



Том № 2

3

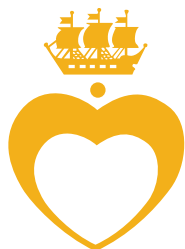
2022

РОССИЙСКИЙ ЖУРНАЛ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

RUSSIAN JOURNAL FOR PERSONALIZED MEDICINE

Главный редактор
Академик РАН
Шляхто Евгений Владимирович





Том № 2

| 3

| 2022

РОССИЙСКИЙ ЖУРНАЛ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

RUSSIAN JOURNAL FOR PERSONALIZED MEDICINE

Главный редактор
Академик РАН
Шляхто Евгений Владимирович

ОСНОВНЫЕ ТЕМАТИКИ (РУБРИКИ)

- Генетические риски и причины заболеваний
- Эпигенетика
- Биомаркеры болезни и здоровья
- Микробиота и антимикробная терапия
- Таргетная терапия заболеваний
- Фармакогенетика и фармакогеномика
- Генная терапия и технологии редактирования генома
- Искусственный интеллект и машинное обучение как инструмент персонализированной медицины



ФГБУ «Национальный
медицинский исследовательский
центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России

РОССИЙСКИЙ ЖУРНАЛ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР: Шляхто Е. В.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА: Конради А. О.

ОТВ. СЕКРЕТАРЬ: Пospelова М. Л.

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ

Бабенко А. Ю. (Санкт-Петербург)
Бухановский А. В. (Санкт-Петербург)
Вавилова Т. В. (Санкт-Петербург)
Васин А. В. (Санкт-Петербург)
Васичкина Е. С. (Санкт-Петербург)
Дмитриев А. В. (Санкт-Петербург)
Ильин И. В. (Санкт-Петербург)
Каприн А. Д. (Москва)
Копылов Ф. Ю. (Москва)
Максимов А. С. (Санкт-Петербург)
Мокрышева Н. Г. (Москва)
Омельяновский В. В. (Москва)
Пармон Е. В. (Санкт-Петербург)
Самочерных К. А. (Санкт-Петербург)
Секачева М. И. (Москва)
Созинов А. С. (Казань)
Стародубова А. В. (Москва)
Суворов А. Н. (Санкт-Петербург)
Сычев Д. А. (Москва)
Филаретова Л. П. (Санкт-Петербург)
Хатьков И. Е. (Москва)
Шевцов М. А. (Санкт-Петербург)
Шелудько В. Н. (Санкт-Петербург)
Jeroen J. Vax (Нидерланды)
Roberto Ferrari (Италия)
Michel Komajda (Франция)
Gilbert Massard (Люксембург)
Fausto J. Pinto (Португалия)
Panos Vardas (Греция)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Alberico Catapano (Италия)
Giuseppe Faggian (Италия)
Luigi Fontana (Австралия)
Omry Koren (Израиль)
Béla Merkely (Венгрия)
Mark Pitkin (США)
Noam Shomron (Израиль)
Petr Widimský (Чешская республика)
Гринева Е. Н. (Санкт-Петербург)
Дячук В. А. (Санкт-Петербург)
Закьян С. М. (Новосибирск)
Костарева А. А. (Санкт-Петербург)
Костик М. М. (Санкт-Петербург)
Малашичева А. Б. (Санкт-Петербург)
Моисеева О. М. (Санкт-Петербург)
Моисеенко В. М. (Санкт-Петербург)
Первунина Т. М. (Санкт-Петербург)
Попова П. В. (Санкт-Петербург)
Софронов Г. А. (Санкт-Петербург)
Ткачук В. А. (Москва)
Ульрих Е. А. (Санкт-Петербург)
Успенский В. Е. (Санкт-Петербург)
Чехонин В. П. (Москва)
Школьникова М. А. (Москва)
Янишевский С. Н. (Санкт-Петербург)

18+

Журнал зарегистрирован в Государственном
комитете РФ по печати.
Свидетельство о рег. ПИ № ФС77-80730
от 29 марта 2021 г.

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

Тематическая рассылка по специалистам.

Верстка — Попова Л. П.
Корректурa — Медведева А. В.
Издатель: «ФОНД АЛМАЗОВА»

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

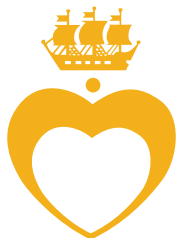
Подача рукописей и переписка с авторами,
размещение рекламы и подписка —
e-mail: pm@almazovcentre.ru

Подписка по каталогу агентства «Роспечать»:
подписной индекс 79638

Архив номеров: [http://www.almazovcentre.ru/
?page_id=78357](http://www.almazovcentre.ru/?page_id=78357)

Все права защищены. © 2022.

Полное или частичное воспроизведение
материалов, опубликованных в журнале,
допускается только с письменного
разрешения редакции.
Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных материалов.



Federal State Budgetary Institution
“Almazov National Medical Research Centre”
of the Ministry of Health of the Russian Federation

RUSSIAN JOURNAL FOR PERSONALIZED MEDICINE

CHIEF EDITOR: Prof. Evgeny Shlyakhto

DEPUTY CHIEF EDITOR: Alexandra Konradi

EXECUTIVE SECRETARY: Maria Pospelova

EDITORIAL BOARD

A. Yu. Babenko (St. Petersburg)
A. V. Bukhanovsky (St. Petersburg)
A. V. Dmitriev (St. Petersburg)
L. P. Filaretova (St. Petersburg)
I. V. Ilyin (St. Petersburg)
A. D. Kaprin (Moscow)
I. E. Khatkov (Moscow)
F. Yu. Kopylov (Moscow)
A. S. Maksimov (St. Petersburg)
N. G. Mokrysheva (Moscow)
V. V. Omelyanovskiy (Moscow)
E. V. Parmon (St. Petersburg)
K. A. Samochernykh (St. Petersburg)
M. I. Sekacheva (Moscow)
V. N. Sheludko (St. Petersburg)
M. A. Shevtsov (St. Petersburg)
A. S. Sozinov (Kazan)
A. V. Starodubova (Moscow)
A. N. Suvorov (St. Petersburg)
D. A. Sychev (Moscow)
E. S. Vasichkina (St. Petersburg)
A. V. Vasin (St. Petersburg)
T. M. Vavilova (St. Petersburg)
Jeroen J. Bax (Netherlands)
Roberto Ferrari (Italy)
Michel Komajda (France)
Gilbert Massard (Luxembourg)
Fausto J. Pinto (Portugal)
Panos Vardas (Greece)

INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

Alberico Catapano (Italy)
Giuseppe Faggian (Italy)
Luigi Fontana (Austria)
Omry Koren (Israel)
Béla Merkely (Hungary)
Mark Pitkin (USA)
Noam Shomron (Israel)
Petr Widimský (Czech Republic)
V. P. Chekhonin (Moscow)
V. A. Dyachuk (St. Petersburg)
E. N. Grineva (St. Petersburg)
A. A. Kostareva (St. Petersburg)
M. M. Kostik (St. Petersburg)
A. B. Malashicheva (St. Petersburg)
O. M. Moiseeva (St. Petersburg)
V. M. Moiseenko (St. Petersburg)
T. M. Pervunina (St. Petersburg)
P. V. Popova (St. Petersburg)
M. A. Shkolnikova (Moscow)
G. A. Sofronov (St. Petersburg)
V. A. Tkachuk (Moscow)
E. A. Ulrikh (St. Petersburg)
V. E. Uspensky (St. Petersburg)
S. N. Yanishevsky (St. Petersburg)
S. M. Zakiyan (Novosibirsk)

18+

The Journal is registered by the State Press Committee of the Russian Federation.

Registration Certificate PI No. ΦC77-80730 dated March 29, 2021.

Publication frequency: 6 issues per year.
Circulation: 1,100 copies.

Distribution to specialists.

Layout designer: L.P. Popova,
proofreader: A.V. Medvedeva.

Publisher: ALMAZOV FOUNDATION

Address: 2 Akkuratova street,
Saint Petersburg, 197341
Phone: + 7 (812) 702-37-16

For submission, correspondence, advertisement and subscription, please email your inquiry to pm@almazovcentre.ru.

The subscription code in the Rospechat catalogue is 79638.

Previous issues: http://www.almazovcentre.ru/?page_id=78357

All rights reserved. © 2022.

Materials published in this Journal should not be reproduced, in full or in part, without the written permission of the publisher.

The editorial board bears no responsibility whatsoever for the contents of advertisements.

СОДЕРЖАНИЕ

КОЛОНКА ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

- 6** **Биомаркеры, их типы и основы применения в персонализированной медицине**
Конради А. О.

ОБЗОРЫ

- 17** **Персонализированный подход к лечению церебральных артериовенозных мальформаций**
Рожченко Л. В., Дрягина Н. В.

ФАРМАКОГЕНЕТИКА И ФАРМАКОГЕНОМИКА

- 27** **Фармакогенетическое тестирование как элемент персонифицированной медицины в реальной клинической практике**
Бартенева А. С., Воробьева Н. А.

- 38** **Изониазид-индуцированное поражение печени: фармакогенетические аспекты**
Краснова Н. М., Николаев В. М.

