоизлияниями в интерстиций опухоли. Основываясь на гистологическом заключении, мы оцениваем диапазон глубины воздействия ФДТ с помощью комбинации «рибофлавин + НАФ» в 8–10 мм с учетом толщины опухолевого очага.

Обсуждение

ФМН вовлечен во многие патологические процессы, включая онкогенез, что приводит к повышенному накоплению его опухолевыми клетками. Например, установлено, что у женщин, страдающих раком молочной железы, концентрация белка-транспортера рибофлавина в крови заметно повышается [13]. Таргетные свойства молекулы ФМН были продемонстрированы ранее для различных типов опухолей, включая карциномы молочной железы, шейки матки или простаты [14–16]. ФМН выступает кофактором различных ферментативных реакций, вследствие чего не распознается белками лекарственной устойчивости как экзогенное вещество. Именно поэтому он может быть перспективным агентом для терапии опухолей, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [17]. Благодаря своим фотохимическим

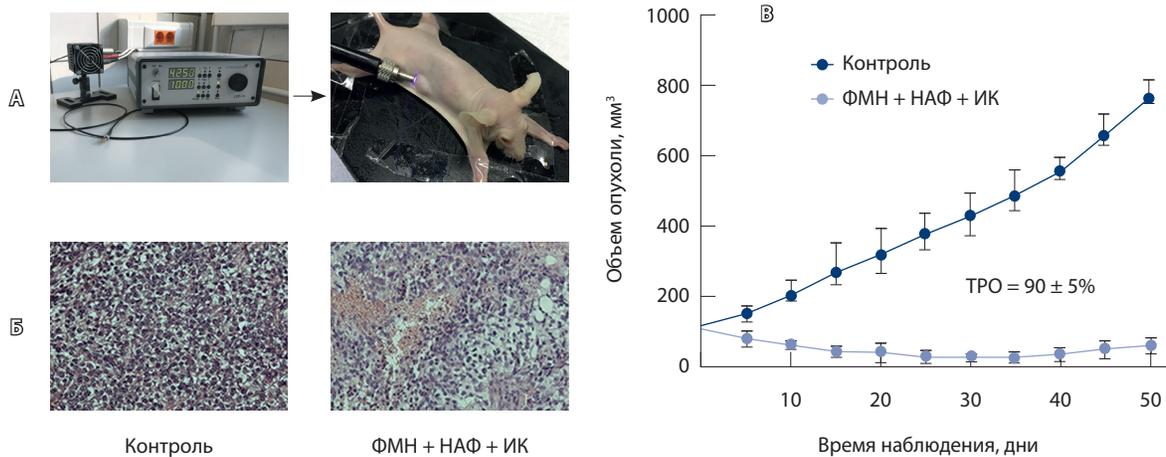


Рис. 3. Экспериментальная лазерная установка для проведения фотодинамической терапии (ФДТ) и мышиная модель аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 (А). Результаты гистологического исследования опухолевой ткани экспериментальной и контрольной групп через сутки после сеанса ФДТ, окраска гематоксилин-эозином, $\times 200$ (Б). График торможения роста опухоли в экспериментальной и контрольной группах в течение 50 дней после однократного сеанса ФДТ, данные на графике отображены как среднее \pm SD (В); ФМН – флавинмононуклеотид, НАФ – наноразмерные апконвертирующие фосфоры, ИК – инфракрасное излучение, ТРО – торможение роста опухоли

свойствам и способности нарабатывать активные формы кислорода при облучении УФ и синим светом рибофлавин признан эффективным ФС для антибактериальной ФДТ [18]. В отличие от многих органических ФС, ФМН обладает крайне низкой темновой токсичностью и не оказывает ингибирующего эффекта на рост клеток до концентрации как минимум 5 мМ. Для сравнения, фотофрин обладает темновой токсичностью с IC_{50} около 5 мкМ [5, 13], то есть на три порядка выше. Это позволяет рассматривать ФМН как потенциально эффективный ФДТ-агент с минимальными побочными эффектами. При этом световая токсичность ФМН достигается в микромолярном диапазоне концентраций (30–50 мкМ, в зависимости от свойств клеточной линии). Мы показываем, что такая концентрация ФМН (30 мкМ и выше) может быть достигнута при системном введении ФМН в течение 2–24 ч. Полученные нами результаты коррелируют с опубликованными ранее работами, в которых свойства молекулы ФМН адресно накапливаться в опухолевой ткани были продемонстрированы для различных типов опухолей, включая карциному молочной железы, шейки матки, простаты [14–16].

К слабым сторонам ФМН в качестве ФС можно отнести недостаточную глубину проникновения активирующего УФ или синего света в биоткань в результате значительного поглощения света в этом спектральном диапазоне. Например, глубина проникновения на длине волны 360 нм была ранее оценена как 60 мкм, что позволяет достичь

лишь верхнего слоя эпидермиса кожи человека [19]. Напротив, проникновение света в ИК диапазоне может достигать 2–3 см, что делает ИК-опосредованное возбуждение ФС перспективным инструментом ФДТ. В данной работе мы предлагаем подход, основанный на использовании неорганических наночастиц (апконвертирующих нанофосфоров) с заданными оптическими свойствами для преобразования света ближнего ИК диапазона в свет УФ и видимого спектра, что позволяет активировать ФМН в глубине биоткани. Такой подход позволил нам добиться значительного торможения роста опухоли ($90 \pm 5\%$, среднее \pm SD, через 50 дней после облучения), при этом мы оцениваем глубину воздействия ФДТ в 8–10 мм с учетом толщины опухолевого очага. В результате ФДТ были повреждены не только опухолевые клетки, но и стенки кровеносных сосудов, что приводило к обширным кровоизлияниям в интерстиций опухоли. Известно, что именно сосудистые повреждения в результате фотодинамического воздействия обеспечивают наиболее быструю реакцию на проводимую терапию и иногда выявляются даже до завершения лечения [1]. Кроме того, необходимо отметить люминесцентные свойства ФМН и НАФ, которые позволяют использовать комбинацию этих препаратов не только для терапии опухоли, но и для визуализации опухолевого очага (так называемая тераностика). Перспективы применения НАФ в качестве контрастного агента для маркирования опухоли обсуждались нами ранее [20].



Заключение

В данной работе была оценена эффективность применения комбинации рибофлавина (витамина В₂) и НАФ для ФДТ *in vitro* и *in vivo*. Фотовозбуждение рибофлавина при этом осуществлялось с помощью света из ближнего ИК

диапазона спектра и было опосредовано антистоксовой фотолюминесценцией НАФ, что позволило реализовать метод ФДТ в глубине опухолевой ткани (до 3 мм). Описанный подход может быть предложен как перспективное направление в ФДТ солидных опухолей. ☞

Дополнительная информация

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части биоинженерии и Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научных проектов № 17-00-00122 (К) (17-00-00118) в части экспериментов с SK-BR-3 и LLC и № 18-29-01021 в части экспериментов с культурами глиомных клеток U-87 MG и C6.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Н.В. Шолова и Р.А. Акасов – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материалов, анализ полученных данных, написание текста; Д.А. Хоченков – сбор и обработка материалов, анализ полученных данных, написание текста; А.Н. Генералова – концепция и дизайн статьи, модификация образцов наноразмерных апконвертирующих фосфоров биосовместимым полимерным покрытием, анализ полученных данных; В.А. Семчишен – анализ экспериментальных результатов исследования; Е.В. Хайдуков – концепция и дизайн статьи, утверждение итогового варианта текста рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Литература / References

- Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Grotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(4):250–81. doi: 10.3322/caac.20114.
- Dysart JS, Patterson MS. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells *in vitro*. *Phys Med Biol.* 2005;50(11):2597–616. doi: 10.1088/0031-9155/50/11/011.
- Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010;7(2):61–75. doi: 10.1016/j.pdpdt.2010.02.001.
- Cardoso DR, Libardi SH, Skibsted LH. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. *Food Funct.* 2012;3(5):487–502. doi: 10.1039/c2fo10246c.
- Baier J, Maisch T, Maier M, Engel E, Landthaler M, Bäuml W. Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. *Biophys J.* 2006;91(4):1452–9. doi: 10.1529/biophysj.106.082388.
- Yang MY, Chang CJ, Chen LY. Blue light induced reactive oxygen species from flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide on lethality of HeLa cells. *J Photochem Photobiol B.* 2017;173:325–32. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.06.014.
- Ohara M, Fujikura T, Fujiwara H. Augmentation of the inhibitory effect of blue light on the growth of B16 melanoma cells by riboflavin. *Int J Oncol.* 2003;22(6):1291–5. doi: 10.3892/ijo.22.6.1291.
- Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(6):443–56. doi: 10.1093/jnci/85.6.443.
- Nadort A, Sreenivasan VK, Song Z, Grebenik EA, Nechaev AV, Semchishen VA, Panchenko VY, Zvyagin AV. Quantitative imaging of single upconversion nanoparticles in biological tissue. *PLoS One.* 2013;8(5):e63292. doi: 10.1371/journal.pone.0063292.
- Wang M, Abbineni G, Clevenger A, Mao C, Xu S. Upconversion nanoparticles: synthesis, surface modification and biological applications. *Nanomedicine.* 2011;7(6):710–29. doi: 10.1016/j.nano.2011.02.013.
- Generalova AN, Rocheva VV, Nechaev AV, Khochenkov DA, Sholina NV, Semchishen VA, Zubov VP, Koroleva AV, Chichkova BN, Khaydukova EV. PEG-modified upconversion nanoparticles for *in vivo* optical imaging of tumors. *RSC Adv.* 2016;36(36):30089–97. doi: 10.1039/C5RA25304G.
- Guller AE, Generalova AN, Petersen EV, Nechaev AV, Trusova IA, Landyshev NN, Nadort A, Grebenik EA, Deyev SM, Shekhter AB, Zvyagin AV. Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells. *Nano Res.* 2015;8(5):1546–62. doi: 10.1007/s12274-014-0641-6.
- Bareford LM, Avaritt BR, Ghandehari H, Nan A, Swaan PW. Riboflavin-targeted polymer conjugates for breast tumor delivery. *Pharm Res.* 2013;30(7):1799–812. doi: 10.1007/s11095-013-1024-5.
- Thomas TP, Choi SK, Li MH, Kotlyar A, Baker JR Jr. Design of riboflavin-presenting PAMAM dendrimers as a new nanoplatform for cancer-targeted delivery. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(17):5191–4. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.07.005.
- Sau A, Sanyal S, Bera K, Sen S, Mitra AK, Pal U, Chakraborty PK, Ganguly S, Satpati B, Das C, Basu S. DNA Damage and apoptosis induction in cancer cells by chemically engineered thiolated riboflavin gold nanoassembly. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(5):4582–9. doi: 10.1021/acsami.7b18837.
- Jayapaul J, Arns S, Bunker M, Weiler M, Rutherford S, Comba P, Kiessling F. *In vivo* evaluation of riboflavin receptor targeted fluorescent USPIO in mice with prostate cancer xenografts. *Nano Res.* 2016;9(5):1319–33. doi: 10.1007/s12274-016-1028-7.
- Rao PN, Levine E, Myers MO, Prakash V, Watson J, Stolier A, Kopicko JJ, Kissinger P, Raj SG, Raj MH. Elevation of serum riboflavin carrier protein in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(11):985–90.
- Makdoui K, Goodrich R, Bäckman A. Photochemical eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by blue light activation of riboflavin. *Acta Ophthalmol.* 2017;95(5):498–502. doi: 10.1111/aos.13409.
- Meinhardt M, Krebs R, Anders A, Heinrich U, Tronnier H. Wavelength-dependent penetration depths of ultraviolet radiation in human skin. *J Biomed Opt.* 2008;13(4):044030. doi: 10.1117/1.2957970.
- Рочева ВВ, Шолова НВ, Деревяшкин СП, Генералова АН, Нечаев АВ, Хоченков ДА, Семчишен ВА, Хайдуков ЕВ, Степанова ЕВ, Панченко ВЯ. Люминесцентная диагностика опухолей с применением апконвертирующих наночастиц. *Альманах клинической медицины.* 2016;44(2):227–33. doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-227-233. [Rocheva VV, Sholina NV, Derevyashkin SP, Generalova AN, Nechaev AV, Khochenkov DA, Semchishen VA, Khaydukov EV, Stepanova EV, Panchenko VYa. Luminescence diagnostics of tumors with upconversion nanoparticles. *Almanac of Clinical Medicine.* 2016;44(2):227–33. Russian. doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-227-233.]



In vitro and *in vivo* photodynamic therapy of solid tumors with a combination of riboflavin and upconversion nanoparticles

N.V. Sholina^{1,2,3} • R.A. Akasov^{2,3} • D.A. Khochenkov¹ • A.N. Generalova^{3,4} • V.A. Semchishen³ • E.V. Khaydukov^{2,3}

Rationale: Riboflavin (vitamin B₂) is one of the most promising agents for photodynamic therapy (PDT). However, its use is limited by the excitation in the ultraviolet (UV) and visible spectral ranges and, as a result, by a small penetration into biological tissue not exceeding a few millimeters. This problem could be solved by approaches ensuring excitation of riboflavin molecules within tumor tissues by infrared (IR) light. Upconversion nanoparticles (UCNPs) can be potentially considered as mediators able to effectively convert the exciting radiation of the near IR range, penetrating into biological tissue to a 3 cm depth, into the photoluminescence in the UV and visible spectral ranges. **Aim:** To evaluate the efficacy of UCNPs for IR-mediated riboflavin activation in the depth of tumor tissue during PDT. **Materials and methods:** The water-soluble riboflavin flavin mononucleotide (FMN, Pharmstandard-UfaVITA, Russia) was used as a photosensitizer in *in vitro* and *in vivo* experiments. The *in vitro* experiments were performed on human breast adenocarcinoma SK-BR-3, human glioblastoma U-87 MG, and rat glioma C6 cell lines. Lewis lung carcinoma (LLC) inoculated to hybrid BDF1 mice was used as a model to demonstrate the delivery of FMN to the tumor. UCNPs with a core/shell structure [NaYF₄:Yb³⁺, Tm³⁺/NaYF₄] were used for photoactivation of FMN *in vivo*. PDT based on FMN, UCNPs and laser radiation 975 nm (IR) was performed on mouse xenografts of human breast adenocarcinoma SK-BR-3. **Results:** We were able to show that FMN

could act as an effective *in vitro* photosensitizer for SK-BR-3, U-87 MG, and C6 cell lines. FMN IC₅₀ values for glioma cells were ~30 μM, and for SK-BR-3 cell line ~50 μM (24 h incubation, irradiation 4.2 J/cm²). In the LLC model, the appropriate concentration of FMN (30 μM and above) can be achieved in the tumor as a result of systemic administration of FMN (at 2 and 24 hours after injection). The effect of PDT using near IR light for UCNP-mediated excitation of FMN was demonstrated in mouse xenografts SK-BR-3, with the tumor growth inhibition of 90 ± 5%. **Conclusion:** The study has demonstrated the possibility to use riboflavin (vitamin B₂) as a photosensitizer for PDT. The photoexcitation of FMN via the anti-Stokes photoluminescence of UCNPs allows for implementation of the PDT technique with the near IR spectral range.

Key words: riboflavin, upconversion nanoparticles, photodynamic therapy, photosensitizer, near infrared light

For citation: Sholina NV, Akasov RA, Khochenkov DA, Generalova AN, Semchishen VA, Khaydukov EV. *In vitro* and *in vivo* photodynamic therapy of solid tumors with a combination of riboflavin and upconversion nanoparticles. Almanac of Clinical Medicine. 2019;47(7):647–53. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-057.

Received 5 July 2019; revised 17 October 2019; accepted 24 October 2019; published online 1 November 2019

Funding

The study was performed with the support from the Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation as a part of the state research task for the Federal Scientific Research Centre “Crystallography and Photonics” of Russian Academy of Sciences (the bioimaging part of the study) and from the Russian Foundation for Fundamental Research as research projects #17-00-00122 (K) (17-00-00118) (the experiments with SK-BR-3 and LLC) and #18-29-01021 (the experiments with U-87 MG and C6 glioma cell cultures).

Conflict of interests

All the authors declare no potential conflict of interests that would necessitate any disclosure in this publication.

Authors' contributions

N.V. Sholina and R.A. Akasov, the study concept and design, data collection and management, analysis of the results, text writing; D.A. Khochenkov, data collection and managements, analysis of the results, text writing; A.N. Generalova, the study concept and design, modification of the upconversion nanoparticle phosphorus samples with a biocompatible polymer coating, analysis of the results; V.A. Semchishen, analysis of the experimental results; E.V. Khaydukov, the paper concept and design, approval of the final version of the manuscript. All the authors have significantly contributed to the study conduct and paper preparation, have read and approved the final version before submission.