- 47** **Полиморфные варианты rs1004467 и rs11191548 гена CYP17A1 связаны с ранним гиполипидемическим ответом на терапию розувастатином**
Кононов С. И., Азарова Ю. Э., Клёсова Е. Ю., Быканова М. А., Кононова И. Н., Полоников А. В.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РИСКИ И ПРИЧИНЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ

- 61** **Ассоциация полиморфных аллелей гена CYP2C19 и клинических показателей у пациентов русской и бурятской национальностей, перенесших стентирование коронарных сосудов и принимавших клопидогрел**
Зеленская Е. М., Донирова О. С., Воронина Е. Н., Ковалева А. Я., Протасов К. В., Лифшиц Г. И.

СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

- 71** **Применение пульс-дупликатора в экспериментальных исследованиях протезов клапанов сердца**
Квиндт П. А., Толпыгин Д. С., Успенский В. Е., Филиппов А. А.

- 78** **Оценка структурных и функциональных особенностей реимплантированного аортального клапана через 18 месяцев после операции David I с использованием методики высокоточного моделирования структур корня аорты**
Филиппов А. А., Успенский В. Е., Грубенко Г. А., Толпыгин Д. С., Карев Е. А., Квиндт П. А., Ананьевская П. В., Колодяжная А. О., Малашичева А. Б., Гордеев М. Л.

- 89** **Кальцифицирующий аортальный стеноз: маркеры тяжести и подходы к лечению пациентов разного хирургического риска (обзор литературы)**
Успенский В. Е., Салаватов Б. К., Пищугин А. С., Толпыгин Д. С., Малашичева А. Б., Зверев Д. А., Моисеева О. М., Гордеев М. Л.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

- 101** **Методология исследования единичных внеклеточных везикул различного клеточного происхождения**
Вельмискина А. А., Калинина О. В., Петрова Т. А., Никитин Ю. В., Головкин А. С.

- 111** **Особенности сбора биологического материала при изучении патологической кальцификации сердца и сосудов**
Боярская Н. В., Шишкова А. А., Сапранков В. Л., Успенский В. Е., Малашичева А. Б.

- 119** **Тест генерации тромбина как интегральный анализ системы гемостаза: технические возможности и применение в клинико-лабораторной практике**
Мельничникова О. С., Жиленкова Ю. И., Золотова Е. А., Пищулов К. А., Сироткина О. В., Симакова М. А., Вавилова Т. В.

CONTENT

EDITORS CORNER

- 6** **Biomarkers, types and role in personalized medicine**
Konradi A. O.

REVIEWERS

- 17** **Personalized approaches to treatment of complex cerebral arteriovenous malformations**
Rozhchenko L. V., Dryagina N. V.

PHARMACOGENETICS AND PHARMACOGENOMICS

- 27** **Pharmacogenetic testing as an element of personalized medicine in real clinical practice**
Barteneva A. S., Vorobyeva N. A.
- 38** **Isoniazid-induced liver injury: pharmacogenetic aspects**
Krasnova N. M., Nikolaev V. M.
- 47** **Polymorphisms rs1004467 and rs11191548 at CYP17A1 are associated with early hypolipidemic response to rosuvastatin therapy**
Kononov S. I., Azarova Iu. E., Klyosova E. Yu., Bykanova M. A., Kononova I. N., Polonikov A. V.

GENETIC RISKS AND CAUSES OF DISEASE

- 61** **Association of snp CYP2C19 and clinical parameters in russian and buryat patients after taking clopidogrel after coronary stenting**
Zelenskaya E. M., Donirova O. S., Voronina E. N., Kovaleva A. Ya., Protasov K. V., Lifshits G. I.

CARDIOVASCULAR DISEASES

- 71** **Possibilities of application of pulse duplicator in studying the aortic root**
Kvindt P. A., Tolpygin D. S., Uspenskiy V. E., Filippov A. A.

- 78** **Evaluation of structural and functional features of reimplanted aortic valve after David I procedure with the use of high-precision 3-dimensional segmentation of the aortic root**
Filippov A. A., Uspenskiy V. E., Grubenko G. A., Tolpygin D. S., Karev E. A., Kvindt P. A., Ananyevskaya P. V., Kolodiyazhnaya A. O., Malashicheva A. B., Gordeev M. L.

- 89** **Calcific aortic stenosis: markers of severity and approaches to the treatment of patients with different surgical risks (literature review)**
Uspenskiy V. E., Salavatov B. K., Pischugin A. S., Tolpygin D. S., Malashicheva A. B., Zverev D. A., Moiseeva O. M., Gordeev M. L.

LABORATORY DIAGNOSTICS

- 101** **Methodology to study single extracellular vesicles of various cellular origin**
Velmiskina A. A., Kalina O. V., Petrova T. A., Nikitin Yu. V., Golovkin A. S.
- 111** **Features of collecting biological material in the study of pathological calcification of the heart and blood vessels**
Boyarskaya N. V., Shishkova A. A., Saprankov V. L., Uspenskiy V. E., Malashicheva A. B.
- 119** **Thrombin generation test as an integral analysis of the hemostasis system: technical capabilities and application in laboratory practice**
Melnichnikova O. S., Zhilenkova Yu. I., Zolotova E. A., Pishchulov K. A., Sirotkina O. V., Simakova M. A., Vavilova T. V.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616-01

БИОМАРКЕРЫ, ИХ ТИПЫ И ОСНОВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ

Конради А. О.

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

Контактная информация:

Конради Александра Олеговна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: konradi_ao@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 06.04.2022
и принята к печати 20.04.2022.

РЕЗЮМЕ

В обзоре приведены данные о роли биомаркеров в персонализированной медицине. Приведена классификация биомаркеров, описан процесс их валидации и сложности при внедрении в клиническую практику. Кроме того, освещена роль биобанков в появлении новых биомаркеров.

Ключевые слова: биомаркер, персонализированная медицина, прогноз, стратификация риска.

Для цитирования: Конради А.О. Биомаркеры, их типы и основы применения в персонализированной медицине. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(3):6-16. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-6-16

BIOMARKERS, TYPES AND ROLE IN PERSONALIZED MEDICINE

Konradi A. O.

Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Konradi Aleksandra O.,
Almazov National Medical Research
Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: konradi_ao@almazovcentre.ru

Received 06 April 2022;

accepted 20 April 2022.

ABSTRACT

The review summarizes current knowledge about biomarkers in personalized medicine. Classification of biomarkers, the process of validation and challenges in implementation are discussed. The role of biobanks for new biomarkers is also included.

Key words: biomarker, outcome, personalized medicine, risk stratification.

For citation: Konradi AO. Biomarkers, types and role in personalized medicine. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(3):6-16. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-6-16

Список сокращений: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ЛПНП — липопротеины низкой плотности, НЦМУ — научный центр мирового уровня, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РНК — рибонуклеиновая кислота, ЭКГ — электрокардиография, BRCA1 (Breast cancer type 1 susceptibility protein) — протеин предрасположенности к раку молочной железы 1 типа, DPD — дигидропиримидиндегидрогеназа, HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) — рецептор эпидермального фактора роста, тип 2, KRAS (Kirsten rat sarcoma virus) — вирус саркомы Кирстена у крыс.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ

Современная диагностика и предикция исходов во многом базируется на науке о биомаркерах. Биомаркеры выступают ключевым звеном концепции персонализированной медицины, в связи с чем уделяется большое внимание их валидации в клинической практике. В широком смысле биомаркер — это любая биологическая характеристика организма, которая может быть молекулярной, анатомической, физиологической или биохимической. Очень важно, что уровень или значимость любого биомаркера могут быть объективно измерены и оценены. Биомаркеры выступают в роли индикатора нормального функционирования организма или патологического биологического процесса. В ряде случаев они позволяют оценить фармакологический ответ на терапевтическое вмешательство. Биомаркер показывает определенный физический признак или измеримое биологически обусловленное состояние в организме, которое связано с болезнью или конкретным показателем здоровья.

В 2001 году было дано следующее определение: «Биомаркер — это объективно измеренная или оцененная иным способом характеристика (индикатор) нормальных биологических процессов, патологических процессов или ответа на вмешательство» [1]. Обычно под биомаркерами понимают молекулярные маркеры, в том числе биохимические, иммунологические или генетические, но, строго говоря, под это определение попадают и любые физиологические параметры (например, артериальное давление), а также данные оценки поражений органов-мишеней, что часто используется в кардиологии (суррогатные маркеры органных поражений или так называемые поражения органов-мишеней).

Основные типы биомаркеров с точки зрения их роли в персонализированной медицине [2]:

1. **Диагностический биомаркер** используется для ранней и точной диагностики заболеваний или

выявления факторов риска (классический пример — обнаружение РНК HCV или вируса SARS-COV-2).

2. **Биомаркер восприимчивости/риска** отражает потенциальный риск развития заболевания (например, обнаружение BRCA1 и риск рака молочной железы или уровень липопротеинов низкой плотности и риск инфаркта миокарда).

3. **Прогностический биомаркер** предсказывает течение заболевания (благоприятное против агрессивного), например, HER-2 для рака молочной железы. Такой биомаркер также может быть одновременно и предиктивным.

4. **Предиктивный (предсказывающий) биомаркер** определяет ответ на терапию и/или токсичность лекарственных препаратов (например, EGFRNSCLC/гефитиниб, DPD-рак желудочно-кишечного тракта/фторпиримидины).

С точки зрения взаимодействия организма с окружающей средой, в том числе с лекарствами, существуют и другие типы биомаркеров, такие как фармакодинамические, которые измеряют влияние препарата на организм. Таким маркером могут выступать самые простые параметры, например, уровень АД при назначении антигипертензивной терапии, уровень холестерина ЛПНП при назначении статинов, уровень экспрессии ряда онкомаркеров при проведении химиотерапии. В таком случае эти биомаркеры становятся суррогатными конечными точками в лечении, для чего необходимо доказать, что их изменение под воздействием лечения действительно сказывается на прогнозе.

В рамках персонализированной (прецизионной) медицины биомаркеры используются также для **стратификации пациентов** — идентификации группы пациентов с общими «биологическими» характеристиками с помощью молекулярного, биохимического и визуализирующего диагностического тестирования для выбора оптимальной тактики ведения и достижения наилучшего из всех возможных исходов.

Два типа биомаркеров особенно важны для персонализированной медицины: прогностические и предиктивные. **Предиктивные биомаркеры** — это исходные измерения, которые дают информацию о том, какие пациенты могут или, наоборот, маловероятно получают пользу от конкретного лечения. **Прогностические биомаркеры** дают информацию о долгосрочном исходе у пациентов без терапии или тех, кто получает стандартное лечение. Прогностические биомаркеры отражают исходный риск и могут не обязательно указывать на чувствительность к конкретному лечению, но они тоже помогают в выборе лечения. Так, пациенты, у которых определен плохой прогноз, требуют бо-

лее агрессивного лечения, в то время как для тех, у кого прогноз благоприятный, могут подойти менее агрессивные схемы или даже не потребуются дополнительного лечения.

2. МЕТОДОЛОГИЯ РАЗРАБОТКИ И ВАЛИДАЦИИ НОВЫХ БИОМАРКЕРОВ

Ежегодно исследователями и фармацевтическими компаниями идентифицируются и изучаются тысячи новых биомаркеров, однако лишь малая доля из них в последующем становятся клинически значимыми и применимыми на практике. В 2007 году Morrow и de Lemos выделили три критерия для оценки перспективности клинического использования новых биомаркеров [3]:

- 1) простота измерения,
- 2) добавление реальной клинической информации,
- 3) влияние на принятие решений.

Первый критерий обычно прост в оценке. Действительно, одним из преимуществ растворимых биомаркеров является то, что для большинства из них, которые интересуют медицинских работников, существуют стандартизированные, воспроизводимые лабораторные анализы. В отличие от этого, оценка соответствия второму критерию — получение важной дополнительной клинической информации в результате измерения уровня биомаркера — может быть сложной. Например, в кардиологии биомаркер полезен только тогда, когда он вносит свой весомый вклад к той модели или шкале риска, которая уже сформирована на основании традиционных факторов риска. Например, чтобы генетический прогностический маркер риска сердечно-сосудистого события имело смысл внедрять в практику, его информативность должна превышать имеющиеся шкалы, такие как SCORE.

Независимо от того, используется ли биомаркер для скрининга, диагностики заболевания или оценки прогноза, он должен каким-либо образом влиять на клиническое решение. Особое внимание при измерении и оценке биомаркеров для скрининга следует уделять потенциальной важности иных, отличных от исследуемого органа или заболевания, источников его вариативности. Такая вариация может быть особенно актуальна для биомаркеров, происходящих из различных тканей, например, тех, чей уровень повышается при инфекционных состояниях, при ожирении, при любом хроническом воспалении. Классическим примером может быть уровень С-реактивного белка, важность которого для прогноза доказана при многих состояниях, тогда как причины повышения уровня этого белка

чрезвычайно многообразны. И, соответственно, при очень существенном повышении уровня, перечень дифференциальных диагнозов (инфекция, онкология, ревматология) будет отличаться от такового при незначительном повышении (атеросклероз, низкая активность ревматологических заболеваний, другие источники хронического воспаления). Пол, возраст, характер питания, масса тела влияют на уровень многих биомаркеров, снижая их точность в диагностике конкретных состояний.

Процесс обнаружения и валидации биомаркеров сегодня разработан и стандартизован лучше всего в области онкологических заболеваний [4]. На первом этапе выявляются новые целевые биомаркеры или уточняются старые на доклинической стадии процесса валидации, что приводит к проверке возможности использования определения конкретного биомаркера для дифференциации лиц с заболеванием и без. Затем ретроспективные исследования используются для определения того, отличается ли уровень биомаркера у больных и здоровых, и оценивается степень его вариативности, чтобы установить пороговое значение для положительного результата скрининга. В дальнейшем проспективные скрининговые исследования оценивают значимость и точность биомаркера на больших выборках, и только потом биомаркер валидируется в качестве инструмента контроля заболеваний в ходе рандомизированных контролируемых исследований. Очевидно, что процесс внедрения в практику биомаркера едва ли не более сложен, чем внедрение нового лекарственного средства. Это связано с тем, что практическое внедрение нового биомаркера требует изменения порядка и стандартов оказания помощи и существенного финансирования.

Геномика и другие омиксные технологии в значительной степени способствовали идентификации и практическому внедрению новых биомаркеров. Генотипирование и анализ экспрессии генов действительно являются ключевыми элементами персонализированной медицины. Однако геномные технологии имеют ограничения (функциональная значимость генетических вариантов, ложные негативные гены и т. д.) и не могут охватить все подходы к развитию стратификации пациентов на основе биомаркеров. Мультифакторный подход, объединяющий различные технологии (омиксные; фенотипические исследования; визуализация; функциональные исследования *in vivo* и т. д.), является ключевым подходом к конкретной реализации концепции персонификации медицины.

Биомаркеры могут быть идентифицированы и проверены, с точки зрения перспектив применения, несколькими способами — на стадии докли-

нических исследований, в эпидемиологических исследованиях или в ходе клинических испытаний. В идеале их идентификация должна происходить как можно раньше в процессе открытия мишеней и разработки лекарственных средств. Доклиническая идентификация стратификационных биомаркеров сочетает в себе понимание механизмов заболевания и механизма действия лекарств с характеристиками, уникальными для конкретного индивида.

Не следует ставить знак равенства между биомаркерами и лабораторными анализами. Биомаркеры должны быть надлежащим образом валидированы, прежде чем их можно будет использовать в клинике. Конкретная применимость квалифицированного биомаркера зависит в то же время от разработки надежной методики выполнения лабораторного анализа. Следовательно, цепочка действий в данном случае включает в себя открытие стратификационного биомаркера и последующее создание методологии анализа, что предпочтительно начинать с доклинической фазы исследований и только потом изучать выбранные стратификационные биомаркеры в клинических испытаниях.

В реальной жизни недостаточное знание механизмов действия лекарственных средств и/или отсутствие необходимых данных может препятствовать раннему выявлению и внедрению в практику стратификационных биомаркеров. Очень часто молекулярные предикторы, которые предсказывают токсичность или эффективность лекарств, могут быть идентифицированы после того, как препараты уже получили широкое практическое применение. Например, таргетная терапия, нацеленная на рецептор эпидермального фактора роста, была впервые одобрена до того, как было продемонстрировано, что мутации в KRAS гене явились причинами неудачи применения этих препаратов в лечении метастатического колоректального рака [5]. Этот пример показывает, что грамотный ретроспективный анализ данных проспективных рандомизированных контролируемых исследований может помочь в выборе тактики лечения определенных подгрупп пациентов. При этом стандартом остается проведение проспективных исследований, в которых стратификация групп пациентов по уровню биомаркера проводится перед назначением того или иного вида терапии.

Критерии валидации биомаркера должны зависеть от его предполагаемого использования. Существуют три взаимосвязанных подхода к валидации прогностических и предиктивных биомаркеров: аналитический, метод клинических испытаний и метод оценки клинической полезности [6, 7].

Аналитическая валидация устанавливает надежность и воспроизводимость самого анализа

и точности измерений, оценивает чувствительность и специфичность, по сравнению с золотым стандартом, если таковой имеется [8]. Клиническая валидность относится к установлению способности биомаркера предсказывать прогноз или эффекты лечения у отдельных пациентов. Для прогностического биомаркера корреляция между уровнем биомаркера и клинической конечной точкой (например, временем дожития) может указывать на клиническую валидность. Для надежной клинической валидации прогностического биомаркера по конечным точкам требуется рандомизированное клиническое исследование для объективной оценки эффектов лечения (нового лечения по сравнению с контрольным лечением) и оценки того, изменяются ли эффекты лечения в зависимости от статуса биомаркера, то есть наличие связи эффекта лечения с биомаркером.

Наконец, клиническая полезность требует, чтобы биомаркер был применим в клинической практике, то есть должно быть доказано, что использование биомаркера приводит к улучшению исхода и приносит реальную пользу пациентам [7]. Таким образом, одним из важнейших элементов установления клинической полезности является оценка результатов лечения пациентов, связанного с использованием разработанного прогностического биомаркера, путем сравнения с таковыми, основанными на стандарте оказания медицинской помощи без применения нового биомаркера.

Высокая **чувствительность и специфичность** являются важными характеристиками идеального биомаркера. Во-первых, перед клиническим использованием, если биомаркер предназначен для скрининга или прогностических целей, требуется доказать его специфичность (которая выражается как отношение правдоподобия) [9], желательно, чтобы коэффициент правдоподобия для скринингового теста превышал 10. Если биомаркер оценивается с точки зрения диагностических целей, то важнее становится высокая чувствительность. Во-вторых, важно знать референтные пределы [10] условной «нормы». Например, диагностические наборы для выявления тропонина крови, выпускаемые несколькими производителями, различны и имеют разные референтные пределы для выявления клинически важных событий, таких как острый инфаркт миокарда [10]. В-третьих, прежде чем биомаркер может быть использован клинически, необходимо понимать границы между нормальным уровнем, повышенным и действительно диагностическим уровнем или пороговым уровнем, требующим лечения. Для большинства маркеров превышение нормы еще не является отправной точкой для каких-либо

действий. Наконец, имеет значение калибровка биомаркера для конкретной выборки, где он будет использован (популяция пациентов, их возраст, пол, иногда даже время года и условия проживания).