Natal'ya V. Sholina – Postgraduate Student, Junior Research Fellow, Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis¹; Laboratory of Photon Bioengineering, Institute of Molecular Medicine²; Laboratory of Laser Biomedicine³; ORCID: 0000-0001-9866-2878

✉ 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation. Tel.: + 7 (926) 957 96 63. E-mail: SholinaNV@gmail.com

Roman A. Akasov – PhD, Research Fellow, Laboratory of Photon Bioengineering, Institute of Molecular Medicine²; Laboratory of Laser Biomedicine³; ORCID: 0000-0001-6486-8114

Dmitry A. Khochenkov – PhD (in Biol.), Head of the Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis¹; ORCID: 0000-0002-5694-3492

Alla N. Generalova – PhD (in Chem.), Senior Research Fellow, Laboratory of Laser Biomedicine³; Laboratory “Polymers for Biology”⁴; ORCID: 0000-0001-9646-1693

Vladimir A. Semchishen – PhD (in Phys. and Math.), Leading Research Fellow, Laboratory of Laser Biomedicine³; ORCID: 0000-0003-1035-3013

Evgeny V. Khaydukov – PhD (in Phys. and Math.), Head of the Laboratory of Photon Bioengineering, Institute of Molecular Medicine²; Head of the Laboratory of Laser Biomedicine³; ORCID: 0000-0002-3900-2949

¹N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8/2 Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russian Federation

³Federal Scientific Research Centre “Crystallography and Photonics” of Russian Academy of Sciences; 59 Leninsky prospekt, Moscow, 119333, Russian Federation

⁴M.M. Shemyakin – Yu.A. Ovchinnikov Institute of Biorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences; 16/10 Miklukho-Maklaya ul., Moscow, 117997, Russian Federation



Оригинальная статья

Прогностическое значение ультразвукового контроля легких после кардиохирургических вмешательств в условиях искусственного кровообращения

Фот Е.В.¹ • Изотова Н.Н.¹ • Виноградов М.В.¹ • Кузьков В.В.¹ • Киров М.Ю.¹

Фот Евгения Владимировна – канд. мед. наук, доцент кафедры анестезиологии и реаниматологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0052-8086>

✉ 163000, г. Архангельск, Троицкий проспект, 51, Российская Федерация. Тел.: +7 (921) 295 06 85. E-mail: ev_fot@mail.ru

Изотова Наталья Николаевна – аспирант, кафедра анестезиологии и реаниматологии¹

Виноградов Михаил Валерьевич – клинический ординатор, кафедра анестезиологии и реаниматологии¹

Кузьков Всеволод Владимирович – д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры анестезиологии и реаниматологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8191-1185>

Киров Михаил Юрьевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4375-3374>

Актуальность. Наряду с обзорной прикроватной рентгенографией органов грудной клетки для выявления послеоперационных дыхательных осложнений все чаще используется ультразвуковой контроль состояния легких. Целью нашего исследования была оценка эффективности ультразвукового контроля легких в выявлении послеоперационных дыхательных осложнений у пациентов после кардиохирургических вмешательств, выполненных в условиях искусственного кровообращения.

Материал и методы. В исследование было включено 39 пациентов, перенесших плановые кардиохирургические вмешательства в условиях искусственного кровообращения. При поступлении в отделение интенсивной терапии (ОИТ), а также через 6 и 24 часа после оперативного вмешательства всем пациентам выполнялась оценка показателей гемодинамики и газообмена. Кроме того, проводили ультразвуковой контроль, включающий подсчет количества В-линий в 12 квадрантах легких через 6 и 24 часа после операции, а также рентгенологическое исследование органов грудной клетки через 24 часа после вмешательства. Учитывали длительность искусственной вентиляции легких, время пребывания в ОИТ и стационаре. **Результаты.** Ухудшение газообмена было ассоциировано с большим числом В-линий: 9 (5–15) спустя 24 часа после оперативного вмешательства; при этом у пациентов с $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ более 300 мм рт. ст. количество В-линий через 24 часа после операции составило 4 (2–8) ($p=0,04$). Изменения на обзорной рентгенограмме органов грудной клетки были зарегистрированы через 24 часа после оперативного вмешательства

у 69% пациентов. Наиболее часто отмечали наличие дисковидных ателектазов ($n=13$). Проведение ROC-анализа выявило, что увеличение количества В-линий более 10 спустя 6 часов после завершения оперативного вмешательства позволяло предсказать развитие рентгенологических изменений через 24 часа после операции (AUC 0,82, $p=0,02$, чувствительность 86%, специфичность 76%). Через 6 часов после вмешательства количество В-линий при ультразвуковом исследовании было больше у пациентов, которым в дальнейшем потребовалось проведение продленной вентиляции легких: 15 (14–27) по сравнению с 10 (3–13) у больных с экстубацией трахеи в течение первых 24 часов после операции ($p=0,02$). **Заключение.** Ультразвуковой контроль легких ускоряет диагностику дыхательных нарушений после кардиохирургических вмешательств и своевременно выявляет пациентов с более длительной потребностью в респираторной поддержке и пребывании в ОИТ.

Ключевые слова: послеоперационная дыхательная недостаточность, ультразвук легких, кардиохирургические вмешательства

Для цитирования: Фот ЕВ, Изотова НН, Виноградов МВ, Кузьков ВВ, Киров МЮ. Прогностическое значение ультразвукового контроля легких после кардиохирургических вмешательств в условиях искусственного кровообращения. Альманах клинической медицины. 2019;47(7):654–61. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-053.

Поступила 03.12.2018; принята к публикации 08.10.2019; опубликована онлайн 11.10.2019

¹ ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России; 163000, г. Архангельск, Троицкий проспект, 51, Российская Федерация



Кардиохирургические вмешательства часто сопровождаются развитием послеоперационных дыхательных осложнений (ПДО) [1–3], что ведет к увеличению продолжительности послеоперационной искусственной вентиляции легких (ИВЛ), пребывания в отделении интенсивной терапии (ОИТ) и стационаре, а также повышает нагрузку на медицинский персонал и стоимость терапии [4–6]. Раннее выявление ПДО наряду с активной реализацией комплекса лечебных мероприятий может способствовать улучшению исходов лечения этой категории пациентов. Наиболее частым вариантом ПДО при кардиохирургических вмешательствах является ателектазирование, в которое может вовлекаться до 50% объема легочной ткани, особенно в юкстадиафрагмальных и юкстакардиальных участках [7, 8]. Послеоперационные изменения в легких достаточно часто включают интерстициальный синдром и развитие отека легких, а они нуждаются в комплексной диагностике с использованием различных инструментальных методик [9–11].

Традиционным методом контроля состояния легочной ткани в ОИТ остается обзорная прикроватная рентгенография органов грудной клетки. Вместе с тем известно, что рентгенологическая картина обладает низкой диагностической точностью в выявлении типичных ПДО – ателектазирования, интерстициального синдрома и плеврита. Кроме того, рентгенологические изменения, как правило, отстают от клинической манифестации ПДО и нарушений газообмена [6, 12]. Немаловажно, что обзорная рентгенография и золотой стандарт исследования легочной ткани – рентгеновская компьютерная томография – сопряжены

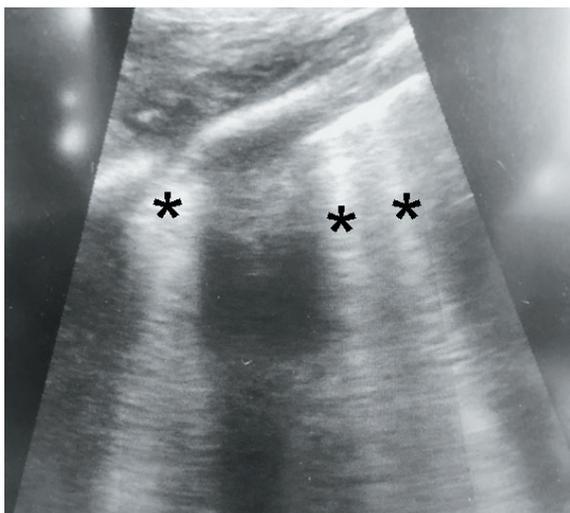


Рис. 1. Ультразвуковая картина В-линий; * В-линии

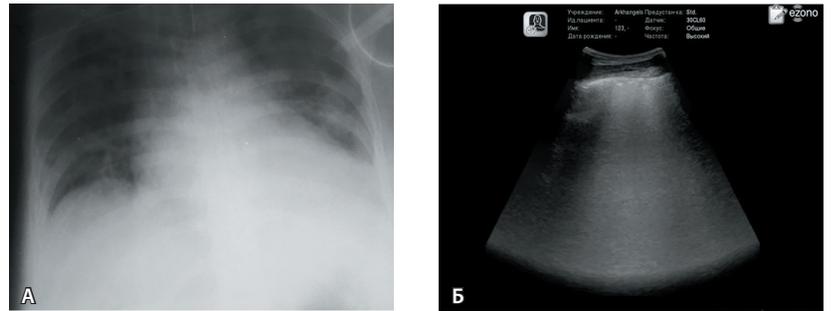


Рис. 2. Ультразвуковая и рентгенологическая картина отека легких. А – рентгенологическая картина интерстициального отека легких; Б – множественные сливные В-линии во всех квадрантах указывают на наличие отека легких

с повышенной лучевой нагрузкой и увеличением финансовых затрат.

В настоящее время в практике врача-реаниматолога все активнее используется быстрая прикроватная ультразвуковая оценка состояния паренхимы легких. Так, для выявления причины гипоксемии рекомендован протокол BLUE (Bedside Lung Ultrasonography in Emergency). Он позволяет определить наиболее частые причины гипоксемии и дыхательной недостаточности – консолидацию, плевральный выпот, пневмоторакс и интерстициальный синдром (отек). Возможна как комплексная, так и изолированная оценка ультрасонографических артефактов, указывающих на паренхиматозные изменения в легких, в частности, изолированная оценка В-линий в нескольких зонах легких с выведением усредненного значения [13, 14]. Увеличение количества В-линий, представляющих собой вертикальные артефакты реверберации ультразвука в результате его многократного отражения от утолщенных межальвеолярных перегородок («хвост кометы» или «легочные ракеты» (рис. 1), служит характерным признаком интерстициального синдрома или отека легких (рис. 2) [15, 16].

Ряд исследований уже подтвердил высокую диагностическую и прогностическую ценность ультразвукового контроля в раннем выявлении ПДО у некардиохирургических пациентов [6, 17]. Однако ценность ультразвука после кардиохирургических вмешательств неоднозначна [12]. Например, не ясны возможности ультразвука по обнаружению дыхательных осложнений на более раннем этапе по сравнению с обзорной прикроватной рентгенографией органов грудной клетки.

Целью нашего исследования была оценка эффективности ультразвукового контроля легких в выявлении ПДО у пациентов после кардиохирургических вмешательств в условиях искусственного кровообращения.

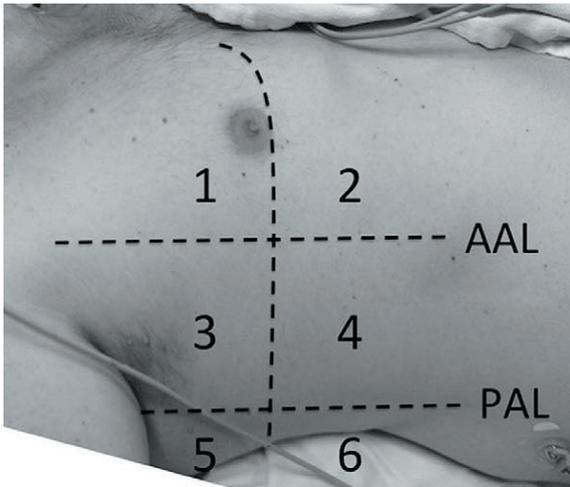


Рис. 3. Схема ультразвуковой оценки легких [19]. Грудная клетка делилась на 12 квадрантов. В каждом квадранте выполнялся подсчет количества В-линий. В дальнейшем показатели суммировались. AAL – передняя подмышечная линия, PAL – задняя подмышечная линия

Материал и методы

В проспективное наблюдательное исследование включено 39 взрослых пациентов (21 мужчина, 18 женщин). Протокол исследования и информированное согласие пациентов были одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО «СГМУ» МЗ РФ (г. Архангельск). Критерием включения в исследование было выполнение планового кардиохирургического вмешательства в условиях искусственного кровообращения с последующей госпитализацией в кардиохирургическое ОИТ. Критерием исключения служило морбидное ожирение, затрудняющее ультразвуковую оценку легочной ткани. Анестезия, а также периоперационная инфузионная терапия и респираторная поддержка осуществлялись согласно локальному протоколу [18]. При поступлении в ОИТ пациентам обеспечивалась мультимодальная анальгезия в виде продленной инфузии фентанила, а также дробного введения парацетамола. Решение о прекращении респираторной поддержки принималось, опираясь на стандартные критерии прохождения теста на переносимость спонтанного дыхания. При прекращении респираторной поддержки использовались следующие критерии: способность в течение 30 минут осуществлять адекватное спонтанное дыхание на фоне поддержки давлением 6–8 см вод. ст., $PaO_2/FiO_2 > 250$ мм рт. ст., спонтанный минутный объем вентиляции менее 10 л/мин и частота дыхания < 30 /мин, а также нормальная температура тела, отсутствие явного кровотечения или

анемии, гемодинамическая стабильность и адекватная анальгезия.

У всех пациентов регистрировали показатели гемодинамики, вентиляции и газообмена, ряд лабораторных показателей при поступлении в ОИТ, а также через 6 и 24 часа после оперативного вмешательства. Непрерывно мониторировали инвазивное артериальное давление (лучевая артерия), центральное венозное давление, SpO_2 . В послеоперационном периоде регистрировали параметры вентиляции, газовый состав артериальной крови, концентрацию лактата в артериальной крови и концентрацию альбумина. Регистрировали длительность послеоперационной ИВЛ, сроки пребывания в ОИТ и стационаре, частоту летальных исходов к 28-м суткам после вмешательства. Всем пациентам выполняли обзорную рентгенографию легких через 24 часа после вмешательства. Оценка результатов рентгенологического исследования выполнялась специалистом соответствующего профиля. Рентгенологическими изменениями считали любые структурные изменения легочной ткани: инфильтрацию, гиповентиляцию или ателектазирование. Под гипоксемией подразумевали значение PaO_2/FiO_2 менее 300 мм рт. ст.

Ультразвуковое исследование легких (eZono 3, Германия) выполняли всем пациентам через 6 и 24 часа после окончания вмешательства. Динамическая оценка осуществлялась одним и тем же исследователем. Настройка глубины исследования при оценке легочной паренхимы составила 13–14 см при стандартизованных установках фокусировки (дальний фокус), контрастности и яркости изображения. Ультразвуковая оценка проводилась в положении пациента на спине с приподнятым на 45° головным концом кровати с обеих сторон в шести точках (рис. 3) [19]. Для унификации оценки до и после вмешательства выполняли разметку зоны постановки датчика маркером. Оценка проводилась путем подсчета количества В-линий в каждом квадранте легких с их дальнейшей суммацией.

Для анализа данных использована программа SPSS (версия 17, IBM, США). Распределение данных оценивали с помощью критерия Шапиро – Уилка. Данные представлены в виде медианы (25–75-й перцентили). Оценка корреляционных связей осуществлялась с помощью теста Спирмена с расчетом значения *rho*. Внутригрупповые различия оценивали при помощи критерия Вилкоксона, межгрупповые – U-критерия Манна – Уитни. Для выявления прогностической значимости ультразвукового исследования выполняли ROC-анализ. Статистически значимым считали значение *p* менее 0,05.



Результаты

Характеристика пациентов, включая структуру заболеваемости, дана в табл. 1. Послеоперационный период характеризовался стабильными показате-

Таблица 1. Общая характеристика пациентов

| Показатель | Значение |
|--|---------------|
| Возраст, годы | 63 (53–69) |
| Пол (мужчины/женщины) | 21/18 |
| Индекс массы тела, кг/м ² | 28 (24–32) |
| EuroScore, балл | 2,6 (1,2–4,1) |
| Структура заболеваемости: | |
| поражение одного клапана | 21 |
| поражение двух и более клапанов | 13 |
| аневризма восходящего отдела аорты | 3 |
| дефект межпредсердной перегородки | 1 |
| дефект межжелудочковой перегородки | 1 |
| Летальность, абс. (%) | 0 |
| Продолжительность вмешательства, мин | 213 (188–266) |
| Продолжительность искусственного кровообращения, мин | 122 (99–139) |
| Длительность пребывания в отделении интенсивной терапии, сут | 3 (1–5) |
| Длительность госпитализации, сут | 20 (16–22) |

Таблица 2. Послеоперационные показатели состояния системы дыхания и кровообращения

| Показатель | В ОИТ | Через 6 часов | Через 24 часа |
|---|-----------------|---------------|--------------------|
| PaO ₂ /FiO ₂ , мм рт. ст. | 329 (230–430) | 377 (290–439) | 376 (324–400) |
| PaCO ₂ , мм рт. ст. | 41 (38–46) | 40 (38–43) | 38 (36–42) |
| Лактат, ммоль/л | 1,9 (1,5–2,7) | 2,1 (1,7–2,7) | 2,0 (1,5–2,8) |
| АД среднее, мм рт. ст. | 73 (66–83) | 76 (68–84) | 73 (68–82) |
| ЧСС, уд/мин | 80 (72–80) | 78 (68–82) | 72 (64–80) |
| ЦВД, см вод. ст. | 15 (13–17) | 8 (4–12) | 6 (3–9) |
| Гидробаланс, мл | 1100 (800–1780) | – | 130 (–217... +450) |
| Альбумин, г/л | 35 (32–38) | 34 (30–38) | 34 (32–38) |
| Число В-линий | – | 11 (4–14) | 7 (3–10)* |

PaCO₂ – парциальное напряжение углекислого газа в артериальной крови, PaO₂/FiO₂ – отношение парциального напряжения кислорода в артериальной крови к фракции вдыхаемого кислорода, АД – артериальное давление, ОИТ – отделение интенсивной терапии, ЦВД – центральное венозное давление, ЧСС – частота сердечных сокращений

Данные представлены в виде медианы (25–75-й перцентили)

*p < 0,05 при проведении внутригрупповых сравнений

лями гемодинамики и газообмена (табл. 2). Спустя 24 часа после вмешательства наблюдалось достоверное снижение количества В-линий по сравнению со значениями этого показателя через 6 часов после вмешательства (p = 0,02, см. табл. 2).