Биомаркеры нередко представляют собой биохимические изменения на уровне тканей или органов, а не целого организма. Поэтому они связаны с биологическим или патологическим процессом, происходящим не системно, а локально. Однако клиническая интерпретация результатов измерения уровня таких биомаркеров может быть непростой. Например, повышение тропонина до определенной степени может присутствовать при застойной сердечной недостаточности, тромбоэмболии легочной артерии и классически при острой ишемии/инфаркте миокарда [11]. Соответственно, оценка биомаркера требует совмещения его уровня с клинической картиной и другими признаками. Более того, биомаркеры, предназначенные для использования в клинической практике, могут быть полезны, если изменения их уровней адекватно отражают улучшение самого процесса заболевания при лечении (прогностические биомаркеры), отражая тем самым улучшение исхода заболевания. Например, концентрация натрийуретического пептида в крови повышается с ухудшением состояния сердечной недостаточности и снижается при стабилизации состояния [12]. Кроме того, клинически полезный биомаркер должен быть способен предоставлять значимую информацию о прогнозе и/или направлять принятие врачебных решений, а не просто дублировать информацию, которая уже доступна клинически (например, на основании ЭКГ).

3. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОМАРКЕРОВ. РОЛЬ БИОБАНКОВ

Терапевтические области, где стратификация на подгруппы по биомаркерам с целью персонализированной медицины, как ожидается, войдет в практику в первую очередь, — это онкология, вторичные осложнения диабета, сердечно-сосудистые заболевания и нейродегенеративные заболевания. Не менее актуальными областями являются инфекции, аутоиммунные и аутовоспалительные заболевания, патология плода и беременности.

Развитие персонализированной медицины во многом зависит от идентификации и квалификации соответствующих биомаркеров в этих областях. К сожалению, лишь немногие исследования биомаркеров оказались достаточно мощными для выявления различий между генетическими вариантами и/или функцией продуктов их экспрессии. Кроме того, эти исследования часто имеют недостатки, ко-

торые по-прежнему создают сомнения в необходимости клинического использования генетических маркеров. Для обобщения имеющихся результатов и накопления необходимых знаний крайне важно выработать механизмы взаимодействия различных исследовательских коллективов, создать консорциумы, в том числе по персонализированной медицине, Интернет-ресурсы. Последние достижения в области омикс-технологий предоставили мощные инструменты для поиска новых биомаркеров, которые, в том числе, могут позволить предсказать реакцию на тот или иной лекарственный препарат. Но путь от идентификации нового биомаркера или их набора до разработки действительного и эффективного на практике биомаркера долг и труден.

Важными этапами для надежности биомолекулярного анализа являются сбор, хранение и транспортировка клинических образцов. Существует необходимость в стандартизации преаналитических процессов и наличии доступа к биологическим ресурсам (биобанкам), где образцы тщательно обрабатываются, хранятся и документируются. Кроме того, для профилирования образца необходима информация о пациентах и доступ к медицинским записям доноров биообразцов. Для поддержки доступности этих наборов данных требуется соответствующее программное обеспечение. Помимо ограничений в доступности информации, проблема заключается еще и в том, что биобанки предоставляют образцы для исследовательских проектов, которые изначально не были определены при заборе материала. Поэтому сегодня к биобанкам предъявляются столь высокие требования по надлежащей практике и стандартизации подготовки проб. Это дает возможность иметь универсальные коллекции, которые могут быть использованы для любого типа проектов. Именно такие универсальные биобанки с соблюдением всех этических и технологических норм и имеющие фенотипические данные по донорам образцов востребованы сегодня в мире, данная тенденция должна активно поддерживаться и в РФ. Биобанк НЦМУ «Центр персонализированной медицины», функционирующий на базе НМИЦ им. В. А. Алмазова Минздрава России, соответствует сегодня всем мировым стандартам и создан именно с такой целью — служить источником качественных данных для разработки и валидации новых биомаркеров.

4. СБОР, УПРАВЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ДАННЫХ В ОБЛАСТИ БИОМАРКЕРОВ

Персонифицированная медицина в значительной степени опирается на анализ многомерных

данных, в то время как объем медицинских данных, доступных в электронном виде во всем мире, резко возрастает. Однако эти данные генерируются в сложных формах и не всегда удобных для количественной обработки, а также записываются и хранятся различными способами. Несовместимость между исследовательскими базами данных, электронными медицинскими записями историй болезни и лабораторной информацией рождает проблемы систем управления медицинской информацией. Сегодня задача состоит в том, чтобы максимально упорядочить электронные данные и сделать их пригодными для исследований. В этом аспекте большую помощь оказывают открытые информационные ресурсы, где размещаются данные для выявления стратификационных биомаркеров и субанализа клинических исследований. Другая проблема заключается в том, что омиксные технологии генерируют сложные данные, равно как и фенотипирование, и технологии визуализации создают большое количество данных различного формата. Это приводит к неприменимости традиционных статистических методик и ведет к необходимости внедрения новых статистических методов для решения задач многосигнального и многокомпонентного анализа.

В настоящее время, как и для любого инновационного медицинского продукта или изделия, разработка биоанализов идет по пути, начинающемуся с фундаментальных исследований и переходящему к доклиническим и клиническим стадиям. Открытие новых биомаркеров чаще основывается на знаниях, полученных в результате фундаментальных исследований, проводимых в научных центрах и университетах. При этом фармацевтическая промышленность и производители диагностических тестов и оборудования являются важнейшими потребителями обнаруженных биомаркеров, что диктует необходимость более тесной интеграции между государственным и частным секторами в здравоохранении, между академической наукой и бизнесом.

Сегодня в мире в основном используются методы идентификации сигнатур экспрессии генов и применяются микрочипы ДНК в качестве высокопроизводительных анализов. Другие виды геномного анализа, такие как генотипирование одонуклеотидных полиморфизмов, проверка числа копий и дополнительные данные протеомного или метаболомного профилирования, также могут быть использованы для разработки геномных сигнатур, но применяются реже в связи с меньшей информативностью и низкой производительностью, а также сложностью интерпретации.

В исследовательских целях и для реализации крупных проектов, как правило, используются высокопроизводительные технологии, такие как чипы. При этом для клинических целей более логично использовать технологии с высокой точностью и удобством, а также с более низкой стоимостью. Классическим пример такого подхода является количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР). Большинство количественных ПЦР-анализов являются высокоспецифичными, чувствительными и надежными по сравнению с высокопроизводительными микрочипами, но могут измерять только небольшое количество генов одновременно в одном образце, в отличие от микрочипов. Это требует ограничения количества генов-кандидатов при переходе с платформы микрочипов на клиническую платформу. Все эти факторы и ведут к ограничению использования расчета полигенных рисков в клинической практике.

Стандартная стратегия разработки методики оценки геномных сигнатур заключается в том, чтобы тестировать их на устоявшихся клинических платформах, таких как ПЦР. Для того чтобы учесть возможное ограничение числа генов, которые могут быть исследованы при помощи ПЦР, наиболее часто используемым подходом является селекция небольшого числа релевантных генов из пула большого числа кандидатов генов, полученных в исследовании с применением микрочипов, а затем преобразование в клиническую платформу, чтобы построить предикторную генетическую шкалу на основе выбранных генов, используя данные, измеренные уже в реальных клинических условиях. Эта технология реализована сегодня в платформе Онкотип Dx, предназначенной для классификации риска рецидива рака молочной железы [13], и, например, Алломап для наблюдения за риском отторжения трансплантата после трансплантации сердца [14].

Наиболее популярным статистическим подходом к скринингу генов риска является применение нескольких методик тестирования, которые последовательно рассчитывают риски для каждого гена для проверки нулевой гипотезы об отсутствии связи с клиническим показателем. Существуют специальные статистические методики, позволяющие устранить эффекты множественных сравнений, ранжировать и отобрать гены на основе величины ассоциации или размеров эффекта. В дальнейшем происходит выбор заданного числа генов высшего ранга с наибольшими размерами эффекта, которые и включаются в клиническую платформу [15–16].

Прогресс в области биотехнологий позволил разработать новые высокопроизводительные платформы, в том числе и для клинического применения.

В качестве ранней попытки в этом направлении, при разработке сигнатуры MammaPrint для классификации риска рецидива рака молочной железы, был разработан специальный микрочип, позволяющий клинически применять систему прогнозирования, основанную на экспрессии 70 генов и 4 вычислительных методах на экспериментальной платформе микрочипов [17]. Позднее для идентификации опухолевой ткани [18] была разработана новая платформа микрочипов для измерения экспрессии почти 5000 генов. Эта платформа может работать с фиксированными формалином парафиновыми срезами биоптатов длительного хранения. Эти технологии устраняют имеющиеся ограничения в числе анализируемых генов и открывают новые возможности построения «отпечатков» (или сигнатур) конкретных патологий. Сложность оценки точности предсказания особенно важна, когда количество переменных-кандидатов (генов), включаемых в модель, значительно превышает количество образцов, доступных для анализа. Очень часто гены находятся в близких локусах, и для построения модели используются лишь гены, которые не обязательно имеют физиологический смысл. Если просто воспроизвести списки генов, которые найдены путем биологических механизмов и корреляционных исследований, то геномная сигнатура, как правило, получается ошибочной. Для прогностической точности необходима полностью конкретизированная геномная сигнатура, которая включает не только список генов компонентов, но также и математический алгоритм, а также оценку весов относительной важности генов и пороговых значений при проведении классификации [19]. Затем проводится внутренняя (на исследуемой выборке) и внешняя (на иной отличной выборке) проверка работы модели. Все описанное выше иллюстрирует развитие биоинформатики в области геномных данных и превращения их в полезные клинические маркеры, что находится сегодня в стадии активного изучения. Но даже применение самых современных алгоритмов не исключает последующей клинической валидации в исследованиях.

5. КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЗНАЧИМОСТИ БИОМАРКЕРА

Существует как минимум два типа клинических исследований, оценивающих роль биомаркеров и отличающихся по поставленной в них цели. Первый тип исследований нацелен на установление клинической полезности предлагаемого биомаркера (или геномной сигнатуры) путем сравнения со стандартом лечения без использования биомар-

кера. Другой тип исследований оценивает клиническую эффективность нового разрабатываемого лечения с применением прогностических биомаркеров или оценивает новое лечение в комплексе с прогностическим биомаркером.

Для каждого типа исследований принято использовать свой корректный дизайн. В первом случае производится рандомизация пациентов на два рукава — стратегию лечения на основе биомаркера и стратегию стандартного лечения. Таким образом, основная цель состоит в том, чтобы сравнить две стратегии с использованием биомаркера и без него при оценке эффективности лечения. Ярким примером может служить рандомизированное исследование рецидивирующего рака яичников, в котором сравнивалась стратегия лечения на основе анализа химиочувствительности опухоли (прогностического биомаркера) со стратегией использования выбора химиотерапии врачом на основе стандартной практики [20]. Другим примером является рандомизированное исследование немелкоклеточного рака легкого, в котором сравнивалась стратегия использования стандартного лечения (цисплатин + доцетаксел) с лечением, исключительно основанным на биомаркере, в котором пациентов с диагнозом резистентности к стандартному лечению, основанному на уровне биомаркера, лечили экспериментальным новым методом (гемцитабин + доцетаксел) [21]. При таком дизайне уровень биомаркера(ов) можно оценивать только у пациентов, рандомизированных в основную группу.

Возможны и более сложные модификации дизайна исследований, когда пациенты в контрольной группе подвергаются второй рандомизации для получения одного из тех же двух методов лечения, которые используются в рукаве, получающем лечение на основе биомаркеров, то есть контрольного и экспериментального лечения [22]. Такой сложный дизайн позволяет осуществить более точно клиническую валидацию биомаркера в качестве прогностического путем сравнения эффектов лечения между подмножествами пациентов, лечение которых было основано на биомаркерах.

Исследования, базирующиеся на описанной выше стратегии, в основном включают пациентов, получающих одинаковое лечение, как на основе биомаркеров, так и на основе стандартных рекомендаций, в результате чего требуется рандомизация очень большого числа пациентов, чтобы выявить, как правило, незначительную разницу по конечной точке между двумя рукавами. Этого можно избежать, если измерить уровень биомаркера у всех пациентов перед рандомизацией. Еще более усовершенствованным дизайном является метод обогащения,

который базируется на прогностическом биомаркере и сравнивает новое лечение и контрольное лечение только у биомаркер-позитивных пациентов, которые, как ожидается, будут реагировать на новое лечение на основе выявляемого биомаркера. Таким образом, дизайн обогащения оценивает эффективность лечения только в совокупности пациентов, имеющих биомаркер, а не во всей популяции пациентов. При таком дизайне пациенты должны первоначально пройти скрининг для оценки статуса биомаркера. Эффективность обогащения относительно стандартного подхода рандомизации всех пациентов без использования биомаркеров зависит от распространенности биомаркер-позитивных пациентов и от эффективности нового лечения у биомаркер-негативных пациентов [23]. В частности, когда менее половины пациентов являются биомаркер-позитивными, а новое лечение относительно малоэффективно у биомаркер-негативных пациентов, дизайн обогащения может потребовать гораздо меньшего числа рандомизированных пациентов. Такой дизайн был использован при разработке трастузумаба; когда больные раком молочной железы подвергались рандомизации только в том случае, если имели положительный HER2 при иммуногистохимическом тесте [23]. Такой дизайн оправдан в том случае, когда есть убедительные доказательства того, что пациенты с отрицательными биомаркерами не получают пользы от нового лечения и что их включение в исследование будет неэтичным. Кроме того, перед началом исследования биомаркер, используемый для обогащения, должен быть аналитически валидирован с установленной точностью анализа, воспроизводимостью и надежностью.

Когда нет убедительных биологических данных или данных более ранних исследований для биомаркера относительно его способности предсказывать эффекты лечения, то рекомендуется рандомизировать всех пациентов, но сразу предполагать выполнение субанализа по подгруппам [6]. Рандомизация может быть либо нестратифицированной, либо стратифицированной на основе уровня прогностического биомаркера. Стратификация может обеспечить то, что у всех случайно распределенных пациентов будет соблюден определенный статус биомаркера. Такие исследования могут продемонстрировать эффективность лечения либо для всей популяции, либо для подгруппы пациентов, имеющих конкретный биомаркер. В таких исследованиях может оцениваться один биомаркер или их совокупность. На первом этапе сравнивают лечение с контролем у пациентов с положительным биомаркером. На втором этапе сравнивают лечение по сравнению с контролем у пациентов с отсут-

ствием биомаркера. Этот последовательный подход позволяет избежать ошибок «первого порядка» в интерпретации данных. Для использования многомерных геномных данных применяются и более сложные дизайны исследований, которые предполагают перекрестное лечение и предварительное создание обучающей выборки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последние достижения в области биотехнологий и геномики стимулировали дальнейшие исследования биостатистических и биоинформационных методологий для разработки и валидации новых геномных биомаркеров или диагностических тестов, которые полезны для выбора правильного лечения для конкретных пациентов. Гетерогенность заболевания на основе геномных биомаркеров требует разработки новых принципов проектирования и анализа клинических исследований для оценки валидности и клинической полезности новых методов лечения и сопутствующих биомаркеров в направлении надежного персонализированного и прогностического анализа. Этот подход во многом определяет революции в мире клинических исследований, когда становится все меньше простых дизайнов с оценкой эффективности лечения по принципу «да или нет», а развивается наука о стратифицированных исследованиях, которые отвечают не на вопрос, помогает ли данное лечение или нет, а дают ответы на более сложные вопросы — кому и в каких условиях данное лечение поможет, а какой группе не поможет или будет даже вредным. В этом и проявляется реализация концепции персонализированной медицины.

Важно отметить, что разработка и валидация биомаркеров так же сложна и трудоемка, как разработка новых лекарств, и критически важна для развития персонализированной медицины. Процесс разработки включает фундаментальные исследования, доклиническую и клиническую стадии с организацией большого числа клинических исследований. Анализ валидности и точности биомаркеров требует особого дизайна исследований и специальных статистических подходов. Для того чтобы избежать смещения и некорректных выводов, дизайн исследований и конечные точки должны тщательно продумываться. К сожалению, нередко та польза, которую дает новый биомаркер, несопоставимо мала с затратами на его разработку и внедрение, что проявляется не очень высоким числом биомаркеров, доходящих до рутинной клинической практики, аналогично новым лекарствам. Тем не менее, именно наука о биомаркерах является основопола-

гающей во внедрении технологий персонализированной медицины и в ближайшее время принесет немало инноваций в здравоохранение.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Biomarkers and Surrogate Endpoints: Preferred Definitions and Conceptual Framework. Clin. Pharmacol. Ther. Mar 2001;69(3): 89–95.
2. Stratification biomarkers in personalized medicine. Summary report. European Commission, DG Research – Brussels, 10–11 June 2010.
3. Morrow DA, de Lemos JA. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. Circulation. 2007; 115:949–952.
4. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. J Natl Cancer Inst 2001; 93: 1054–1061.
5. Coupez D, Hulo P, Touchefeu Y, Denis MG, Bennouna J. KRAS mutations in metastatic colorectal cancer: from a de facto ban on anti-EGFR treatment in the past to a potential biomarker for precision medicine. Expert Opin Biol Ther. 2021;1325–1334. DOI: 10.1080/14712598.2021.1967318. Epub 2021 Aug 18. PMID: 34378483.
6. Simon R. Clinical trial designs for evaluating the medical utility of prognostic and predictive biomarkers in oncology. Personalized Medicine. 2010, vol. 7, no. 1, pp. 33–47.
7. Chau CH, Rixe O, McLeod H, Figg WD. Validation of analytic methods for biomarkers used in drug development. Clinical Cancer Research. 2008, vol. 14, no. 19, pp. 5967–5976.
8. Erickson HS. Measuring molecular biomarkers in epidemiologic studies: laboratory techniques and biospecimen considerations. Statistics in Medicine. 2012, vol. 31, no. 22, pp. 2400–2413.
9. Pencina MJ, D'Agostino Sr RB, D'Agostino Jr RB, Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. Stat Med. 2008; 27: 157–172.
10. Pencina MJ, D'Agostino Sr RB, Steyerberg EW. Extensions of net reclassification improvement calculations to measure usefulness of new biomarkers. Stat Med. 2011; 30: 11–21.
11. de Lemos JA, Drazner MH, Omland T, et al. Association of troponin T detected with a highly sensitive assay and cardiac structure and mortality risk in the general population. JAMA. 2010; 304: 2503–12.
12. Di Angelantonio, E, Chowdhury R, Sarwar N, Ray KK, Gobin R, Saleheen D, Thompson A, Gudnason V, Sattar N, Danesh J. B-type natriuretic peptides and cardiovascular risk: Systematic review and meta-analysis of 40 prospective studies. Circulation. 2009; 120, 2177–2187.
13. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. The New England Journal of Medicine. 2004, vol. 351, no. 27, p. 2817–2826.
14. Pham MX, Teuteberg JJ, Kfoury AG, et al. Geneexpression profiling for rejection surveillance after cardiac transplantation. The New England Journal of Medicine. 2010, vol. 362, no. 20, p. 1890–1900.
15. Pepe MS, Longton G, Anderson GL, Schummer M. Selecting differentially expressed genes from microarray experiments. Biometrics. 2003, vol. 59, no. 1, pp. 133–142.
16. Noma H, Matsui S. Empirical Bayes ranking and selection methods via semiparametric hierarchical mixture models in microarray studies. Statistics in Medicine, 2012.
17. van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ, et al. A geneexpression signature as a predictor of survival in breast cancer. The New England Journal of Medicine. 2002, vol. 347, no. 25, pp. 1999–2009.
18. Monzon FA, Lyons-Weiler M, Buturovic LJ, et al. Multicenter validation of a 1,550-gene expression profile for identification of tumor tissue of origin. Journal of Clinical Oncology. 2009, vol. 27, no. 15, pp. 2503–2508.
19. Simon R. The use of genomics in clinical trial design. Clinical Cancer Research. 2008, vol. 14, no. 19, pp. 5984–5993.
20. Cree IA, Kurbacher CM, Lamont A, et al. A prospective randomized controlled trial of tumour chemosensitivity assay directed chemotherapy versus physician's choice in patients with recurrent platinum-resistant ovarian cancer. Anti-Cancer Drugs. 2007, vol. 18, no. 9, pp. 1093–1101.
21. Cobo M, Isla D, Massuti B, et al. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. Journal of Clinical Oncology. 2007, vol. 25, no. 19, pp. 2747–2754.
22. Sargent DJ, Conley BA, Allegra C, Collette L. Clinical trial designs for predictive marker validation in cancer treatment trials. Journal of Clinical Oncology. 2005, vol. 23, no. 9, pp. 2020–2027.
23. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against her2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. The New England Journal of Medicine. 2001, vol. 344, no. 11, pp. 783–792.

Информация об авторах:

Конради Александра Олеговна, д.м.н., профессор, академик РАН, заместитель генерального директора ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России по научной работе, заведующий НИО артериальной гипертензии Института сердца и сосудов ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, заведующий кафедрой организации управления и экономики здравоохранения Института медицинского образования Центра Алмазова.

Author information:

Konradi Alexandra O., MD, Dr. Sc., Professor, Academician of the Russian Academy of Science, Deputy General Director for Research, Head of the Research Department of Arterial Hypertension, Head of the Department of Management Organization and Health Economics, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК [616.133.33+616.145.11/.13]-007.1

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ АРТЕРИОВЕНОЗНЫХ МАЛЬФОРМАЦИЙ

Рожченко Л. В., Дрягина Н. В.

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

Контактная информация:

Рожченко Лариса Витальевна,
РНХИ им проф. А. Л. Поленова — филиал
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Маяковского, д. 12, Санкт-Петербург,
Россия, 191014.
E-mail: rozhch@mail.ru

Статья поступила в редакцию 08.04.2022
и принята к печати 22.04.2022.

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Церебральные АВМ не являются статичными врожденными поражениями, а могут расти, рецидивировать и возникать de novo после полной резекции, эмболизации или радиохирургии. Понимание сложной молекулярной биологии АВМ имеет решающее значение для прогнозирования их поведения в процессе лечения и улучшения его результатов. **Цель исследования.** Провести изучение динамики факторов ангиогенеза в процессе эмболизации церебральных АВМ для разработки стратегии их персонализированного лечения. **Методы.** В исследование включены 314 пациентов с АВМ, получавших хирургическое лечение в отделении хирургии сосудов мозга РНХИ им. проф. А. Л. Поленова. Определяли уровень сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), ангиопоэтина-2 (ANG-2) и матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) в сыворотке крови до и через 24 часа после эндоваскулярной эмболизации с использованием иммуноферментного анализа (Personal Lab, Adaltis, Italy). **Результаты.** 48,4 % первичных пациентов с АВМ продемонстрировали повышение VEGF, MMP-9, ANG-2. Высокий уровень VEGF и MMP-9 демонстрировали АВМ III градации по Spetzler-Martin, АВМ с геморрагическим типом течения, с глубоким характером дренирования, с афферентами из наружной сонной артерии. Возвращение к контрольным значениям всех повышенных факторов роста после тотальной эмболизации является подтверждением отсутствия потенции к рецидивированию АВМ. Отсутствие снижения факторов ангиогенеза после радикальной, по ангиографическим критериям, эмболизации служит признаком субтотального выключения АВМ. Сформулирована персонализированная концепция эмболизации АВМ у пациентов с высоким риском роста и рецидивирования.

Ключевые слова: ангиогенез, факторы ангиогенеза, церебральная артериовенозная мальформация, эмболизация, ANG (ангиопоэтин), ENG (эндоглин), MMP (матриксная

металлопротеиназа), PDGF (тромбоцитарный фактор роста), SNP (одиночный нуклеотидный полиморфизм), TGF (трансформирующий фактор роста), VEGF (сосудистый эндотелиальный фактор роста).

Для цитирования: Рожченко Л.В., Дрягина Н.В. Персонализированный подход к лечению церебральных артериовенозных мальформаций. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(3):17-26. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-17-26

PERSONALIZED APPROACHES TO TREATMENT OF COMPLEX CEREBRAL ARTERIOVENOUS MALFORMATIONS

Rozhchenko L. V., Dryagina N. V.

Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery branch of the Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Rozhchenko Larisa V.,
Polenov Russian Scientific Research
Institute of Neurosurgery,
Mayakovsky str., 12, Saint Petersburg,
Russia, 191014.
E-mail: rozhch@mail.ru

Received 08 April 2022; accepted 22 April 2022.

ABSTRACT

Background. Cerebral AVMs are not static congenital lesions, but can grow, recur, and appear de novo after complete resection, embolization, or radiosurgery. Understanding the complex molecular biology of AVMs is critical to predicting their behavior during treatment and improving treatment outcomes. **Objective.** To study the dynamics of angiogenesis factors in the process of cerebral AVM embolization in order to develop a strategy for their personalized treatment. **Methods.** The study included 314 patients with AVM who received surgical treatment at the Department of Brain Vascular Surgery of the Polenov Neurosurgical Research Institute. Determined the level of vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin-2 (ANG-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in blood serum before and 24 hours after endovascular embolization using enzyme-linked immunosorbent assay (Personal Lab, Adaltis, Italy). **Results.** 48.4 % of primary patients with AVM showed an increase in VEGF, MMP-9, ANG-2. A high level of VEGF and MMP-9 demonstrated AVM III grades according to Spetzler-Martin, AVM with a hemorrhagic flow type, with a deep drainage pattern, with afferents from the external carotid artery. The return to control values of all elevated growth factors after total embolization confirms the lack of potency for AVM recurrence. The absence of a decrease in angiogenesis factors after radical, according to angiographic criteria, embolization is a sign of subtotal AVM shutdown. A personalized concept of embolization in patients with a high risk of growth and recurrence has been formulated.

Key words: angiogenesis, cerebral arteriovenous malformation, embolization, factors of angiogenesis, ANG (angiopoietin), AVM (arteriovenous malformation), ENG (endoglin), MMP (matrix metalloproteinase), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), SNP (single nucleotide polymorphism), TGF (transforming growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor).

For citation: Rozhchenko LV, Dryagina NV. Personalized approaches to treatment of complex cerebral arteriovenous malformations. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(3):17-26. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-17-26

Список сокращений: АВМ — артериовенозная мальформация, ANG — ангиопоэтин (angiopoietin), ENG — эндоглин (endoglin), HIF — гипоксией индуцированный фактор (hypoxia-inducible factor), MMP — матриксная металлопротеиназа (matrix metalloproteinase), PDGF — тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor), SNP — одиночный нуклеотидный полиморфизм, TGF — трансформирующий фактор роста (transforming growth factor), VEGF — фактор роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor).