Нами не было обнаружено взаимосвязи между показателями оксигенации и количеством В-линий через 6 часов после операции. Спустя 24 часа показатель PaO₂/FiO₂ < 300 мм рт. ст. ассоциировался с большим количеством В-линий – 9 (5–15); у пациентов без признаков гипоксемии количество В-линий через 24 часа после операции составило 4 (2–8) (p = 0,04, рис. 4). Снижение концентрации альбумина через 24 часа после операции сопровождалось большим количеством В-линий через 6 и 24 часа (rho = -0,53 и -0,56 соответственно, p < 0,05).

Через 24 часа после вмешательства изменения на обзорной рентгенограмме органов грудной клетки были зафиксированы у 69% пациентов, при этом наиболее часто отмечали наличие дисковидных ателектазов (n = 13; 33%, рис. 5), также достаточно часто встречались зоны гиповентиляции (n = 10; 26%) и инфильтрация легочной ткани (n = 4; 10%); кроме того, у 18 пациентов (46%) было зафиксировано наличие плеврального выпота (малый гидроторакс). Проведение ROC-анализа выявило, что увеличение количества В-линий более 10 через 6 часов после вмешательства позволяло предсказать развитие рентгенологических изменений спустя 24 часа после операции с AUC 0,82 (p = 0,02, чувствительность 86%, специфичность 76%) (рис. 6).

В течение первых 12 часов после оперативного вмешательства успешная экстубация трахеи была проведена у 36 (92,7%) пациентов. Три пациента (7,7%) потребовали продленной респираторной поддержки более 48 часов в связи с явлениями послеоперационной дыхательной недостаточности.

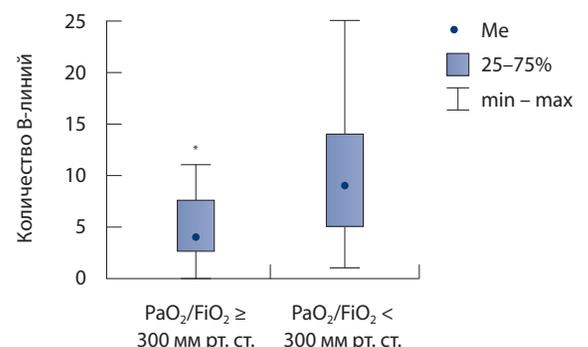


Рис. 4. Изменение количества В-линий в зависимости от PaO₂/FiO₂ через 24 часа после операции; *p = 0,04

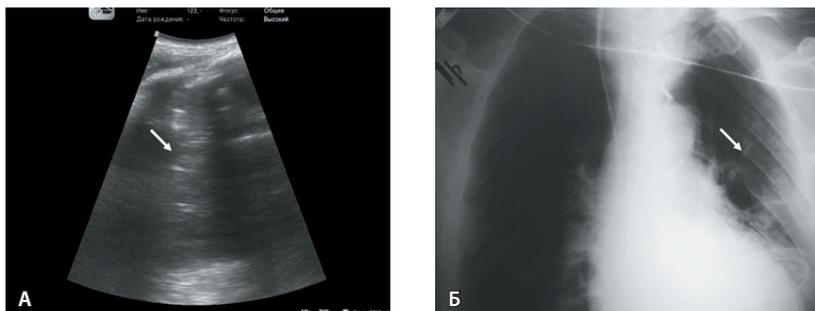


Рис. 5. Ультразвуковая и рентгенологическая картина ателектазирования легочной ткани. На наличие дисковидных ателектазов легочной ткани могут указывать характерные ультразвуковые (А) и рентгенологические (Б) изменения

Через 6 часов после вмешательства количество В-линий при ультразвуковом исследовании было больше у пациентов, которым в дальнейшем потребовалось проведение продленной ИВЛ: 15 (14–27) по сравнению с 10 (3–13) у больных с экстубацией трахеи в течение первых 12 часов после операции ($p=0,02$). Подобная динамика сохранялась и спустя 24 часа: было выявлено 25 (15–27) В-линий у пациентов, нуждавшихся в продленной ИВЛ, по сравнению с 6 (3–9) у больных с успешной экстубацией трахеи в первые 12 часов ($p=0,001$). В ходе ROC-анализа было показано: число В-линий менее 6, оцененное через 6 часов после

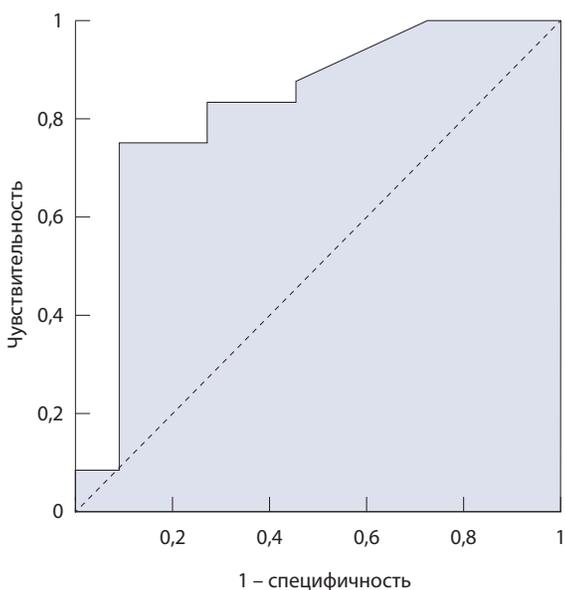


Рис. 6. ROC-анализ ультразвукового исследования легких через 6 часов после операции и рентгенологических изменений на обзорной рентгенограмме органов грудной клетки через 24 часа после операции. AUC – 0,82, $p=0,02$, ассоциативный критерий ≥ 10 , чувствительность 86%, специфичность 76%. AUC – площадь под кривой

вмешательства, позволяет предсказать успешную раннюю экстубацию трахеи с отсутствием потребности в продленной ИВЛ (AUC 0,89, $p=0,03$, чувствительность 100%, специфичность 60%), при этом прогностическая значимость ультразвуковой картины сохранялась и спустя 24 часа при количестве В-линий менее 5 (AUC 0,98, $p=0,01$, чувствительность 100%, специфичность 60%). У пациентов, которым потребовалось проведение продленной ИВЛ, при рентгенографическом исследовании была заподозрена пневмония (в 1 случае) и наличие множественных дисковидных ателектазов (2 случая). Примечательно также, что у пациентов, нуждавшихся в более длительном пребывании в ОИТ, через 24 часа после операции было выявлено большее число В-линий: 8 (5–13) по сравнению с 3 (1–7) у пациентов, переведенных из ОИТ в первые 24 часа. Никому из пациентов не потребовалось повторного перевода на ИВЛ. Летальных исходов к 28-му дню исследования зафиксировано не было.

Обсуждение

Имеющиеся в литературе данные о наличии взаимосвязи между послеоперационной оксигенацией и ультразвуковой оценкой интерстициального синдрома и консолидации весьма противоречивы [6, 20]. Так, у пациентов после обширных абдоминальных вмешательств подобной взаимосвязи установлено не было [6]. В этой же работе была показана удовлетворительная предиктивная способность ультразвуковой оценки степени консолидации легочной ткани в отношении отсроченной гипоксемии. Вместе с тем у пациентов с отеком легких на фоне развития острого повреждения почек взаимосвязь между количеством В-линий и гипоксемией прослеживалась весьма отчетливо [20]. Возможность ультразвука оценивать количество В-линий использовалась рядом авторов как маркер начинающейся гипергидратации и рекомендована для протоколов целенаправленной инфузионной терапии [21]. Некоторые авторы также валидировали количество В-линий с уровнем внесосудистой воды легких [22–24].

В нашей работе основными изменениями при рентгенологическом исследовании были наличие плеврального выпота и ателектазирование легочной ткани, что частично может объяснить отсутствие взаимосвязи между количеством В-линий и оксигенацией. При этом через 24 часа после операции снижение PaO_2/FiO_2 менее 300 мм рт. ст. ассоциировалось с большим количеством В-линий, чем у пациентов без гипоксемии. Подчеркнем, что увеличение количества В-линий может указывать



не только на двусторонний отек легких, характерный для острого респираторного дистресс-синдрома или сердечной недостаточности, но и на развитие очаговых изменений в легких, характерных для пневмонии и ателектазирования [25–27]. В частности, на развитие пневмонии или ателектазирования может указывать одностороннее или ограниченное несколькими квадрантами повышение количества В-линий [28, 29].

Значительное количество рентгенологических изменений в первые сутки послеоперационного периода, отмеченное в нашей работе, согласуется с данными других авторов, согласно которым у 5–75% пациентов кардиохирургического профиля диагностируется наличие ателектазов и/или плеврального выпота [1–3]. Способность ультразвукового контроля легких предсказывать последующие изменения на рентгенограмме, обнаруженная в нашем исследовании, подтверждает недавние результаты Н.Р. Тоув и соавт. [12]. Кроме того, ряд работ указывает на большую точность и раннее выявление ателектазов, а также плеврального выпота при ультразвуковом исследовании легких по сравнению с обзорной рентгенографией [12, 29–31]. Представляется важным, что во всех этих работах использовался протокол BLUE, нацеленный не только на расчет количества В-линий, но и на выявление инфильтративных изменений, а также плеврального выпота. Интересным в этой связи выглядит исследование G. Volpicelli и соавт., которые показали, что наличие множественных В-линий в одном квадранте не всегда указывает на развитие интерстициального отека, а может окружать зону инфильтрации легочной ткани [29].

В ходе нашего исследования нельзя сделать однозначных выводов о взаимосвязи между увеличением количества В-линий и потребностью в продленной ИВЛ. В настоящее время существует несколько работ по оценке эффективности ультразвука легких в выявлении пациентов, нуждающихся в респираторной поддержке [32, 33], а также больных с высоким риском повторного перевода на ИВЛ [34]. Так, в исследовании Р. Мауо и соавт. повышение количества В-линий, основного

компонента шкалы LUS, в ходе теста на переносимость спонтанного дыхания сопровождалось увеличением частоты неудачной экзубации трахеи. При этом количество баллов по шкале LUS > 17 соответствовало высокому риску срыва отлучения от ИВЛ [34]. Авторы данной работы объясняли появление множественных В-линий в ходе теста на переносимость спонтанного дыхания выраженной деаэрацией легочной ткани.

Наши результаты подтверждают, что ультразвуковая оценка легких может играть ключевую роль в выборе времени для проведения теста на переносимость спонтанного дыхания, а также служить эффективным маркером ответа на проводимую респираторную терапию [34]. Следует отметить, что несмотря на связь количества В-линий с отсроченными рентгенологическими изменениями, продленной ИВЛ и пребыванием в ОИТ, отрицательной стороной протокола, использованного в нашей работе, является невозможность убедительно определить причину дыхательных осложнений, в отличие от протокола BLUE, который позволяет провести дифференциальную диагностику причин ПДО. Тем не менее важным преимуществом данной методики представляется простота и скорость выполнения оценки В-линий. Так, в работе Z. Jambrik и соавт. подсчет количества В-линий в нескольких квадрантах легких занимал в среднем 3 минуты [24]. В другом исследовании было показано, что клинические ординаторы и врачи с небольшим опытом работы гораздо эффективнее выявляли наличие отека легких по данным ультразвукового исследования, чем по результатам рентгенографии органов грудной клетки [11].

Заключение

После кардиохирургических вмешательств ультразвуковой контроль легких ускоряет диагностику дыхательных нарушений и своевременно выявляет пациентов с более длительной потребностью в респираторной поддержке и пребывании в ОИТ. Необходима дальнейшая валидация различных протоколов ультразвуковой оценки в выявлении послеоперационных дыхательных осложнений. ☺

Дополнительная информация

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации для ведущих научных школ НШ-3927.2018.7.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Благодарности

Авторы благодарят персонал кардиохирургической реанимации ГБУЗ АО «Первая городская клиническая больница имени Е.Е. Волосевич» за оказанную помощь.



Литература / References

- Weissman C. Pulmonary complications after cardiac surgery. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2004;8(3):185–211. doi: 10.1177/108925320400800303.
- Rubinowitz AN, Siegel MD, Tocino I. Thoracic imaging in the ICU. *Crit Care Clin*. 2007;23(3):539–73. doi: 10.1016/j.ccc.2007.06.001.
- Jain U, Rao TL, Kumar P, Kleinman BS, Belusko RJ, Kanuri DP, Blakeman BM, Bakhos M, Wallis DE. Radiographic pulmonary abnormalities after different types of cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1991;5(6):592–5. doi: 10.1016/1053-0770(91)90013-j.
- Ball L, Costantino F, Pelosi P. Postoperative complications of patients undergoing cardiac surgery. *Curr Opin Crit Care*. 2016;22(4):386–92. doi: 10.1097/MCC.0000000000000319.
- Chiumello D, Chevillard G, Gregoretti C. Non-invasive ventilation in postoperative patients: a systematic review. *Intensive Care Med*. 2011;37(6):918–29. doi: 10.1007/s00134-011-2210-8.
- Kuzkov VV, Rodionova LN, Ilyina YY, Ushakov AA, Sokolova MM, Fot EV, Duberman BL, Kirov MY. Protective ventilation improves gas exchange, reduces incidence of atelectases, and affects metabolic response in major pancreaticoduodenal surgery. *Front Med (Lausanne)*. 2016;3:66. doi: 10.3389/fmed.2016.00066.
- Magnusson L, Spahn DR. New concepts of atelectasis during general anaesthesia. *Br J Anaesth*. 2003;91(1):61–72. doi: 10.1093/bja/aeg085.
- Pieczkoski SM, Margarites AGF, Sbruzzi G. Noninvasive ventilation during immediate postoperative period in cardiac surgery patients: systematic review and meta-analysis. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2017;32(4):301–11. doi: 10.21470/1678-9741-2017-0032.
- Al Deeb M, Barbic S, Featherstone R, Dankoff J, Barbic D. Point-of-care ultrasonography for the diagnosis of acute cardiogenic pulmonary edema in patients presenting with acute dyspnea: a systematic review and meta-analysis. *Acad Emerg Med*. 2014;21(8):843–52. doi: 10.1111/acem.12435.
- Wooten WM, Shaffer LET, Hamilton LA. Bed-side Ultrasound Versus Chest Radiography for Detection of Pulmonary Edema: A Prospective Cohort Study. *J Ultrasound Med*. 2019;38(4):967–73. doi: 10.1002/jum.14781.
- Martindale JL, Noble VE, Liteplo A. Diagnosing pulmonary edema: lung ultrasound versus chest radiography. *Eur J Emerg Med*. 2013;20(5):356–60. doi: 10.1097/MEJ.0b013e32835c2b88.
- Touw HR, Parlevliet KL, Beerepoot M, Schober P, Vonk A, Twisk JW, Elbers PW, Boer C, Tuinman PR. Lung ultrasound compared with chest X-ray in diagnosing postoperative pulmonary complications following cardiothoracic surgery: a prospective observational study. *Anaesthesia*. 2018;73(8):946–54. doi: 10.1111/anae.14243.
- Gutierrez M, Salaffi F, Carotti M, Tardella M, Pineda C, Bertolazzi C, Bichisecci E, Filippucci E, Grassi W. Utility of a simplified ultrasound assessment to assess interstitial pulmonary fibrosis in connective tissue disorders – preliminary results. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(4):R134. doi: 10.1186/ar3446.
- Tardella M, Di Carlo M, Carotti M, Filippucci E, Grassi W, Salaffi F. Ultrasound B-lines in the evaluation of interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis: Cut-off point definition for the presence of significant pulmonary fibrosis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(18):e0566. doi: 10.1097/MD.00000000000010566.
- Lichtenstein DA. Lung ultrasound in the critically ill. *Ann Intensive Care*. 2014;4:1. doi: 10.1186/2110-5820-4-1.
- Ляхин РЕ, Щеголев АВ, Жирнова ЕА, Емельянов АА, Грачев ИН. Характеристика ультразвуковых признаков в диагностике объема и характера поражения легких. *Вестник интенсивной терапии*. 2016;(4):5–11. [Lahin RE, Shhegolev AV, Zhirnova EA, Emeljanov AA, Grachev IN. Features of ultrasonic signs in the diagnosis of volume and nature of lung disease. *Intensive Care Herald*. 2016;(4):5–11. Russian.]
- Lichtenstein DA, Lascols N, Prin S, Mezière G. The "lung pulse": an early ultrasound sign of complete atelectasis. *Intensive Care Med*. 2003;29(12):2187–92. doi: 10.1007/s00134-003-1930-9.
- Ленькин ПИ, Смёткин АА, Хусейн АФ, Ленькин АИ, Паромов КВ, Ушаков АА, Крыгина МА, Киров МЮ. Непрерывный мониторинг лактата и глюкозы при комплексной хирургической коррекции приобретенных комбинированных пороков сердца и ишемической болезни сердца. *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2015;12(6):4–15. doi: 10.21292/2078-5658-2015-12-6-4-15. [Len'kin PI, Smyotkin AA, Khusseyan A, Len'kin AI, Paromov KV, Ushakov AA, Krygina MA, Kirov MY. Continuous monitoring of lactate and glucose during the integral surgical management of acquired combined heart valvular diseases and ischemic heart disease. *Messenger of Anesthesiology and Resuscitation*. 2015;12(6):4–15. Russian. doi: 10.21292/2078-5658-2015-12-6-4-15.]
- Monastesse A, Girard F, Massicotte N, Chartrand-Lefebvre C, Girard M. Lung ultrasonography for the assessment of perioperative atelectasis: a pilot feasibility study. *Anesth Analg*. 2017;124(2):494–504. doi: 10.1213/ANE.0000000000001603.
- Ciumanghel A, Siropol I, Blaj M, Siropol D, Gavrilovici C, Covic A. B-lines score on lung ultrasound as a direct measure of respiratory dysfunction in ICU patients with acute kidney injury. *Int Urol Nephrol*. 2018;50(1):113–9. doi: 10.1007/s11255-017-1730-8.
- Lichtenstein D. FALLS-protocol: lung ultrasound in hemodynamic assessment of shock. *Heart Lung Vessel*. 2013;5(3):142–7.
- Picano E, Frassi F, Agricola E, Gligorova S, Gargani L, Mottola G. Ultrasound lung comets: a clinically useful sign of extravascular lung water. *J Am Soc Echocardiogr*. 2006;19(3):356–63. doi: 10.1016/j.echo.2005.05.019.
- Picano E, Pellikka PA. Ultrasound of extravascular lung water: a new standard for pulmonary congestion. *Eur Heart J*. 2016;37(27):2097–104. doi: 10.1093/eurheartj/ehw164.
- Jambrik Z, Monti S, Coppola V, Agricola E, Mottola G, Miniati M, Picano E. Usefulness of ultrasound lung comets as a nonradiologic sign of extravascular lung water. *Am J Cardiol*. 2004;93(10):1265–70. doi: 10.1016/j.amjcard.2004.02.012.
- Hasan AA, Makhlouf HA. B-lines: Transthoracic chest ultrasound signs useful in assessment of interstitial lung diseases. *Ann Thorac Med*. 2014;9(2):99–103. doi: 10.4103/1817-1737.128856.
- Bataille B, Rao G, Cocquet P, Mora M, Masson B, Ginot J, Silva S, Moussot PE. Accuracy of ultrasound B-lines score and E/Ea ratio to estimate extravascular lung water and its variations in patients with acute respiratory distress syndrome. *J Clin Monit Comput*. 2015;29(1):169–76. doi: 10.1007/s10877-014-9582-6.
- Wang G, Ji X, Xu Y, Xiang X. Lung ultrasound: a promising tool to monitor ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Crit Care*. 2016;20(1):320. doi: 10.1186/s13054-016-1487-y.
- Le Neindre A, Mongodi S, Philippart F, Bouhemad B. Thoracic ultrasound: Potential new tool for physiotherapists in respiratory management. A narrative review. *J Crit Care*. 2016;31(1):101–9. doi: 10.1016/j.jccr.2015.10.014.
- Volpicelli G, Elbarbary M, Blaivas M, Lichtenstein DA, Mathis G, Kirkpatrick AW, Melniker L, Gargani L, Noble VE, Via G, Dean A, Tsung JW, Soldati G, Copetti R, Bouhemad B, Reissig A, Agricola E, Rouby JJ, Arbelot C, Liteplo A, Sargsyan A, Silva F, Hoppmann R, Breitkreutz R, Seibel A, Neri L, Storti E, Petrovic T; International Liaison Committee on Lung Ultrasound (ILC-LUS) for International Consensus Conference on Lung Ultrasound (ICC-LUS). International evidence-based recommendations for point-of-care lung ultrasound. *Intensive Care Med*. 2012;38(4):577–91. doi: 10.1007/s00134-012-2513-4.



30. Ashton-Cleary DT. Is thoracic ultrasound a viable alternative to conventional imaging in the critical care setting? *Br J Anaesth.* 2013;111(2): 152–60. doi: 10.1093/bja/aet076.
31. Lichtenstein D, Goldstein I, Mourgeon E, Cluzel P, Grenier P, Rouby JJ. Comparative diagnostic performances of auscultation, chest radiography, and lung ultrasonography in acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology.* 2004;100(1):9–15. doi: 10.1097/0000542-200401000-00006.
32. Oropello J, Rahmanian M. Can chest sonography predict and facilitate successful ventilator weaning? *Crit Care Med.* 2013;41(8):2065–7. doi: 10.1097/CCM.0b013e3182963e91.
33. Yang KL, Tobin MJ. A prospective study of indexes predicting the outcome of trials of weaning from mechanical ventilation. *N Engl J Med.* 1991;324(21):1445–50. doi: 10.1056/NEJM199105233242101.
34. Mayo P, Volpicelli G, Lerolle N, Schreiber A, Doelken P, Vieillard-Baron A. Ultrasonography evaluation during the weaning process: the heart, the diaphragm, the pleura and the lung. *Intensive Care Med.* 2016;42(7):1107–17. doi: 10.1007/s00134-016-4245-3.

Prognostic value of lung ultrasonography after on-pump cardiac surgery

E.V. Fot¹ • N.N. Izotova¹ • M.V. Vinogradov¹ • V.V. Kuzkov¹ • M.Y. Kirov¹

Rationale: Along with bedside plain chest radiography, lung ultrasonography is being increasingly used for detection of postoperative respiratory complications. **Aim:** Our study was aimed at the evaluation of lung ultrasonography efficacy for the diagnosis of postoperative respiratory complications in patients after the on-pump cardiac surgery. **Materials and methods:** The study included 39 patients who had undergone elective cardiac on-pump surgery. Assessment of hemodynamic parameters and blood gases was done at admittance to the intensive care unit (ICU), as well as at 6 and 24 hours after surgery. Lung ultrasonography was also performed including counting of B-lines in 12 lung quadrants at 6 and 24 hours after surgery, as well as chest radiography at 24 hours. Duration of mechanical ventilation, time in ICU and in-hospital stay were also evaluated. **Results:** Gas exchange deterioration was associated with increased numbers of B-lines: 9 (5 to 15) at 24 hours after surgery. In the patients with PaO₂/FiO₂ above 300 mm Hg the number of B-lines at 24 hours after surgery was 4 (2 to 8) (p=0.04). Plain chest radiography at 24 hours after surgery revealed abnormalities in 69% of the patients. Discoid atelectases were the most common findings (n=13).

The ROC analysis showed that increased numbers of B-lines above 10 at 6 hours after completion of the surgery was predictive of the development of X-ray abnormalities at 24 hours (AUC 0.82, p=0.02, sensitivity 86%, specificity 76%). At 6 hours after the intervention the patients who subsequently required prolonged mechanical ventilation had increased numbers of B-lines (15 [14–27]) compared to those who could be extubated within the first 24 hours after surgery (10 [3–13], p=0.02). **Conclusion:** Lung ultrasonography monitoring accelerates the diagnosis of respiratory problems after cardiac surgery and allows timely identification of the patients requiring prolonged respiratory support and ICU stay.

Key words: postoperative respiratory insufficiency, lung ultrasonography, cardiac surgery

For citation: Fot EV, Izotova NN, Vinogradov MV, Kuzkov VV, Kirov MY. Prognostic value of lung ultrasonography after on-pump cardiac surgery. *Almanac of Clinical Medicine.* 2019;47(7):654–61. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-053.

Received 3 December 2018; accepted 8 October 2019; published online 11 October 2019

Funding

The study was performed under the grant by RF President for leading research institutions NSH-3927.2018.7.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Authors' contributions

All the authors have contributed significantly to the study conduct and preparation of the paper, have read and approved its final version before the publication.

Acknowledgments

The authors acknowledge the staff of the Department of Cardiosurgical Resuscitation, E.E. Volosevich First Clinical City Hospital (Arkhangelsk, Russia) for their assistance.

Evgenia V. Fot – MD, PhD, Associate Professor, Department of Anesthesiology and Intensive Care Therapy¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0052-8086>

✉ 51 Troitsky prospect, Arkhangelsk, 163000, Russian Federation. Tel.: +7 (921) 295 06 85. E-mail: ev_fot@mail.ru

Natalia N. Izotova – MD, Postgraduate Student, Department of Anesthesiology and Intensive Care Therapy¹

Mikhail V. Vinogradov – MD, Resident, Department of Anesthesiology and Intensive Care Therapy¹

Vsevolod V. Kuzkov – MD, PhD, Professor, Department of Anesthesiology and Intensive Care Therapy¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8191-1185>

Mikhail Y. Kirov – MD, PhD, Professor, Head of Department of Anesthesiology and Intensive Care Therapy¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4375-3374>

¹Northern State Medical University; 51 Troitsky prospect, Arkhangelsk, 163000, Russian Federation



Оригинальная статья

Увеличивается ли тонус сосудов системы микроциркуляции при артериальной гипертензии?

Рогаткин Д.А.¹ • Глазкова П.А.¹ • Куликов Д.А.¹ • Глазков А.А.¹ • Терпигорев С.А.¹ • Шехян Г.Г.¹ • Козлова К.А.^{1,2} • Макматов-Рысь М.Б.¹

Актуальность. Увеличение тонуса сосудов считается одним из важных факторов, приводящих к артериальной гипертензии (АГ). В клинической практике нет методов прямого измерения тонуса сосудов. Косвенно оценить тонус сосудов системы микроциркуляции можно при помощи исследования перфузии методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). Перфузия характеризует изменение потока крови в единицу времени в анализируемом участке, следовательно, этот параметр должен быть обратно пропорционален тонусу сосудов. **Цель** – сравнить перфузию кожи предплечья, измеренную методом ЛДФ, у пациентов с АГ и добровольцев с нормальными показателями артериального давления (АД), рассмотреть практическую применимость этого параметра для оценки тонуса сосудов системы микроциркуляции. **Материал и методы.** Работа проведена на двух группах: группу 1 составили пациенты с АГ (n=43; медиана возраста – 62 [57; 71] года), группу 2 – добровольцы без АГ (n=62; медиана возраста – 28 [24; 37] лет). Измерение перфузии кожи предплечья проводили методом ЛДФ в течение 2 минут

без применения функциональных проб. Для каждого обследуемого рассчитывали «базовую перфузию» – средний показатель перфузии на репрезентативном участке микроциркуляторной кривой. **Результаты.** Медиана базовой перфузии в коже руки у пациентов с АГ значимо больше, чем у нормотензивных лиц: 4,88 [2,87; 8,98] и 3,41 [2,47; 4,99] ПЕ соответственно (p=0,013). В качестве условного «нормального» уровня перфузии принято значение, соответствующее интерквартильному диапазону в контрольной группе. У 39,5% пациентов с АГ базовая перфузия соответствовала «норме», 46,5% пациентов имели показатель базовой перфузии выше «нормы», что может быть обусловлено сниженным тонусом периферических сосудов, и лишь у 14,0% пациентов базовая перфузия была снижена. **Заключение.** Повышение перфузии крови в коже у части пациентов с АГ может свидетельствовать о снижении тонуса периферических сосудов, что, предположительно, является компенсаторной реакцией организма в ответ на повышение артериального давления. На полученные результаты, вероятно, влияли возрастные изменения

сердечно-сосудистой системы, лекарственная терапия и другие факторы. Представляется целесообразным продолжить исследования состояния периферических сосудов. Их результаты могут внести вклад в понимание механизмов развития АГ у конкретного пациента, а в перспективе – применяться для персонализированного подхода в подборе терапии.

Ключевые слова: микроциркуляция, лазерная доплеровская флоуметрия, гипертензия, сосудистая жесткость, вазоконстрикция, вазодилатация, антигипертензивные препараты, капилляры, артериолы

Для цитирования: Рогаткин ДА, Глазкова ПА, Куликов ДА, Глазков АА, Терпигорев СА, Шехян ГГ, Козлова КА, Макматов-Рысь МБ. Увеличивается ли тонус сосудов системы микроциркуляции при артериальной гипертензии? Альманах клинической медицины. 2019;47(7):662–8. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-073.

Поступила 04.10.2019; доработана 06.12.2019; принята к публикации 09.12.2019; опубликована онлайн 16.12.2019

Одним из ключевых факторов риска болезни сердечно-сосудистой системы считается повышенное кровяное давление. Артериальная гипертензия (АГ) – основная модифицируемая причина сердечно-сосудистой и общей смертности во всем мире [1]. На долю АГ приходится по меньшей мере 45% смертельных случаев, вызванных болезнями сердца, и 51% – вызванных инсультом [2]. В глобальном резюме по гипертензии эксперты Всемирной организации здравоохранения называют повышение артериального давления (АД) «безмолвным убийцей», а общую ситуацию в мире – «глобальным кризисом общественного здравоохранения» [2].

Несмотря на высокую социальную значимость АГ и большое количество работ, посвященных этой теме, механизмы, лежащие в основе формирования первичной АГ, до сих пор не до конца ясны [3]. Одним из важных факторов, приводящих

Рогаткин Дмитрий Алексеевич – д-р техн. наук, руководитель лаборатории медико-физических исследований¹; ORCID: 0000-0002-7755-308X

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

к гипертензии, признано увеличение тонуса периферических сосудов, что влечет за собой повышение общего периферического сопротивления сосудов (ОПСС) и рост АД [3, 4]. Повышение тонуса сосудов реализуется за счет сокращения гладкомышечных волокон [5]. Сегодня в широкой клинической практике нет методов прямого измерения тонуса сосудов. Однако, так как основной вклад в формирование ОПСС вносит сосудистый тонус, повышение ОПСС принято трактовать как вазоконстрикцию [6]. Оценить степень вазоконстрикции и вазодилатации в ответ на стимул возможно при помощи таких методов, как ультразвуковое исследование кровотоков-опосредованного расширения плечевой артерии после окклюзии, периферическая артериальная тонометрия и др. [7]. Кроме того, в исследовательских работах для изучения тонуса сосудов применяются методы оценки метаболизма оксида азота, проводимости



ионных каналов, расчет отношения давления в венах к изменению окружности конечности после окклюзии, оптические методы измерения амплитуды артериального пульса и т.д. [8–11].

Как известно, именно сосуды малого диаметра вносят наибольший вклад в ОПСС [5]. В этой связи изучение микроциркуляторного звена кровотока, включающего в себя терминальные артериолы, чрезвычайно важно для более глубокого понимания патогенеза АГ. Большой интерес вызывают методики, позволяющие оценивать эндотелий-опосредованную регуляцию капиллярного кровотока, осуществляемую в первую очередь за счет вазоконстрикции и вазодилатации сосудов резистивного типа [7]. Одним из неинвазивных способов исследования микроциркуляции крови является лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ). Метод основан на зондировании ткани лазерным излучением и регистрации отраженного сигнала, интенсивность которого прямо пропорциональна количеству эритроцитов и скорости их движения в исследуемом участке. Показатель перфузии, измеренный методом ЛДФ, принято выражать в перфузионных единицах (ПЕ), он характеризует изменение потока крови в единицу времени в зондируемом объеме [12]. Глубина анализируемого участка в среднем составляет около 1 мм. Этот слой в зависимости от типа ткани может содержать следующие звенья микроциркуляторного русла: артериолы, терминальные артериолы, капилляры, посткапиллярные вены и артериоло-венулярные анастомозы [12]. Существенный вклад в регуляцию объемной скорости кровотока в тканях вносят артериолы: снижение их тонуса приводит к увеличению перфузии, повышение тонуса, наоборот, снижает объем поступающей крови и приводит к падению перфузии тканей. Именно поэтому изменение перфузии в анализируемом участке трактуется рядом авторов как изменение тонуса сосудов [13, 14]. Таким образом, исходя из изложенной выше концепции, логично предположить: формирование АГ должно сопровождаться ростом тонуса периферических артериол, что, в свою очередь, должно приводить к падению базового уровня перфузии кожи при исследовании микроциркуляции методом ЛДФ.

В качестве попытки использовать данный подход в практической медицине было проведено сравнительное исследование параметров кожной микроциркуляции в области предплечья у пациентов с АГ и добровольцев с нормальными

Глазкова Полина Александровна – науч. сотр. лаборатории медико-физических исследований¹; ORCID: 0000-0002-8830-7503
✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2–8, Российская Федерация. Тел.: +7 (495) 681 89 84. E-mail: polinikul@mail.ru

Куликов Дмитрий Александрович – канд. мед. наук, ученый секретарь, доцент кафедры эндокринологии факультета усовершенствования врачей¹; ORCID: 0000-0002-4273-8295

Глазков Алексей Андреевич – науч. сотр. лаборатории медико-физических исследований¹; ORCID: 0000-0001-6122-0638

Терпигорев Станислав Анатольевич – д-р мед. наук, руководитель отделения профпатологии и врачебно-трудоустройственной экспертизы, профессор кафедры терапии факультета усовершенствования врачей¹; ORCID: 0000-0001-5444-5943

Шехян Грант Георгиевич – канд. мед. наук, вед. науч. сотр. отделения кардиологии, профессор кафедры терапии факультета усовершенствования врачей¹; ORCID: 0000-0003-0442-644X

Козлова Ксения Андреевна – лаборант отдела экспериментальных и клинических исследований¹; студент факультета фундаментальной медицины²; ORCID: 0000-0003-4146-930X

Макматов-Рысь Михаил Борисович – старший лаборант отдела экспериментальных и клинических исследований¹; ORCID: 0000-0002-2506-9202

показателями АД. По данным ряда авторов, будучи удобной локализацией, кожа области предплечья часто используется для исследования параметров микроциркуляции [15].

Материал и методы

Дизайн исследования – одномоментное исследование типа «случай – контроль». Критерий включения в группу 1: наличие АГ 2- или 3-й степени. Критерий включения в группу 2: отсутствие АГ. Общий критерий исключения для обеих групп: наличие сахарного диабета, поскольку данная патология может повлиять на показатели микроциркуляции.

Группу 1 (пациенты с АГ) составили 43 пациента, 23 мужчины и 20 женщин, медиана возраста составила 62 [57; 71] года; 18 пациентов с АГ 2-й степени, 25 пациентов с АГ 3-й степени. В группу 2 (добровольцы без АГ) вошло 62 человека, 16 мужчин и 46 женщин, медиана возраста составила 28 [24; 37] лет. В исследовании приняли участие пациенты, проходившие стационарное или амбулаторное лечение/наблюдение на базе ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Набор пациентов осуществлялся с 2017 по 2019 г.