ВВЕДЕНИЕ

Понимание необходимости изменения подходов к лечению пациентов с наиболее сложными и динамично развивающимися аномалиями сосудов головного мозга — церебральными артериовенозными мальформациями (АВМ) — обусловлено неутешительными результатами их хирургического лечения. С одной стороны, приводятся данные, свидетельствующие о низком риске разрыва АВМ IV–V градации по Spetzler-Martin до хирургического вмешательства — 2 % в год, который возрастает до 10,4 % в случае нерадикальных вмешательств, что определило отказ ряда авторов от попыток частичного выключения АВМ. Однако опыт долгосрочного наблюдения за пациентами с АВМ свидетельствует о том, что даже частичное выключение АВМ способствует улучшению долгосрочных показателей выживаемости. Речь идет не только о больших и гигантских церебральных АВМ, радикальное выключение которых из кровотока составляет только 13 %, при этом частота инвалидизации и смертности — 6,6 % [1–4]. АВМ является следствием диспластического метаморфоза сосудов, инициированного неизвестными факторами. До последнего времени бытовало представление о врожденном характере АВМ, но невысокая встречаемость в дет-

ской популяции (за исключением АВМ вены Галена), результаты генетических исследований, современные представления о морфогенезе сосудистой системы свидетельствуют об их наиболее вероятном приобретенном происхождении. Церебральные АВМ не являются статичными поражениями, а могут расти, рецидивировать и даже возникать de novo после полной резекции, эмболизации или радиохирургии, будучи динамическим объектом с постоянным ремоделированием сосудов, обусловленным неоангиогенезом, регулируемым хронической гемодинамической перестройкой, гипоксией и воспалением после вмешательства. Интранидальные сосуды АВМ подвергаются воздействию аномально высоких потоков крови, что приводит к активации молекулярных путей в эндотелиальных клетках, вызывая пролиферацию и ремоделирование сосудов АВМ. Основными биомаркерами, уровень которых изменялся у больных с АВМ, считаются: сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF-AE), ангиопоэтины (Ang 1-4) и металлопротеиназы (MMPs), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста (TGF- β). Именно сочетание нарушения баланса в выработке ангиопоэтинов и их рецепторов и повышение экспрессии VEGF, Ang-2 и MMP-9 обуславливают в АВМ непрерывный ангиогенный процесс. Высокий уровень экспрессии факторов коррелирует с биологической агрессивностью патологического процесса. Понимание сложной молекулярной биологии АВМ имеет решающее значение для определения и прогнозирования их поведения, разработки персонализированных методов лечения, улучшающих результаты эндоваскулярного и хирургического лечения.

Неоангиогенез начинается с локального разрушения стенки ранее существующего сосуда, активации пролиферации и миграции клеток эндотелия. Клетки эндотелия сливаются в трубчатые структуры, вокруг которых в дальнейшем формируются

стенки сосудов. Для понимания механизмов неоангиогенеза важно изучать процессы, регулирующие биологическую активность двух основных типов клеток: клеток эндотелия и перicyтов — клеток, формирующих стенки сосудов [5, 8, 9, 10]. Прекращение действия этих факторов возвращает эндотелиальные клетки в состояние покоя. Факторы роста связываются с их собственным специфическим рецептором («как ключ в замок») и запускают процессы регуляции роста, дифференцировки и экспрессии генов, а также апоптоз. Факторы роста разделяют на индукторы и ингибиторы ангиогенеза, последние в норме превалируют над индукторами. В результате во взрослом организме процесс ангиогенеза подавлен, и только 0,01 % эндотелиальных клеток способны к делению. Уменьшение синтеза ингибиторов или увеличение секреции индукторов приводит к стимуляции ангиогенеза [9].

АВМ представляет собой конгломерат артерий и вен, формирующих сеть прямых артериовенозных шунтов с высокой скоростью кровотока, не соединенных капиллярами. Согласно общепринятой гистопатологической концепции, АВМ — это очаг, в котором отсутствует истинное капиллярное ложе. Тем не менее, доказано наличие группы дилатированных капилляров, находящихся в непосредственной близости от АВМ (так называемых *giant bad capillaries*), диаметр которых в 10–25 раз превышает диаметр нормальных. Они связаны через артериолы и вены не только со структурами АВМ, но и с системой нормальной капиллярной сети, изменяя гемодинамику и приводя к ишемизации мозговой ткани. Вполне возможно, что эта anomальная капиллярная сеть является морфологическим резервом роста и рецидивирования АВМ. Клетки, культивируемые из хирургических образцов АВМ головного мозга, демонстрируют скорость пролиферации, которая в 1,8–6,4 раза превышает таковую в нормальных покоящихся цереброваскулярных эндотелиальных клетках и приближается к скорости роста эндотелиальных клеток в прогрессирующих опухолях [11].

Главным регулятором как физиологического, так и патологического ангиогенеза является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF — *Vascular endothelial growth factor*), стимулирующий рост и деление только эндотелиальных клеток. Не все клетки эндотелия реагируют на ангиогенный стимул VEGF в равной степени, для инициации ангиогенного разрастания отбираются лишь некоторые из клеток эндотелия (так называемые *tip-клетки*). При вырастании новых сосудов они занимают лидирующее положение: реагируют на градиент VEGF, задающий направление их миграции, и возглавляют продвижение растущего

капилляра [12, 13, 14]. Под действием ангиогенного стимула VEGF у *tip-клеток* кардинально меняется фенотип, они приобретают инвазивность и способность к перемещению, активируют поверхностные протеазы (MMP), разрушающие прилежащую базальную мембрану, что изменяет контактные взаимодействия между *tip-клетками* и окружающими клетками эндотелия. Отбор *tip-клеток* контролируется рецепторами семейства Notch и их трансмембранными лигандами Dll4 (*Delta like ligand 4*) [13]. VEGF, воздействуя на клетки эндотелия, активирует в них экспрессию Dll4 и его рецепторов Notch. При этом пролиферации самих *tip-клеток* в ответ на воздействие VEGF не происходит. Пониженные уровни экспрессии Dll4 или блокирование Notch-зависимого каскада сигнализации усиливают образование *tip-клеток*, приводящее к чрезмерному усилению локального ангиогенеза и к нарушению правильного формирования новых сосудов. Сверхэкспрессия VEGF вызывает чрезмерное развитие anomальных кровеносных сосудов с формированием АВМ. После того как отобраны и начали свое продвижение *tip-клетки*, вслед за ними начинают формироваться новые капилляры за счет пролиферации и миграции других клеток эндотелия (*stalk-клеток*), также стимулируемых VEGF. Таким образом, VEGF независимо контролирует миграцию двух различных субпопуляций клеток эндотелия: *tip-клеток* и *stalk-клеток*. Р. А. Murphy (2014) с соавторами получили данные о том, что белки, участвующие в передаче сигналов Notch, экспрессируются в удаленных во время операции церебральных АВМ [14]. Эндотелиальная сверхэкспрессия Notch-4 и его лигандов (*Jagged 1* и *2* — лигандов *stalk-клеток* и *Dll 1, 3, 4* — лигандов *tip-клеток*) приводит к образованию церебральных АВМ у мышей [6, 13, 14]. Усиление экспрессии лигандов Notch (*Jagged 1* и *2*) изменяет синтез маркеров артериального и венозного эндотелия (*Ephrin B2* и *Eph B4*) в сосудах экспериментальных АВМ. Это приводит к нарушению специфичности эндотелиальных клеток (артериальных и венозных) при образовании АВМ [15]. Таким образом, Notch и его лиганды участвуют в патогенезе церебральных АВМ несколькими способами: 1) усиление ангиогенеза; 2) ухудшение конструкции стенки сосуда; 3) изменение артериальной и венозной специфичности эндотелиальных клеток. В регуляции сложных взаимодействий между эндотелием и окружающими клетками принимает участие еще одна сигнальная система — экспрессируемый клетками эндотелия тирозинкиназный рецептор TIE2 и его лиганды ангиопоэтины (ANG 1 и 2) [10, 11]. TIE2/ANG1-зависимый каскад сигнализации обеспечивает ассоциацию перicyтов и эндотелия, уменьшает проницаемость сосудов

и тем самым стабилизирует находящуюся в процессе созревания сосудистую систему [10]. Подавление ангиопоэтином-2 каскада передачи сигнала через рецептор TIE2 ингибирует приток перицитов, нарушает созревание сосуда и придает сосудам гиперчувствительность к стимулирующему действию VEGF. В периваскулярной области вокруг церебральных АВМ наблюдается его сверхэкспрессия, обеспечивающая формирование аномально расширенных сосудов без зрелой структуры стенок. Выявлено, что в церебральных АВМ уровень ANG-1 на 30 % ниже нормы, в то время как концентрация мРНК ANG-2 на 40 % выше по сравнению с контролем [11]. Важным звеном в передаче сигналов VEGF и ANG-2, способствующим ангиогенному разрастанию и разрыву АВМ, являются матриксные металлопротеиназы (ММР). Это протеолитические ферменты, которые деградируют перицеллюлярные вещества и базальную мембрану, запуская процесс ангиогенеза. Экспрессия ММР-9 выше в церебральных АВМ, чем в контрольной ткани [16]. Starke и соавторы [7] обнаружили, что уровни ММР-9 в крови у больных с АВМ, рвавшимися до операции, были значительно выше по сравнению с АВМ без разрыва и значимо увеличивались сразу после операции. Одиночные нуклеотидные полиморфизмы ММР-9 и тканевого ингибитора ММР-4 (ТИМР-4) также связаны с повышенным риском разрыва АВМ головного мозга. Это было продемонстрировано у пациентов с АВМ, которым проводился анализ генотипирования [16]. Исследования на животных показывают, что либо коррекция сигналов Notch [4], либо увеличение экспрессии PDGF [6] восстанавливают аномальную сосудистую структуру АВМ, следовательно, путем модуляции этих двух путей можно будет разрабатывать новые методы лечения АВМ [17]. На основании анализа склонности к неоангиогенезу АВМ у каждого конкретного пациента должна быть разработана персонализированная стратегия ее лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В отделении хирургии сосудов мозга РНХИ им. проф. А. Л. Поленова в образцах крови 314 оперированных пациентов с церебральными АВМ и 33 здоровых добровольцев проводилось изучение уровня сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), ангиопоэтина-2 (ANG-2) и матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9). Всем пациентам проводилась эндоваскулярная эмболизация церебральных АВМ с использованием клеевой (гистоакрил) и неадгезивной композиции (ONYX), эмболизации осуществлялись как из трансартериального, так и из трансвенозного доступа, проведено от 2 до 7