Всем участникам исследования проводили измерение перфузии кожи методом ЛДФ при помощи прибора ЛАКК-02 (ООО «НПП «Лазма», Россия). В течение исследования пациент находился в положении сидя за столом, положив согнутые в локтях руки на стол ладонями вниз, предплечья располагались на уровне сердца. Перед началом регистрации параметров микроциркуляции всем пациентам проводили измерение АД. Датчик прибора ЛАКК-02 находился на тыльной поверхности предплечья правой руки на 4 см проксимальнее лучезапястного сустава по срединной линии. После 15-минутной адаптации к температуре помещения (22–25 °С) показатели кожной перфузии регистрировали в течение 2 минут и получали исходные показатели перфузии.

Затем анализировали репрезентативный участок полученной кривой (участок без помех, связанных со случайными движениями пациента, продолжительностью не менее 30 секунд) и рассчитывали средний показатель перфузии в исследуемом участке микроциркуляторной кривой, далее по тексту – параметр «базовая перфузия». В анализ были включены только данные, полученные при исследовании кожной микроциркуляции на одном и том же экземпляре прибора ЛАКК-02, так как приборы данного класса пока

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»; 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1, Российская Федерация

метрологически не аттестованы и не проходят периодическую поверку [16], то есть разные приборы даже одного производителя могут иметь разные передаточные функции и выдавать количественно различающийся результат. В настоящее время они зарегистрированы только как приборы индикаторного типа, поэтому сравнение абсолютных значений перфузии, полученных разными приборами, оказывается не валидным.

Статистический анализ данных проводили в программе IBM SPSS Statistics 25 (IBM corp., США). Для количественных переменных рассчитывали медианы и квартили (Me [LQ; UQ]). Сравнение количественных переменных в двух группах проводили с помощью критерия Манна – Уитни. Для качественных переменных рассчитывали абсолютные (n) и относительные (%) частоты. Сравнение частот в двух группах проводили с помощью точного критерия Фишера. Статистически значимыми различия между группами признавали при уровне $p < 0,05$.

Протокол исследования соответствовал этическим принципам Хельсинкской декларации (пересмотр от 2013 года) и был одобрен Независимым комитетом по этике ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (протокол № 8 от 18 октября 2016 года, протокол № 11 от 12 декабря 2017 года и протокол № 11 от 13 декабря 2018 года).

Результаты

Медиана базовой перфузии на коже руки у пациентов с АГ оказалась значимо больше, чем у нормотензивных лиц: 4,88 [2,87; 8,98] и 3,41 [2,47; 4,99] ПЕ соответственно ($p = 0,013$) (таблица).

В рамках упрощенной модели в качестве условного «нормального» уровня перфузии нами было принято значение, соответствующее интерквартильному диапазону в контрольной группе: от 2,47 до 4,99 ПЕ включительно. Лица, имеющие больший уровень перфузии, были отнесены в группу «высокий уровень перфузии»; лица, имеющие меньший уровень перфузии, – в группу «низкий уровень перфузии». Данное деление довольно условно и приведено для большей наглядности полученных результатов. На рис. 1 представлено распределение пациентов с АГ и здоровых добровольцев относительно «нормы» по уровню базовой перфузии. Как видно из его данных, большая часть (51,6%) здоровых добровольцев имела показатели перфузии, соответствующие условной «норме». Процент людей, имеющих показатель базовой перфузии ниже нормы (24,2%), был равен проценту людей, имеющих показатель базовой перфузии выше нормы (24,2%). Такое распределение абсолютно закономерно для контрольной

Краткая характеристика групп и результаты измерений

| Характеристика | Пациенты с АГ (n=43) | Добровольцы без АГ (n=62) | Значение p |
|---|----------------------|---------------------------|------------|
| Возраст, годы | 62 [57; 71] | 28 [24; 37] | < 0,001 |
| Медиана перфузии на руке, ПЕ | 4,88 [2,87; 8,98] | 3,41 [2,47; 4,99] | 0,013 |
| САД, измеренное перед исследованием, мм рт. ст. | 130 [125; 143] | 110 [102; 120] | < 0,001 |
| ДАД, измеренное перед исследованием, мм рт. ст. | 80 [71; 83] | 70 [69; 80] | 0,001 |

АГ – артериальная гипертензия, ДАД – диастолическое артериальное давление, САД – систолическое артериальное давление

Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей (Me [LQ; UQ])

группы людей без АГ, поскольку анализ перфузии именно этой группы позволил вывести «норму».

Согласно принятой концепции повышения тонуса периферических сосудов у пациентов с АГ ожидалось, что у большинства таких пациентов перфузия будет ниже «нормы». Однако только у 14,0% пациентов наблюдалась такая картина. У 39,5% базовая перфузия соответствовала «норме» и 46,5% имели «высокий уровень перфузии», что может быть обусловлено сниженным тонусом периферических сосудов.

Таким образом, полученные результаты говорят, скорее, о тенденции падения тонуса сосудов в коже рук у большого числа обследованных пациентов с АГ, чем о повышении тонуса этих сосудов, если принять обозначенную выше концепцию.

Обсуждение

Зарегистрированный феномен смещения распределения в группе пациентов с АГ по сравнению с добровольцами без АГ в сторону повышения базовой перфузии, то есть в сторону снижения тонуса сосудов в анализируемой области предплечья, может быть объяснен компенсаторной реакцией

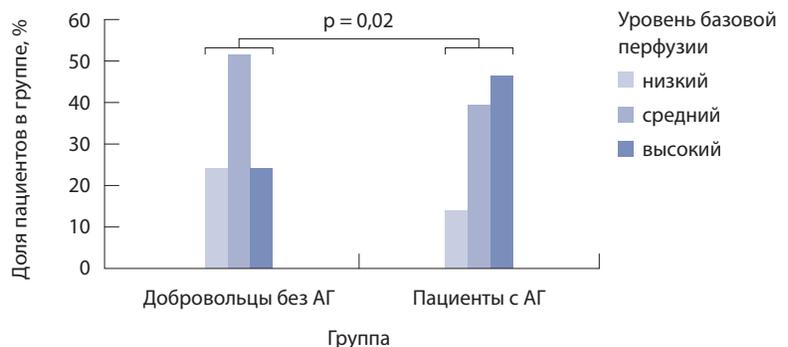


Рис. 1. Распределение обследуемых из двух групп по уровню базовой перфузии; АГ – артериальная гипертензия

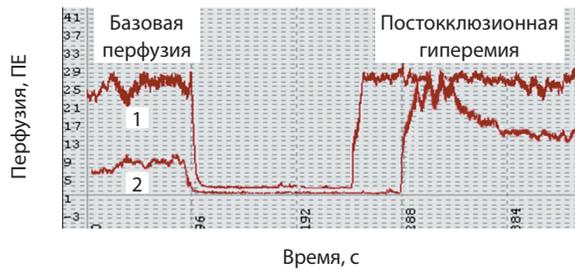


Рис. 2. Пример кривой перфузии во время проведения окклюзионной пробы; 1 – гиперемический тип микрогемодинамики, 2 – спастический тип микрогемодинамики; ПЕ – перфузионные единицы (рисунок из архива Д.А. Рогаткина, фрагменты рисунка впервые опубликованы в статье [16])

организма в ответ на повышение АД. Как известно, величина АД зависит от двух основных физиологических факторов: ОПСС и сердечного выброса [17]. Таким образом, у части пациентов ведущей причиной повышения АД может быть увеличение сердечного выброса. Возможно, у таких пациентов уменьшение ОПСС за счет снижения тонуса сосудов может рассматриваться как приспособительная реакция организма с целью нормализовать повышенное давление. В этом случае базовая перфузия может оказаться хорошим индикатором такого механизма повышения АД. В исследовании, проведенном нами ранее и посвященном сравнению реактивности кожной микроциркуляции у здоровых добровольцев и пациентов с АГ, также было показано, что у нормотензивных лиц базовая перфузия значимо ниже, чем у людей с АГ [18]. Однако, поскольку работа преследовала другие цели, данному феномену не было уделено большое внимание, и гипотеза о взаимосвязи выявленных различий с тонусом сосудов не рассматривалась.

На результаты, полученные в настоящем исследовании, могли повлиять возрастные параметры: возраст в группе пациентов с АГ был значимо больше, чем у здоровых добровольцев ($p < 0,001$) (см. таблицу). Старение может приводить к прогрессирующей потере тонуса гладких мышц сосудов, уменьшению способности к активной вазодилатации и повышению ригидности, что может выражаться в увеличении базовой перфузии, а также в снижении способности сосудов расширяться в ответ на стимулы [19]. Косвенно это продемонстрировано в работе E. Nippolainen и соавт. [20], где установлено, что с возрастом происходит увеличение амплитуды пульсовой волны, измеренной методом фотоплетизмографии (ФПГ), нормированной на средний уровень ФПГ-сигнала, – то есть параметра, близкого параметру перфузии в ЛДФ [16]. Авторы трактуют полученные данные как следствие возрастных изменений оптических свойств соединительной ткани, однако в свете полученных нами результатов это может быть дополнительно ассоциировано и с падением ОПСС (как следствие падения тонуса сосудов) [20].

Кроме того, на полученные нами результаты могла оказать влияние лекарственная терапия. Как видно из таблицы, в момент измерения микроциркуляции у пациентов с АГ медиана систолического АД составила 130 [125; 143] мм рт. ст., диастолического – 80 [71; 83] мм рт. ст., соответственно, большинство пациентов имели целевые или близкие к целевым показатели АД на фоне получаемой гипотензивной терапии. В таком случае, перфузия объективно отражает эффективность проводимой терапии, и не исключено, что некое отношение «перфузия/АД» можно будет в дальнейшем обосновать и принять как пороговый критерий эффективности лекарственной терапии.

Вместе с тем могут возникнуть сомнения касательно того, насколько параметр базовой перфузии в ЛДФ допустимо трактовать как показатель, отображающий базовый тонус периферических сосудов? Здесь можно привести следующие доводы. Одной из ключевых функциональных проб в ЛДФ является окклюзионная проба с артериальной окклюзией на плече [12]. Она позволяет оценивать повышение кровотока в коже после временного пережатия плечевой артерии [15]. По приросту перфузии в момент постокклюзионной реактивной гиперемии по сравнению с базовой перфузией оценивают тип микрогемодинамики – гиперемический, нормоциркуляторный или спастический [16]. Тем не менее, если сравнить два типовых графика записи перфузии методом ЛДФ при окклюзионной пробе, свойственных для гиперемического и спастического типов микрогемодинамики (рис. 2), можно заметить, что основное отличие спастического типа микрогемодинамики от гиперемического заключается именно в сниженном начальном уровне перфузии, который и обеспечивает «повышенный» прирост перфузии в фазе постокклюзионной реактивной гиперемии [16]. Перфузия на пике реактивной гиперемии тоже различается в обоих случаях, но не так сильно, что можно объяснить, например, плотностью сосудов в зоне обследования. Начальный же сниженный уровень перфузии вносит наибольший вклад в результат оценки эндотелиальной функции сосудов, поэтому логично считать его отражающим базовый тонус сосудов.

В целом на настоящий момент нами не было получено достаточного количества данных для достоверного и однозначного заключения о том, что у части пациентов с АГ патогенетический механизм, направленный на компенсацию повышенного давления, заключается в снижении тонуса периферических сосудов. Вместе с тем полученные результаты демонстрируют



целесообразность проведения дополнительных исследований в этом направлении.

Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют, что общепринятый взгляд на повышение тонуса периферических сосудов как на одну из ведущих причин формирования АГ может быть справедлив далеко не для всех пациентов и/или отображать только определенные этапы развития болезни. Повышение перфузии крови в коже у части пациентов с АГ может свидетельствовать о снижении тонуса периферических сосудов, что, в свою очередь, можно трактовать как компенсаторную реакцию организма или как результат проводимой терапии. Представленные в настоящей статье данные являются предварительными. Очевидно, что предложенная концепция требует дальнейших исследований: изучения тонуса сосудов в других органах и тканях, анализа влияния возрастных изменений микроциркуляции, терапии и т.д. Однако полноценно

это можно сделать только на метрологически аттестованном оборудовании с понятными погрешностями измерений, которое позволяет обоснованно сравнивать количественные показатели базовой перфузии. Микрососудистое русло может рассматриваться как перспективная терапевтическая мишень при разработке новых антигипертензивных препаратов, состояние микрососудов – как маркер при объективной динамической оценке эффективности существующих схем лечения. Исследование состояния периферических сосудов может внести большой вклад в понимание механизмов развития АГ у конкретного пациента, в персонализированный подход к подбору терапии. С учетом множества факторов, оказывающих влияние на движение крови по микрососудам, для набора достаточной доказательной базы видится целесообразной стандартизация подходов по регистрации параметров микроциркуляции, их обработке, оценке, а также объединение усилий коллективов, работающих в данной области. ©

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена в рамках выполнения Государственного задания Министерства здравоохранения Московской области НИР (5.3) «Разработка лазерных неинвазивных и малоинвазивных диагностических технологий».

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Д.А. Рогаткин – концепция и дизайн исследования, сбор и первичная обработка материала, анализ полученных данных, написание, редактирование и утверждение текста; П.А. Глазкова – формирование групп

пациентов, сбор и обработка материала, анализ полученных данных, написание, редактирование и утверждение текста; Д.А. Куликов – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов исследования, написание текста статьи; А.А. Глазков – сбор, обработка и анализ результатов, написание текста, статистическая обработка данных; С.А. Терпигоров – обработка и анализ результатов исследования, написание и редактирование текста статьи; Г.Г. Шехян – формирование групп пациентов, набор клинического материала, написание и редактирование текста статьи; К.А. Козлова – формирование групп пациентов, анализ и интерпретация результатов, набор клинического материала, редактирование текста статьи; М.Б. Макматов-Рысь – сбор и обработка данных, анализ и интерпретация результатов, редактирование текста статьи.

Литература

- Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I; ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018;39(33):3021–104. doi: 10.1093/eurheartj/ehy339.
- Всемирная организация здравоохранения. Глобальное резюме по гипертонии. Безмолвный убийца, глобальный кризис общественного здравоохранения. Сердечно-сосудистые заболевания. 04.2013 [Интернет]. Доступно на: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/ru/.
- Coffman TM. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nat Med*. 2011;17(11):1402–9. doi: 10.1038/nm.2541.
- Touyz RM, Alves-Lopes R, Rios FJ, Camargo LL, Anagnostopoulou A, Arner A, Montezano AC. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2018;114(4):529–39. doi: 10.1093/cvr/cvy023.
- Bevan JA, Laher I. Pressure and flow-dependent vascular tone. *FASEB J*. 1991;5(9):2267–73. doi: 10.1096/fasebj.5.9.1860618.
- Matteucci MC, Giordano U, Calzolari A, Rizzone G. Total peripheral vascular resistance in pediatric renal transplant patients. *Kidney Int*. 2002;62(5):1870–4. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00639.x.
- Шабров АВ, Апресян АГ, Добкес АЛ, Ермолов СЮ, Ермолова ТВ, Манасян СГ, Сердюков СВ. Современные методы оценки эндотелиальной дисфункции и возможности их применения в практической медицине. Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2016;12(6):733–42. doi: 10.20996/1819-6446-2016-12-6-733-742.
- Liu X, El-Mahdy MA, Boslett J, Varadharaj S, Hemann C, Abdelghany TM, Ismail RS, Little SC, Zhou D, Thuy LT, Kawada N, Zweier JL. Cytoglobin regulates blood pressure and vascular tone through nitric oxide metabolism in the vascular wall. *Nat Commun*. 2017;8:14807. doi: 10.1038/ncomms14807.
- Tan CH, Low KA, Schneider-Garces N, Zimmerman B, Fletcher MA, Maclin EL, Chiarelli AM, Gratton G, Fabiani M. Optical measures of



- changes in cerebral vascular tone during voluntary breath holding and a Sternberg memory task. *Biol Psychol.* 2016;118:184–94. doi: 10.1016/j.biopsycho.2016.05.008.
10. Hübner CA, Schroeder BC, Ehmke H. Regulation of vascular tone and arterial blood pressure: role of chloride transport in vascular smooth muscle. *Pflugers Arch.* 2015;467(3):605–14. doi: 10.1007/s00424-014-1684-y.
11. Miller RR, Vismara LA, Zelis R, Amsterdam EA, Mason DT. Clinical use of sodium nitroprusside in chronic ischemic heart disease. Effects on peripheral vascular resistance and venous tone and on ventricular volume, pump and mechanical performance. *Circulation.* 1975;51(2): 328–36. doi: 10.1161/01.cir.51.2.328.
12. Куликов ДА, Глазков АА, Ковалева ЮА, Балашова НВ, Куликов АВ. Перспективы использования лазерной доплеровской флоуметрии в оценке кожной микроциркуляции крови при сахарном диабете. *Сахарный диабет.* 2017;20(4):279–85. doi: 10.14341/DM8014.
13. Lindblad LE, Ekenvall L, Klingstedt C. Neural regulation of vascular tone and cold induced vasoconstriction in human finger skin. *J Auton Nerv Syst.* 1990;30(2):169–73. doi: 10.1016/0165-1838(90)90141-5.
14. Sondermeijer B, Kompa A, Komesaroff P, Krum H. Effect of exogenous urotensin-II on vascular tone in skin microcirculation of patients with essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2005;18(9 Pt 1):1195–9. doi: 10.1016/j.amjhyper.2005.03.748.
15. Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation.* 2012;19(1): 47–64. doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x.
16. Рогаткин ДА. Физические основы современных оптических методов исследования микрогемодинамики in vivo. Лекция. *Медицинская физика.* 2017;(4):75–93.
17. Mayet J, Hughes A. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. *Heart.* 2003;89(9): 1104–9. doi: 10.1136/heart.89.9.1104.
18. Глазкова ПА, Терпигорев СА, Куликов ДА, Иванова НА, Глазков АА. Пути повышения диагностической значимости метода лазерной доплеровской флоуметрии при оценке кожной микроциркуляции у пациентов с артериальной гипертензией. *Артериальная гипертензия.* 2019;25(1):74–83. doi: 10.18705/1607-419X-2019-25-1-74-83.
19. Herrington DM, Fan L, Drum M, Riley WA, Pussier BE, Crouse JR, Burke GL, McBurnie MA, Morgan TM, Espeland MA. Brachial flow-mediated vasodilator responses in population-based research: methods, reproducibility and effects of age, gender and baseline diameter. *J Cardiovasc Risk.* 2001;8(5):319–28. doi: 10.1177/174182670100800512.
20. Nippolainen E, Podolian NP, Romashko RV, Kulchin YN, Kamshilin AA. Photoplethysmographic waveform as a function of subject's age. *Physics Procedia.* 2015;73:214–45. doi: 10.1016/j.phpro.2015.09.164.
1. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I; ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2018;39(33):3021–104. doi: 10.1093/eurheartj/ehy339.
2. World Health Organization. A global brief on hypertension. Silent killer, global public health crisis. *Cardiovascular disease.* 04.2013 [Internet]. Available from: https://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/global_brief_hypertension/en/.
3. Coffman TM. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nat Med.* 2011;17(11):1402–9. doi: 10.1038/nm.2541.
4. Touyz RM, Alves-Lopes R, Rios FJ, Camargo LL, Anagnostopoulou A, Arner A, Montezano AC. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2018;114(4):529–39. doi: 10.1093/cvr/cvy023.
5. Bevan JA, Laher I. Pressure and flow-dependent vascular tone. *FASEB J.* 1991;5(9):2267–73. doi: 10.1096/fasebj.5.9.1860618.
6. Matteucci MC, Giordano U, Calzolari A, Rizzoni G. Total peripheral vascular resistance in pediatric renal transplant patients. *Kidney Int.* 2002;62(5): 1870–4. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00639.x.
7. Shabrov AV, Apresyan AG, Dobkes AL, Ermolov SU, Ermolova TV, Manasyan SG, Serdyukov SV. [Current methods of endothelial dysfunction assessment and their possible use in the practical medicine]. *Rational Pharmacother-*
- apy in Cardiology. 2016;12(6):733–42. Russian. doi: 10.20996/1819-6446-2016-12-6-733-742.
8. Liu X, El-Mahdy MA, Boslett J, Varadharaj S, Hemann C, Abdelghany TM, Ismail RS, Little SC, Zhou D, Thuy LT, Kawada N, Zweier JL. Cytoglobin regulates blood pressure and vascular tone through nitric oxide metabolism in the vascular wall. *Nat Commun.* 2017;8:14807. doi: 10.1038/ncomms14807.
9. Tan CH, Low KA, Schneider-Garces N, Zimmerman B, Fletcher MA, Maclin EL, Chiarelli AM, Grattin G, Fabiani M. Optical measures of changes in cerebral vascular tone during voluntary breath holding and a Sternberg memory task. *Biol Psychol.* 2016;118:184–94. doi: 10.1016/j.biopsycho.2016.05.008.
10. Hübner CA, Schroeder BC, Ehmke H. Regulation of vascular tone and arterial blood pressure: role of chloride transport in vascular smooth muscle. *Pflugers Arch.* 2015;467(3):605–14. doi: 10.1007/s00424-014-1684-y.
11. Miller RR, Vismara LA, Zelis R, Amsterdam EA, Mason DT. Clinical use of sodium nitroprusside in chronic ischemic heart disease. Effects on peripheral vascular resistance and venous tone and on ventricular volume, pump and mechanical performance. *Circulation.* 1975;51(2): 328–36. doi: 10.1161/01.cir.51.2.328.
12. Kulikov DA, Glazkov AA, Kovaleva YA, Balashova NV, Kulikov AV. Prospects of Laser Doppler flowmetry application in assessment of skin microcirculation in diabetes. *Diabetes mellitus.* 2017;20(4):279–85. doi: 10.14341/DM8014.
13. Lindblad LE, Ekenvall L, Klingstedt C. Neural regulation of vascular tone and cold induced vasoconstriction in human finger skin. *J Auton Nerv Syst.* 1990;30(2):169–73. doi: 10.1016/0165-1838(90)90141-5.
14. Sondermeijer B, Kompa A, Komesaroff P, Krum H. Effect of exogenous urotensin-II on vascular tone in skin microcirculation of patients with essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2005;18(9 Pt 1):1195–9. doi: 10.1016/j.amjhyper.2005.03.748.
15. Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation.* 2012;19(1):47–64. doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x.
16. Рогаткин ДА. [Physical foundations of modern optical methods for studying microhemodynamics in vivo. Lecture]. *Meditsinskaya fizika.* 2017;(4):75–93. Russian.
17. Mayet J, Hughes A. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. *Heart.* 2003;89(9): 1104–9. doi: 10.1136/heart.89.9.1104.
18. Glazkova PA, Terpigorev SA, Kulikov DA, Ivanova NA, Glazkov AA. [Increasing the diagnostic significance of the laser Doppler flowmetry in assessing skin microcirculation in hypertension]. *Arterial'naya gipertenziya.* 2019;25(1): 74–83. Russian. doi: 10.18705/1607-419X-2019-25-1-74-83.
19. Herrington DM, Fan L, Drum M, Riley WA, Pussier BE, Crouse JR, Burke GL, McBurnie MA, Morgan TM, Espeland MA. Brachial flow-mediated vasodilator responses in population-based research: methods, reproducibility and effects of age, gender and baseline diameter. *J Cardiovasc Risk.* 2001;8(5):319–28. doi: 10.1177/174182670100800512.
20. Nippolainen E, Podolian NP, Romashko RV, Kulchin YN, Kamshilin AA. Photoplethysmographic waveform as a function of subject's age. *Physics Procedia.* 2015;73:214–45. doi: 10.1016/j.phpro.2015.09.164.



Is the microvasculature tone increasing with arterial hypertension?

D.A. Rogatkin¹ • P.A. Glazkova¹ • D.A. Kulikov¹ • A.A. Glazkov¹ •
S.A. Terpigorev¹ • G.G. Shekhyan¹ • K.A. Kozlova^{1,2} •
M.B. Makmatov-Rys¹

Rationale: An increase in vascular tone is believed to be a major factor leading to arterial hypertension (AH). There are no means for a direct measurement of the vascular tone in clinical practice. Perfusion assessment by laser Doppler flowmetry (LDF) allows for an indirect evaluation of the vascular tone of the microcirculation system. Perfusion is assessed by the change in blood flow per unit of time in the given area. Therefore, this parameter should be inversely correlated with vascular tone. **Aim:** To compare the forearm skin perfusion measured by LDF in patients with AH and healthy volunteers with normal blood pressure, and to review the feasibility of this parameter for the assessment of the microvasculature tone. **Materials and methods:** The study was carried out in two groups: group one, patients with AH (n=43; age 62 [57; 71] years), and group 2, healthy volunteers without AH (n=62; age 28 [24; 37] years). The perfusion in the forearm skin was measured by LDF for 2 minutes without any functional tests. “Baseline perfusion” for each subject was calculated as the average perfusion rate in a representative portion of the microcirculatory curve. **Results:** Median of basic perfusion in the forearm skin in the patients with AH is significantly higher than that in the normotensive individuals: 4.88 [2.87; 8.98] PU and 3.41 [2.47; 4.99] PU, respectively (p=0.013). The interquartile range of the baseline perfusion in the control group was chosen as provisional threshold values for the “normal” perfusion level. In 39.5% of patients with AH, their basic perfusion was within

the “normal level”; 46.5% of the patients had the baseline perfusion above the “normal level”, which might be due to reduced tone of the peripheral vessels. Only 14.0% of the patients had a decreased level of the basic perfusion. **Conclusion:** An increase in the skin perfusion in some patients with AH may indicate a decrease in their peripheral vascular tone, which could be a potential compensatory reaction in response to the rise in blood pressure. The results obtained could have been influenced by the age-related changes in the cardiovascular system, drug therapy, etc. Further studies into the specifics of peripheral vasculature seem reasonable. They can contribute to the understanding of the pathophysiology of AH in a given patient and, in future, could be used to guide a personalized choice of therapy.

Key words: microcirculation, laser Doppler flowmetry, arterial hypertension, vascular stiffness, vasoconstriction, vasodilation, antihypertensive agents, capillaries, arterioles

For citation: Rogatkin DA, Glazkova PA, Kulikov DA, Glazkov AA, Terpigorev SA, Shekhyan GG, Kozlova KA, Makmatov-Rys MB. Is the microvasculature tone increasing with arterial hypertension? *Almanac of Clinical Medicine*. 2019;47(7):662–8. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-073.

Received 4 October 2019; revised 6 December 2019; accepted 9 December 2019; published online 16 December 2019

Funding

The study was done within the State task from the Ministry of Health of the Moscow Region NIR (5.3) “The development of laser non-invasive and minimally invasive diagnostic technologies”.

Conflict of interests

The authors declare no obvious and potential conflicts of interests related to the publication.

Authors' contributions

D.A. Rogatkin, the study concept and design, data collection and management, data analysis, text writing, editing and approval; P.A. Glazkova, recruitment of the patient groups, data collection, management and analysis, text writing, editing, and approval; D.A. Kulikov, the study concept and design, analysis and interpretation of the study results, text writing; A.A. Glazkov, data collection, management and analysis, text writing, statistical analysis; S.A. Terpigorev, analysis and interpretation of the study results, text writing and editing; G.G. Shekhyan, recruitment of the patient groups, clinical data collection, text writing and editing; K.A. Kozlova, recruitment of the patient groups, analysis and interpretation of the study results, clinical data collection, text editing; M.B. Makmatov-Rys, data collection and management, analysis and interpretation of the results, text editing.

Dmitry A. Rogatkin – PhD (in Engineering), Head of Laboratory of Medical and Physical Research¹; ORCID: 0000-0002-7755-308X

Polina A. Glazkova – Research Fellow, Laboratory of Medical and Physical Research¹; ORCID: 0000-0002-8830-7503

✉ 61/2–8 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 681 89 84. E-mail: polinikul@mail.ru

Dmitriy A. Kulikov – MD, PhD, Academic Secretary, Associate Professor, Chair of Endocrinology, Postgraduate Training Faculty¹; ORCID: 0000-0002-4273-8295

Alexey A. Glazkov – Research Fellow, Laboratory of Medical and Physical Research¹; ORCID: 0000-0001-6122-0638

Stanislav A. Terpigorev – MD, PhD, Head of Department of Profpathology and Medical Examination; Professor, Chair of Internal Diseases, Postgraduate Training Faculty¹; ORCID: 0000-0001-5444-5943

Grant G. Shekhyan – MD, PhD, Leading Research Fellow, Department of Cardiology; Professor, Chair of Internal Diseases, Postgraduate Training Faculty¹; ORCID: 0000-0003-0442-644X

Ksenia A. Kozlova – Laboratory Technician, Department of Clinical and Experimental Research¹; Student, Faculty of Fundamental Medicine²; ORCID: 0000-0003-4146-930X

Michael B. Makmatov-Rys – Senior Laboratory Technician, Department of Clinical and Experimental Research¹; ORCID: 0000-0002-2506-9202

¹ Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation



Оригинальная статья

Изменение морфологии эритроцитов после действия монооксида углерода на кровь *in vitro*

Козлова Е.К.^{1,2} • Сергунова В.А.² • Козлов А.П.¹ • Шерстюкова Е.А.^{1,2} • Гудкова О.Е.²

Козлова Елена Карловна – д-р физ.-мат. наук, профессор кафедры медицинской и биологической физики¹; вед. науч. сотр. лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1780-895X>. E-mail: waterlake@mail.ru

Сергунова Виктория

Александровна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр., заведующая лабораторией биофизики мембран клеток при критических состояниях²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8425-0845>
✉ 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25/2, Российская Федерация.
Тел.: +7 (985) 724 18 27.
E-mail: orbf@mail.ru

Козлов Александр Павлович

– канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры медицинской и биологической физики¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3907-080X>. E-mail: fillnoise@mail.ru

Шерстюкова Екатерина

Александровна – преподаватель кафедры медицинской и биологической физики¹; науч. сотр. лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9962-6315>. E-mail: kmanchenko@yandex.ru

Гудкова Ольга Евгеньевна

– ст. науч. сотр. лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9220-0138>. E-mail: olkagood@yandex.ru

Актуальность. Одно из патологических действий монооксида углерода (СО) на кровь – образование карбоксигемоглобина. Поскольку карбоксигемоглобин полностью блокирует перенос кислорода, происходит суммарное снижение транспорта кислорода эритроцитами. В результате может возникнуть гипоксия в тканях. Воздействие СО на кровь может также вызвать повреждение клеточной мембраны. Метод атомной силовой микроскопии (АСМ) признан результативным для изучения механизмов структурных повреждений в мембранах эритроцитов. **Цель** – с помощью АСМ выявить особенности изменения морфологии и агрегации эритроцитов в результате действия СО *in vitro*. **Материал и методы.** Все эксперименты были проведены *in vitro*. Исследовали морфологию эритроцитов, их агрегаты с помощью АСМ. Забор крови (150 мкл) проводился в микроветы с ЭДТА (Sarstedt AG & Co., Германия) во время профилактического обследования 5 добровольцев. Для получения СО в пробирке смешивали в пропорции 1:1 муравьиную и серную кислоты. Для измерения концентрации карбоксигемоглобина в крови использовали спектрофотометрический метод, для вычисления концентраций производных гемоглобина в крови – метод “nonlinear fitting” экспериментальных спектров. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Origin (OriginLab Corporation, США). **Результаты.** После воздействия СО происходило смещение пиков. При времени воздействия $t_2 = 320$ с процентное содержание карбоксигемоглобина составило

$C_{\text{HbCO}} = 88 \pm 2\%$. При $t_1 = 160$ с 10% клеток имели форму, отличную от дискоцитов, при $t_2 = 320$ с – 38% клеток. При увеличении времени воздействия СО происходила агрегация эритроцитов и образование их больших конгломератов размером до 30 мкм. В контрольном мазке доля дискоцитов составляла $96 \pm 2\%$, а остальные $4 \pm 1\%$ имели форму эхиноцитов. Диаметр клеток был в диапазоне $D_{\text{контр}} = 7,5 \pm 0,8$ мкм. После воздействия СО $t_1 = 160$ с на кровь в монослое наблюдалось $28 \pm 5\%$ клеток с диаметром (D) < 5,7 мкм. После воздействия СО $t_2 = 320$ с процент клеток с размером D < 5,7 мкм увеличился до $72 \pm 11\%$. **Заключение.** Экспериментально показано, что воздействие СО на кровь вызывало изменение морфологии эритроцитов. Наблюдалось формирование связанных между собой эритроцитарных структур. При увеличении времени воздействия возникла агрегация эритроцитов и образование конгломератов.

Ключевые слова: эритроциты, монооксид углерода, атомная силовая микроскопия, агрегация

Для цитирования: Козлова ЕК, Сергунова ВА, Козлов АП, Шерстюкова ЕА, Гудкова ОЕ. Изменение морфологии эритроцитов после действия монооксида углерода на кровь *in vitro*. Альманах клинической медицины. 2019;47(7):669–75. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-068.

Поступила 23.10.2019; доработана 12.11.2019; принята к публикации 20.11.2019; опубликована онлайн 05.12.2019

¹ ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт общей реаниматологии имени В.А. Неговского ФНЦ ЦРП; 107031, г. Москва, ул. Петровка, 25/2, Российская Федерация

Моноксид углерода (СО) – газ без запаха, вкуса и цвета – образуется всякий раз, когда органические материалы сжигаются с недостаточным запасом кислорода, необходимого для полного сгорания. Источниками отравления угарным газом также становятся выхлопные газы автомобилей, плохо функционирующие системы отопления, табачный дым [1].

Наряду с экзогенными существуют эндогенные источники СО. Моноксид углерода участвует во многих физиологических процессах, включая регуляцию дыхания [2], передачу сигналов нейронов [3], регуляцию артериального давления [4] и сокращение матки во время беременности [5].

Одним из патологических действий СО на кровь является образование карбоксигемоглобина (НbСО) – продукта присоединения СО к гемоглобину. Одна из основных характеристик СО – его высокое сродство к гемоглобину, оно в 200–250 раз выше по сравнению с кислородом. При повышенной концентрации НbСО в организме могут возникнуть патологические изменения. Разрушение эритроцитов (гемолиз) приводит к увеличению катаболизма гема и, следовательно, к повышенной выработке СО [6]. В целом увеличение НbСО вследствие гемолиза составляет порядка 2–3%, но может быть и больше. Существуют доказательства того, что некоторые эритроцитарные взвеси для

переливания могут иметь уровни НbСО до 12% [7]. Карбоксигемоглобин полностью блокирует перенос кислорода, поэтому происходит суммарное снижение транспорта кислорода эритроцитами. В результате может возникнуть гипоксия в тканях [8].

Наряду с этим воздействие СО на кровь вызывает повреждение клеточной мембраны, изменяется поверхностный заряд эритроцитов [9]. К важным патогенным эффектам воздействия СО на кровь относится повышенная склонность к тромбозам [10]. При участии СО могут возникать и гетерогенные изменения в популяции эритроцитов [11]. Подобные явления наблюдаются и при действии других физико-химических факторов на кровь [12, 13]. Отравление СО диагностируют на основании клинической картины [14] и показателей СО в крови [15]. Изучение влияния СО на морфологию и агрегацию эритроцитов – весьма актуальная задача, так как ее решение позволит предположить клинические проявления симптомов отравления и, возможно, предоставить новые объективные методы исследования. Одним из современных методов диагностики, с помощью которого можно изучать механизмы структурных повреждений в мембранах эритроцитов, признан метод атомной силовой микроскопии (АСМ) [16–19].

Цель – с помощью АСМ выявить особенности изменения морфологии и агрегации эритроцитов в результате действия СО *in vitro*.

Материал и методы

Все эксперименты были проведены *in vitro*. Схема эксперимента отражена на рис. 1. Приготавливали контрольный и исследуемый образцы крови. После воздействия СО на кровь получали монослой клеток на предметном стекле. Исследовали морфологию эритроцитов, их агрегаты с помощью АСМ.

Подготовка образцов крови. Забор крови (150 мкл) в микроветку с ЭДТА (Sarstedt AG & Co., Германия), проводили во время профилактического обследования 5 добровольцев (25–40 лет, двух женщин и трех мужчин). Информированное согласие было получено от каждого донора. Работа выполнена в соответствии с этическими принципами проведения биомедицинских исследований, отраженными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

Воздействие СО на кровь. Для получения СО в пробирке смешивали в пропорции 1:1 4,5 мл муравьиной (99,7%) и 4,5 мл серной (ОС.Ч.) кислоты [20]. Время активного выделения СО составляло 25–50 с. Для изменения времени воздействия на кровь процесс повторяли несколько раз. Газ подавался в микроветку с кровью через систему

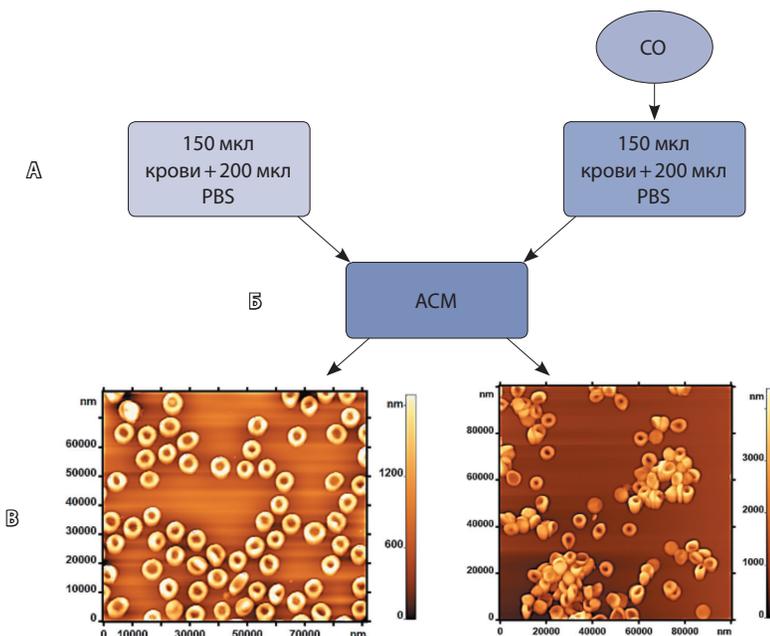


Рис. 1. Схема эксперимента: **А** – образцы крови, **Б** – исследование методом атомной силовой микроскопии (АСМ), **В** – АСМ-изображения; СО – моноксид углерода, PBS – забуференный фосфатом физиологический раствор



стеклянных трубок, конец которой опускали на расстоянии 2–4 мм от дна. Для равномерного воздействия СО на кровь использовали магнитную мешалку. Таким образом, весь объем крови подвергался воздействию газа. В исследовании время воздействия составило $t_1 = 160$ с, $t_2 = 320$ с. В результате полученные образцы крови сравнивали с контрольным (см. рис. 1).

Атомная силовая микроскопия. Изображения эритроцитов получали с помощью АСМ (NTEGRA Prima, NT-MDT Co., Зеленоград, Россия) в полуконтактном режиме. Использовали кантилеверы NSG01 (TipsNano, Россия) со следующими характеристиками: коэффициент жесткости 5 Н/м, радиус иглы 10 нм. Количество точек сканирования: 512, 1024. Поля сканирования: 100×100 мкм², 30×30 мкм², 10×10 мкм². Получали АСМ-изображения клеток в монослое. Монослой эритроцитов формировали с помощью прибора V-sampler (Vision Microscopy, Австрия).

Спектрофотометрия. Для измерения концентрации НbСО в крови использовали спектрофотометрический метод. Измеряли спектр поглощения суспензии эритроцитов (20 мкл эритроцитов + 2,4 буфера) с помощью цифрового спектрофотометра Unico 2800 (United Products & Instruments Inc., США). Для вычисления концентрации производной гемоглобина в крови использовали метод “nonlinear fitting” экспериментальных спектров [18].

Обработка данных и статистический анализ. Были проанализированы следующие группы эритроцитов: контрольная группа – кровь 5 доноров (без воздействия СО), исследуемая группа – кровь тех же 5 доноров, но после воздействия на нее СО *in vitro*. Было сделано по 3 мазка для каждого образца крови. В результате было получено 15 мазков для контрольной группы, 15 мазков после воздействия СО $t_1 = 160$ с, 15 мазков после воздействия СО $t_2 = 320$ с. Получали АСМ-изображения клеток на 3 участках на каждом мазке указанных групп. Статистический анализ данных проводили с помощью программы Origin (OriginLab Corporation, США). Для количественных переменных рассчитывали средние арифметические значения и стандартные отклонения ($m \pm \sigma$). Для проверки значимости различия между средними в разных группах использовали программу ANOVA. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

Спектры поглощения контрольной суспензии имели пики $\lambda = 542$ нм и $\lambda = 577$ нм (рис. 2). После воздействия СО происходило смещение пиков.

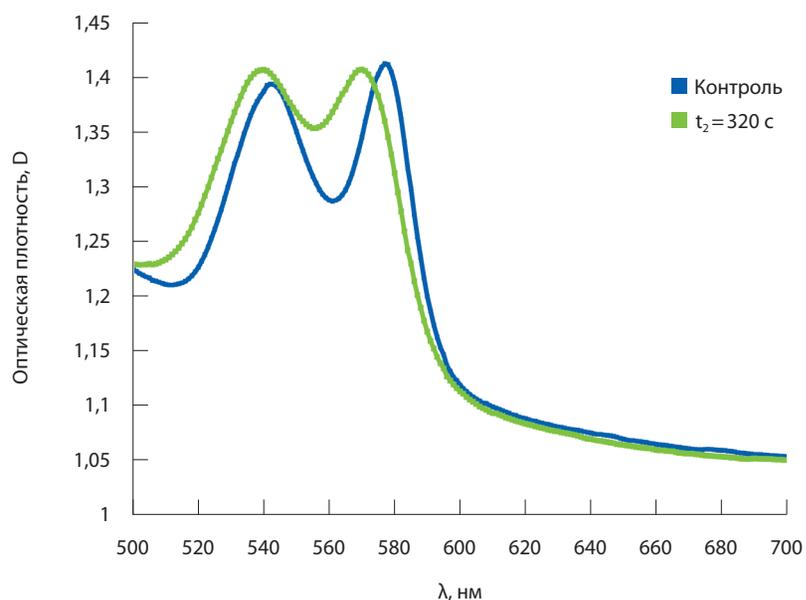


Рис. 2. Спектры поглощения: контрольный образец; после воздействия монооксида углерода на кровь в течение $t_2 = 320$ с

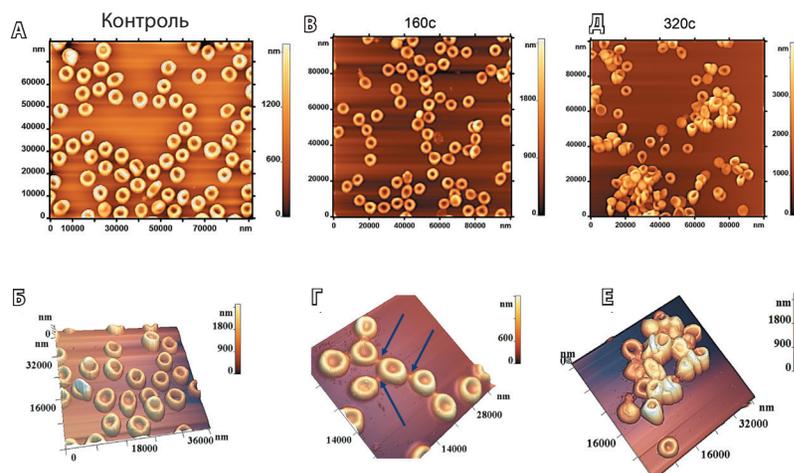


Рис. 3. Изображение эритроцитов в поле атомного силового микроскопа (АСМ): А – контроль $t = 0$ с, АСМ-изображение 80×80 мкм; Б – контроль $t = 0$ с, 3D АСМ-изображение 40×40 мкм; В – воздействие монооксида углерода (СО) $t_1 = 160$ с, АСМ-изображение 100×100 мкм; Г – воздействие СО $t_1 = 160$ с, 3D АСМ-изображение 30×30 мкм; Д – воздействие СО $t_2 = 320$ с, АСМ-изображение 100×100 мкм; Е – воздействие СО $t_2 = 320$ с, 3D АСМ-изображение 30×30 мкм

Пик, который был на длине волны $\lambda = 542$ нм, смещался на длину волны $\lambda = 540$ нм, и пик, который был на длине волны $\lambda = 577$ нм, смещался на длину волны $\lambda = 574$ нм. Действие СО на кровь оценивали по концентрации НbСО в крови. При времени воздействия $t_1 = 160$ с процентное содержание карбоксигемоглобина составило $C_{\text{НbСО}} = 84 \pm 2\%$, при $t_2 = 320$ с оно было равно $88 \pm 2\%$ ($p < 0,01$ по сравнению с t_1).

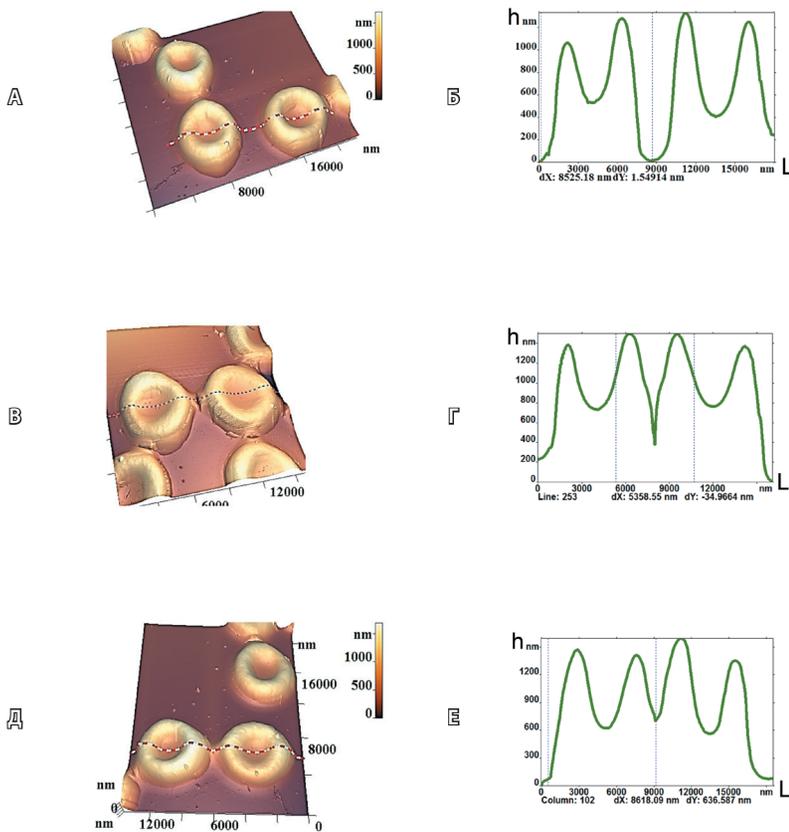


Рис. 4. Эритроциты в поле атомного силового микроскопа и их профили: **А** – контроль; **Б** – профиль контрольных клеток; **В** – зарождение области взаимодействия после действия монооксида углерода (СО) на кровь; **Г** – профиль клеток с зарождением области взаимодействия после действия СО на кровь; **Д** – взаимодействие клеток после действия СО на кровь; **Е** – профиль взаимодействия клеток после действия СО на кровь

Изменение морфологии клеток. Дискоциты, кодоциты, сфероциты

На рис. 3 даны АСМ-изображения эритроцитов в поле атомного силового микроскопа. При воздействии СО на кровь происходило изменение формы и размеров эритроцитов. Эффект зависел от времени воздействия.

В контрольном мазке доля дискоцитов составила $96 \pm 2\%$, а остальные $4 \pm 1\%$ имели форму эхиноцитов. Диаметр клеток был в диапазоне $D_{\text{контр}} = 7,5 \pm 0,8$ мкм.

После воздействия СО на кровь $t_1 = 160$ с в монослое наблюдалось $6 \pm 1\%$ сфероцитов ($p < 0,01$). У $28 \pm 5\%$ диаметр клеток (D) был $< 5,7$ мкм ($p < 0,01$). Отличительной особенностью клеток после воздействия СО было объединение их в цепочки. Между клетками возникали мостики связей (указаны стрелками на рис. 3Г), длина которых $L = 1 \pm 0,5$ мкм, ширина – $10,5 \pm 0,2$ мкм.

В результате воздействия СО $t_2 = 320$ с на кровь в монослое увеличилось количество сфероцитов до $28 \pm 7\%$ ($p < 0,01$) и появились мишеневидные клетки, доля которых составила $10 \pm 2\%$. Процент клеток с размером $D < 5,7$ мкм увеличился до $72 \pm 11\%$ ($p < 0,01$). Повышенная концентрация СО привела к агрегации эритроцитов.

Процесс агрегации показан на рис. 4. В контрольном образце (рис. 4А) клетки находились на большом расстоянии друг от друга (500–1000 нм) и не связывались между собой. Из рисунка 4Б следует, что клетки не взаимодействуют друг с другом, между ними существует пространство по горизонтали $L_{\text{контр}} = 500\text{--}1000$ нм. В результате действия СО развивается процесс взаимодействия клеток (рис. 4В, Г, Д, Е). На рис. 4В, Г видно появление области взаимодействия $L_{\text{со}} = 0$ с общей высотой 500–600 нм. На рис. 4Д, Е проиллюстрировано касание двух эритроцитов в результате их взаимодействия.

Изменение параметров клеток

При воздействии СО происходило изменение формы клеток, вызванное нарушением молекулярной структуры мембран эритроцитов.

Контрольный эритроцит имеет двояковогнутую форму (рис. 5А). АСМ-измерения показали высоту тора дискоцитов $1,2 \pm 0,2$ мкм, глубину впадины – $0,57 \pm 0,04$ мкм (рис. 5А, Б). Воздействие СО на кровь *in vitro* вызвало изменение морфологии клеток и их размеров. Типичные формы клеток, которые появлялись в результате воздействия СО, – это кодоциты (рис. 5В) и сфероциты (рис. 5Д). Основное отличие кодоцита (мишеневидной клетки) от сфероцита в том, что в середине клетки не пэллор, а выпуклость (мишень). Ее диаметр $D_{\text{миш}} = 3 \pm 0,5$ мкм, что составило почти половину диаметра клетки. Высота мишеневидной структуры равна $h_{\text{миш}} = 0,4 \pm 0,01$ мкм (рис. 5В, Г), что соизмеримо с высотой остальной части клетки. Высота купола сфероцита составила $1,8 \pm 0,2$ мкм. Его диаметр равен $D = 5700 \pm 300$ нм. Характеристики сфероцитов отличаются от параметров контрольных клеток.

Обсуждение

Действие СО на кровь может оказать влияние на организм. Продолжительное присутствие в крови СО вызывает серьезные повреждения миокарда и центральной нервной системы. Избыточная эндогенная продукция СО и избыточное образование НbСО могут играть значительную роль



в тканевом повреждении и формировании полиорганной дисфункции [8].

Можно выделить два механизма влияния СО на кровь: 1) изменение морфологии клеток, как следствие – существенное изменение реологии, 2) образование НЬСО в эритроцитах, что приводит к нарушениям окислительно-восстановительных процессов как в самих эритроцитах, так и в окружающих тканях.

Сильные последствия могут возникнуть в связи с нарушениями не только газообмена, но и формы и размеров клеток. Появление НЬСО может повредить основные метаболические пути, которые отвечают за нормальную функцию гемоглобина и целостность клеточной мембраны [9]. В результате это может стать причиной сближения эритроцитов и образования агрегатов (см. рис. 3Д, Е).

Эритроциты – клетки крови, основной функцией которой является перенос кислорода в ткани. В норме это дискоциты. При влиянии физико-химических факторов форма клеток может измениться [21, 22]. В нашем эксперименте после воздействия СО на кровь в течение 160 с форму, отличную от дискоцитов, имели 10% клеток, а в течение 320 с – 38% клеток. При действии СО отмечено сближение эритроцитов и образование специфических мостиков. При увеличении времени воздействия СО происходила агрегация эритроцитов и образование их больших конгломератов размером до 30 мкм.

Появление клеток, отличных от дискоцитов (см. рис. 5), повышенная агрегация (см. рис. 3Д, Е и 4В, Д) эритроцитов могут ухудшить реологические свойства крови [23]. С помощью метода АСМ мы показали слияние эритроцитов, вплоть до образования конгломератов. Этот процесс может лежать в основе механизма появления микротромбов и изменения динамики в зоне микроциркуляции после действия СО на организм [24, 25].

Отметим, что на территории Российской Федерации подобные исследования ранее не проводились. Выявленные нами структурные изменения эритроцитов на микро- и наноровнях дополняют имеющиеся в мировой литературе данные о токсическом действии СО на организм.

Заключение

Методом АСМ показано, что воздействие СО на кровь наряду с образованием НЬСО вызвало изменение морфологии эритроцитов – появление кодоцитов и сфероцитов. С помощью

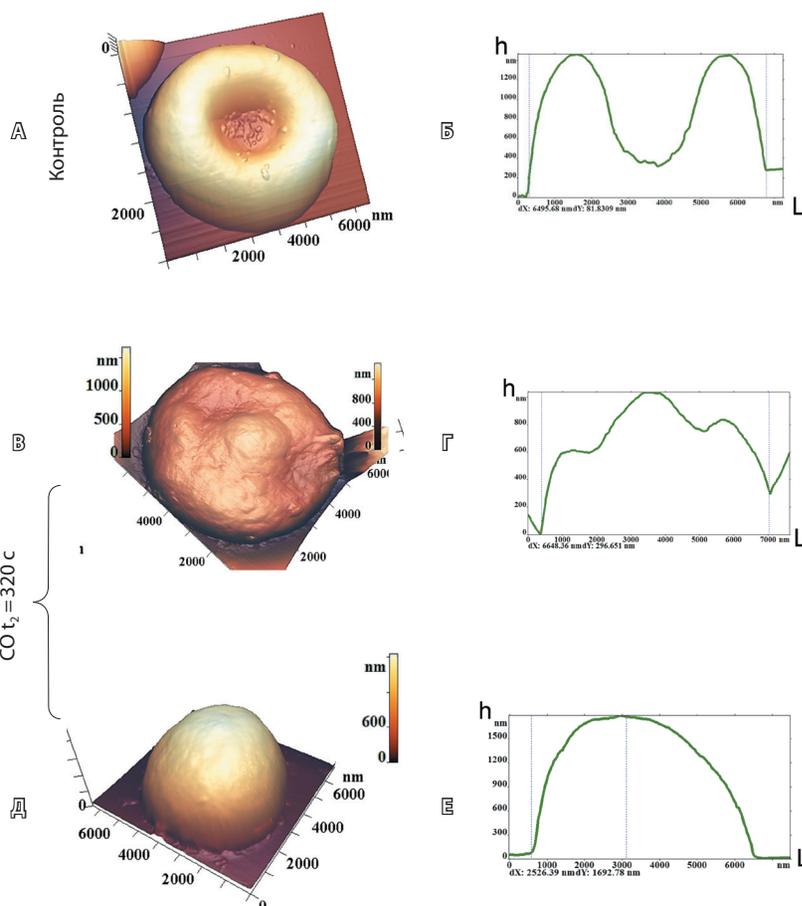


Рис. 5. Формы клеток при воздействии монооксида углерода (СО) в течение 320 с – 3D изображения, полученные с помощью атомного силового микроскопа: дискоцит (А) и его профиль (Б), кодоцит (В) и его профиль (Г), сфероцит (Д) и его профиль (Е)

АСМ-изображений выявлены стадии взаимодействия эритроцитов. При этом наблюдалось формирование связанных между собой эритроцитарных структур. При увеличении времени воздействия СО происходили агрегация эритроцитов и образование конгломератов. Таким образом, действие СО на кровь может вызывать не только появление НЬСО, который полностью блокирует перенос кислорода, но и патологические изменения на мембранном и клеточном уровнях. Данные эффекты следует учитывать при разработке тактики лечения пациентов после отравления угарным газом. Количество и качество этих нарушений в перспективе могут быть рассмотрены как диагностический и прогностический биомаркер патологии организма. Для получения дальнейших результатов, которые могут быть использованы в клинической практике, представляется целесообразным продолжить исследование. ©



Дополнительная информация

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и “Russian Academic Excellence Project 5-100”.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Е.К. Козлова – концепция и дизайн исследования, участие в эксперименте, анализ полученных данных, написание текста, редактирование рукописи; В.А. Сергунова – выполнение экспериментального исследования, получение изображений с помощью атомного силового микроскопа

и их обработка, статистическая обработка данных, написание текста, редактирование рукописи; А.П. Козлов – выполнение экспериментального исследования, измерение карбоксигемоглобина спектрофотометрическим методом, использование метода “nonlinear fitting” для вычисления производных гемоглобина, анализ и интерпретация результатов исследования, редактирование рукописи; Е.А. Шерстюкова – выполнение экспериментального исследования, измерение карбоксигемоглобина спектрофотометрическим методом, использование метода “nonlinear fitting” для вычисления производных гемоглобина, участие в эксперименте, статистическая обработка данных; О.Е. Гудкова – выполнение экспериментального исследования, анализ результатов, редактирование рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Литература / References

- Satran D, Henry CR, Adkinson C, Nicholson CI, Bracha Y, Henry TD. Cardiovascular manifestations of moderate to severe carbon monoxide poisoning. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(9):1513–6. doi: 10.1016/j.jacc.2005.01.044.
- Prabhakar NR, Peng YJ, Nanduri J. Recent advances in understanding the physiology of hypoxic sensing by the carotid body. *F1000Res*. 2018;7. pii: F1000 Faculty Rev-1900. doi: 10.12688/f1000research.16247.1.
- Boehning D, Moon C, Sharma S, Hurt KJ, Hester LD, Ronnett GV, Shugar D, Snyder SH. Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2. *Neuron*. 2003;40(1):129–37. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00596-8.
- Johnson RA, Johnson FK. Heme oxygenase-derived endogenous carbon monoxide impairs flow-induced dilation in resistance vessels. *Shock*. 2008;29(4):526–30. doi: 10.1097/shk.0b013e31815076e3.
- Ahmed A, Rezai H, Broadway-Stringer S. Evidence-based revised view of the pathophysiology of preeclampsia. *Adv Exp Med Biol*. 2017;956:355–74. doi: 10.1007/5584_2016_168.
- Sears DA, Udden MM, Thomas LJ. Carboxyhemoglobin levels in patients with sickle-cell anemia: relationship to hemolytic and vasoocclusive severity. *Am J Med Sci*. 2001;322(6):345–8. doi: 10.1097/00000441-200112000-00007.
- Ehlers M, McCloskey D, Devejian NS. Alarming levels of carboxyhemoglobin in a unit of banked blood. *Anesth Analg*. 2003;97(1):289–90. doi: 10.1213/01.ane.0000066261.57368.0c.
- Курсов СВ, Белецкий АВ, Лизогуб КИ, Лизогуб МВ. Мониторинг содержания в крови карбоксигемоглобина для оценки тяжести травматического шока и реперфузионных повреждений (аналитический обзор с результатами собственных наблюдений). *Медицина неотложных состояний*. 2017;(1):32–8. doi: 10.22141/2224-0586.1.80.2017.94449. [Kursov SV, Beletskiy OV, Lyzogub KI, Lyzogub MV. Blood carboxyhemoglobin monitoring for evaluation of severity of traumatic shock and reperfusion injuries (analytical review with results of our own observations). *Emergency Medicine*. 2017;(1):32–8. Russian. doi: 10.22141/2224-0586.1.80.2017.94449.]
- Szeremeta M, Petelska AD, Kotyńska J, Niemcunowicz-Janica A, Figaszewski ZA. The effect of fatal carbon monoxide poisoning on the surface charge of blood cells. *J Membr Biol*. 2013;246(9):717–22. doi: 10.1007/s00232-013-9591-2.
- Dileo PA, Tucciarone M, Castro ER, Guerrero M. Late stent thrombosis secondary to carbon monoxide poisoning. *Cardiovasc Res*. 2011;92(1):56–8. doi: 10.1016/j.carres.2009.06.002.
- Tyunina OI, Artyukhov VG. Carbon monoxide (CO) modulates surface architectonics and energy metabolism of human blood erythrocytes. *Bull Exp Biol Med*. 2018;165(6):803–7. doi: 10.1007/s10517-018-4269-5.
- Díaz-Marrero AR, Rodríguez González MC, Hernández Creus A, Rodríguez Hernández A, Fernández JJ. Damages at the nanoscale on red blood cells promoted by fire corals. *Sci Rep*. 2019;9(1):14298. doi: 10.1038/s41598-019-50744-6.
- Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Sergunova V, Gudkova O, Manchenko E. Morphology, membrane nanostructure and stiffness for quality assessment of packed red blood cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):7846. doi: 10.1038/s41598-017-08255-9.
- Eichhorn L, Thudium M, Jüttner B. The Diagnosis and Treatment of Carbon Monoxide Poisoning. *Dtsch Arztebl Int*. 2018;115(51–2):863–70. doi: 10.3238/arztebl.2018.0863.
- Widdop V. Analysis of carbon monoxide. *Ann Clin Biochem*. 2002;39(Pt 4):378–91. doi: 10.1258/000456302760042146.
- Kozlova E, Chernysh A, Sergunova V, Gudkova O, Manchenko E, Kozlov A. Atomic force microscopy study of red blood cell membrane nanostructure during oxidation-reduction processes. *J Mol Recognit*. 2018;31(10):e2724. doi: 10.1002/jmr.2724.
- Черныш АМ, Козлова ЕК, Мороз ВВ, Сергунова ВА, Гудкова ОЕ, Манченко ЕА, Козлов АП. Влияние антиоксиданта на основе янтарной кислоты на превращение метгемоглобина в оксигемоглобин in vitro. *Общая реаниматология*. 2018;14(2):46–59. doi: 10.15360/1813-9779-2018-2-46-59. [Chernysh AM, Kozlova EK, Moroz VV, Sergunova VA, Gudkova OE, Manchenko EA, Kozlov AP. Effects of succinate-based antioxidant on in vitro conversion of methemoglobin in oxyhemoglobin. *General Reanimatology*. 2018;14(2):46–59. Russian. doi: 10.15360/1813-9779-2018-2-46-59.]
- Kozlova E, Chernysh A, Manchenko E, Sergunova V, Moroz V. Nonlinear biomechanical characteristics of deep deformation of native RBC membranes in normal state and under modifier action. *Scanning*. 2018;2018:1810585. doi: 10.1155/2018/1810585.
- Ruggeri FS, Marcott C, Dinarelli S, Longo G, Girasole M, Dietler G, Knowles TPJ. Identification of oxidative stress in red blood cells with nanoscale chemical resolution by infrared nanospectroscopy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9). pii: E2582. doi: 10.3390/ijms19092582.
- Yang CC, Ger J, Li CF. Formic acid: a rare but deadly source of carbon monoxide poisoning. *Clin Toxicol (Phila)*. 2008;46(4):287–9. doi: 10.1080/15563650701378746.
- Carrelli-Alinovi C, Dinarelli S, Sampaiole B, Misiti F, Girasole M. Morphological changes induced in erythrocyte by amyloid beta peptide and glucose depletion: A combined atomic force microscopy and biochemical study. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2019;1861(1):236–44. doi: 10.1016/j.bbmem.2018.07.009.
- Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, Gudkova O, Sergunova V, Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci Rep*. 2014;4:6033. doi: 10.1038/srep06033.
- Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem*. 2000;46(8 Pt 2):1284–90.
- Baskurt OK, Meiselman HJ. RBC aggregation: more important than RBC adhesion to endothelial cells as a determinant of in vivo blood flow in health and disease. *Microcirculation*. 2008;15(7):585–90. doi: 10.1080/10739680802107447.



25. Лысенко ВИ, Голянищев МА. Диагностика и неотложная помощь при отравлении монооксидом углерода. Медицина неотложных

состояний. 2016;(5):18–24. doi: 10.22141/2224-0586.5.76.2016.76429. [Lysenko VI, Golyanischev MA. Diagnosing and emergency care

at poisoning with carbon monoxide. Emergency Medicine. 2016;(5):18–24. Russian. doi: 10.22141/2224-0586.5.76.2016.76429.]

Changes in the morphology of erythrocytes after *in vitro* exposure of blood to carbon monoxide

E.K. Kozlova^{1,2} • V.A. Sergunova² • A.P. Kozlov¹ • E.A. Sherstyukova^{1,2} • O.E. Gudkova²

Background: One of the pathological effects of carbon monoxide (CO) on blood is the formation of carboxyhemoglobin. Carboxyhemoglobin completely blocks oxygen transfer; therefore, there is a net decrease in oxygen transport by red blood cells potentially resulting in tissue hypoxia. The effects of CO on blood can also damage cell membranes. Atomic force microscopy (AFM) has been recognized as effective for investigation into the mechanisms of structural damage in erythrocyte membranes. **Aim:** By means of AFM, to identify characteristics of changes in morphology and aggregation of erythrocytes exposed to CO *in vitro*. **Materials and methods:** All experiments were performed *in vitro*. We studied the morphology of erythrocytes and their aggregates with AFM. Blood sampling (150 µl) in microvettes with EDTA (Sarstedt AG & Co., Germany) was carried out during a prophylactic work-up of 5 volunteers. To obtain CO in a test tube, formic acid was mixed with sulfuric acid 1:1. Blood levels of carboxyhemoglobin were measured by spectrophotometry. A nonlinear fitting method of the experimental spectra was used to calculate the concentrations of hemoglobin derivatives in blood. Statistical analysis was done with the Origin software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). **Results:** After CO exposure, a shift in peaks was observed. At exposure time $t_2 = 320$ s, the percentage of carboxyhemoglobin (C_{HbCO}) was $88 \pm 2\%$. As a result of blood exposure to CO, at $t_1 = 160$ s 10% of the cells differed in their shape from discocytes, whereas at

$t_2 = 320$ s their proportion was 38%. With increasing duration of exposure to CO, erythrocyte aggregation occurred with formation of their large conglomerates up to 30 µm in size. In the control smear, the proportion of discocytes was $96 \pm 2\%$, and the remaining $4 \pm 1\%$ of the cells had the form of echinocytes. The cell diameter (D_{cont}) was in the range 7.5 ± 0.8 µm. After blood exposure to CO at $t_1 = 160$ s in the monolayer, $28 \pm 5\%$ of cells had a diameter less than < 5.7 µm. After CO exposure at $t_2 = 320$ s, the proportion of cells with a diameter of less than < 5.7 µm increased to $72 \pm 11\%$.

Conclusion: The experiments have shown that blood exposure to CO changed the morphology of erythrocytes. The formation of interconnected structures made of red blood cells was observed. With increased time of exposure, erythrocytes demonstrated aggregation with conglomerate formation.

Key words: red blood cells, carbon monoxide, atomic force microscopy, aggregation

For citation: Kozlova EK, Sergunova VA, Kozlov AP, Sherstyukova EA, Gudkova OE. Changes in the morphology of erythrocytes after *in vitro* exposure of blood to carbon monoxide. Almanac of Clinical Medicine. 2019;47(7):669–75. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-068.

Received 23 October 2019; revised 12 November 2019; accepted 20 November 2019; published online 5 December 2019

Funding

The study was performed with a financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and the "Russian Academic Excellence Project 5-100".

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Authors' contributions

E.K. Kozlova, the study design and concept, participation in the experiments, data analysis, text writing and editing of the manuscript; V.A. Sergunova, performance of the experiments, imaging with atomic force microscope and their processing, statistical analysis, text writing, editing of the manuscript; A.P. Kozlov, performance of the experiments, measurement of carboxyhemoglobin by spectrophotometry, calculation of hemoglobin derivatives by a nonlinear fitting model, analysis and interpretation of the study results, editing of the manuscript; E.A. Sherstyukova, performance of the experiments, measurement of carboxyhemoglobin by spectrophotometry, calculation of hemoglobin derivatives by a nonlinear fitting model, statistical analysis; O.E. Gudkova, performance of the experiments, analysis of the study results, editing of the manuscript. All the authors have contributed significantly to the study conduct and preparation of the paper, have read and approved its final version before the publication.

Elena K. Kozlova – Doctor of Phys. and Math. Sci., Professor, Chair of Medical and Biological Physics¹; Leading Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1780-895X>. E-mail: waterlake@mail.ru

Viktoriya A. Sergunova – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Chief of Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8425-0845> ✉ 25/2 Petrovka ul., Moscow, 107031, Russian Federation. Tel.: +7 (985) 724 18 27. E-mail: orbf@mail.ru

Aleksandr P. Kozlov – PhD (in Phys. and Math.), Associate Professor, Chair of Medical and Biological Physics¹; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3907-080X>. E-mail: fillnoise@mail.ru

Ekaterina A. Sherstyukova – Assistant, Chair of Medical and Biological Physics¹; Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9962-6315>. E-mail: kmanchenko@yandex.ru

Olga E. Gudkova – Senior Research Fellow, Laboratory of Biophysics of Cells Membranes in Critical States²; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9220-0138>. E-mail: olkagood@yandex.ru

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8/2 Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russian Federation

²V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology; 25/2 Petrovka ul., Moscow, 107031, Russian Federation

ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2

150 лет клинике неврологии МОНИКИ

Научно-практическая конференция
с международным участием

19 мая
2020 года



*Посвящается 150-летию клиники неврологии МОНИКИ – старейшей в России
и второй по старшинству в мире
(после знаменитой клиники Жана-Мартена Шарко в Hôpital de la Salpêtrière)*

Председатель программного комитета: Сергей Викторович Котов – д.м.н., проф., главный внештатный специалист невролог Министерства здравоохранения Московской области, председатель Московского областного общества неврологов (регионального подразделения Всероссийского общества неврологов), руководитель отдела терапии, заведующий кафедрой неврологии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского

Контактная информация:

- по вопросам участия в программе конференции можно обращаться:
+7 (495) 631 73 83; e-mail: i.grafenkova@monikiweb.ru; alex-013@yandex.ru
- по вопросам спонсорской поддержки и участия в работе выставочной экспозиции можно обращаться к представителям официального технического организатора АНО ДПО «Институт развития здравоохранения»:
+7 (915) 382 71 15; +7 (985) 412 86 78; e-mail: dpo.irzdrav@gmail.com