этапов внутрисосудистого лечения. Средний возраст пациентов составил $34,1 \pm 1,4$ года (от 18 до 64 лет), а здоровых добровольцев $33,9 \pm 2,5$ года (от 25 до 52 лет). Оценка первичного ангиогенного статуса (уровней ANG-2, VEGF и ММР-9) проводилась перед оперативным лечением (в день операции) и в динамике через 1 сутки после проведения эндоваскулярного вмешательства. Кровь пациентов забиралась из вены натошак в вакуумную пробирку с активатором свертывания, центрифугировалась при 2700 об/мин в течение 20 минут, затем сыворотка после аликвотирования отправлялась на хранение при температуре -20°C до исследования. Исследование концентрации VEGF, ANG-2 и ММР-9 проводилось на иммуноферментном анализаторе планшетного типа Personal Lab, Adaltis (Италия). Для определения VEGF использовались тест-системы Invitrogen (США), а для ММР-9 и Ang-2 применялись тест-системы R&D Systems (США). Для каждой тест-системы производитель в инструкции предложил референсные значения, полученные при исследовании крови 60 здоровых добровольцев. Нами для 33 здоровых добровольцев определены уровни VEGF — $271,2 \pm 41,1$ пг/мл, ММР-9 — $432,5 \pm 48,4$ нг/мл и Ang 2 — $2197,7 \pm 273,9$ пг/мл. Эти данные совпали с диапазоном референсных значений, полученных производителем тест-систем у здоровых добровольцев. Эти значения приняты нами в качестве контрольных. Факт превышения уровня факторов ангиогенеза в крови определялся по выходу пределов стандартного отклонения от результатов, полученных в группе здоровых добровольцев.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средний уровень VEGF в сыворотке крови больных с церебральными АВМ до проведения оперативного вмешательства составил $349,0 \pm 22,9$ пг/мл; ММР-9 — $596,3 \pm 30,4$ нг/мл и ANG-2 — $2971,4 \pm 80,0$ пг/мл. Повышенный уровень хотя бы одного из исследованных факторов ангиогенеза выявлен у 152 (48,4 %) из 314 пациентов с АВМ, у остальных пациентов до операции все уровни факторов ангиогенеза не отличались от показателей у здоровых добровольцев. Повышение уровня VEGF обнаружено у 48 % (у 151 из 314 больных) и сохранение показателя в пределах контрольных значений у 163 пациентов, повышение уровня ММР-9 выявлено у 147 (46,8 %) пациентов, а повышение ANG-2 отмечено у 126 (40,1 %) больных. Не обнаружено связи повышения уровня факторов ангиогенеза с полом, возрастом, наличием сопутствующей патологии, локализацией АВМ (супра- и субтенториально расположенных). Эпилептический тип течения АВМ

демонстрировали 119 пациентов, кровоизлияния из АВМ выявлены у 172 пациентов, у 23 пациентов АВМ обнаружены при обследовании по поводу головной боли. Проанализирована связь между клиническим типом течения АВМ и уровнем факторов ангиогенеза. У 102 (59,3 %) из 172 пациентов с геморрагическим типом течения уровень VEGF и MMP-9 повышен (табл. 1).

Анализу подвергнуты 152 первичных (ранее не оперированных) пациента, у которых выявлены до операции повышенные факторы ангиогенеза. В этой группе пациенты распределились следующим образом: 12 (7,9 %) больных с небольшими АВМ (Spetzler-Martin I–II), 98 (64,5 %) пациентов с АВМ III градации по Spetzler-Martin и 42 (27,6 %) больных с АВМ IV–V градации (табл. 2).

Из таблицы 2 следует, при III градации отмечаются наибольшие значения как VEGF, так и MMP-9, что свидетельствует о наибольшем потенциале роста АВМ у пациентов именно этой градации АВМ. В группах с небольшими АВМ (Spetzler-Martin I–II) и с большими и гигантскими АВМ (Spetzler-Martin

IV–V) количество пациентов с повышенным уровнем VEGF было сопоставимым, в то время как уровень MMP-9 у больных с градацией Spetzler-Martin IV–V был выше, чем в группе с небольшими АВМ. В то же время у 19 (45,2 %) из 42 пациентов с большими и гигантскими АВМ (Spetzler-Martin IV–V) был выявлен повышенный уровень ANG-2, что оказалось почти в два раза чаще, чем у больных с небольшими АВМ (Spetzler-Martin I–II) — у 3 (25 %) из 12 пациентов. Эти данные согласуются с результатами, обнаруженными при анализе структуры дренирования АВМ: повышенный уровень ANG-2 отмечен у 40,7 % пациентов с наиболее часто встречающимся при больших и гигантских АВМ глубоким типом венозного дренирования.

Проведен анализ динамики факторов ангиогенеза после каждого этапа операции в отдельности, в зависимости от выбранного эмболизата. В этой группе 49 АВМ были тотально эмболизированы (результат достигался за 1–7 этапов операции), у 103 больных мальформации выключены частично. Эмболизация АВМ с использованием неадгезивной

Таблица 1. Уровень VEGF у больных с церебральными АВМ в зависимости от типов течения заболевания

Типы клинического течения	Число больных	VEGF, пг/мл
		Средний уровень $M \pm m$
Геморрагический	172	403,0 $\pm$ 42,3
Эпилептический	119	365,4 $\pm$ 33,8
Псевдотуморозный	23	373,5 $\pm$ 107,1
Итого	314	370,3 $\pm$ 22,9

Примечание: М — среднее значение показателя, m — ошибка среднего значения показателя

Таблица 2. Изменение количественных показателей ангиогенных факторов у больных с АВМ в зависимости от градации Spetzler-Martin

S-M	Число больных	VEGF	MMP-9	ANG-2
		$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
I–II градации	12	324,4 $\pm$ 45,2	348,1 $\pm$ 46,0	2391 $\pm$ 106,0
III градация	98	397,2 $\pm$ 34,3	490,9 $\pm$ 29,2	2577,6 $\pm$ 84,3
IV–V градации	42	337,9 $\pm$ 42,1	447,4 $\pm$ 48,3	2955,8 $\pm$ 94,7
Итого	152	370,3 $\pm$ 22,9	451,8 $\pm$ 22,4	2636,5 $\pm$ 80,0

Примечание: М — среднее значение показателя, m — ошибка среднего значения показателя

композиции (оникс) произведена 84 (55,3 %) из 152 пациентов; с применением клеевой композиции (гистоакрила) оперированы 68 (44,7 %) больных.

В группе больных, которым произвели эмболизацию ониксом, у 9 (10,7 %) из 84-х в результате операции за один этап достигнуто тотальное выключение АВМ. При этом после операции наблюдалось снижение всех повышенных уровней факторов ангиогенеза до уровня контрольных значений. После частичного выключения АВМ у 71 пациента отмечалось дальнейшее повышение уровня VEGF у 24 (33,8 %) из них, а у 47 больных повышенный уровень после операции не продолжал увеличиваться. Дальнейший рост повышенного уровня MMP-9 выявлен у 28 (39,4 %) из 71 больного, у 43 оставался на прежнем уровне, и дальнейший рост повышенного уровня ANG-2 наблюдался у 13 (18,3 %) пациентов, в 58 случаях оставался практически неизменным. Таким образом, после каждого этапа частичной эмболизации АВМ ониксом, дальнейший рост повышенных до операции одного или нескольких факторов ангиогенеза отмечен у 52 (77,7 %) из 71 пациента.

Тотальная эмболизация гистоакрилом за один этап выполнена 4 (5,9 %) из 68 пациентов, возвращение уровня всех факторов ангиогенеза к контрольным значениям после операции также была получена. После каждого этапа эмболизации АВМ гистоакрилом отмечено дальнейшее нарастание уровня повышенных факторов ангиогенеза: VEGF у 19 (29,7 %) из 64 больных продолжал повышаться, у 45 пациентов оставался практически на дооперационном уровне, ANG-2 продолжал расти лишь у 8 (12,5 %) из 64 больных. А вот среди пациентов с повышенным до операции уровнем MMP-9 превышение дооперационного уровня MMP-9 после операции получено у 45,3 % (у 29 из 64 больных). Таким образом, после эмболизации гистоакрилом продолжался рост повышенных до операции одного или нескольких факторов ангиогенеза у 56 (87,5 %)

из 64 пациентов. То есть наибольшую склонность к повышению после операции, вне зависимости от эмболизата, продемонстрировал MMP-9, что при эмболизации АВМ гистоакрилом выявляется более отчетливо.

Проанализированы результаты тотальной эмболизации церебральных АВМ у 49 больных с базовым повышением уровня одного или нескольких факторов роста, выявленным до первой операции. Среди них 24 (49 %) больных имели АВМ I–II градации по Spetzler-Martin, 23 пациента (46,9 %) имели АВМ III градации по Spetzler-Martin и 2 больных (4,1 %) — IV градации по Spetzler-Martin. В таблице 2 представлены уровни факторов ангиогенеза в зависимости от радикальности проведенной эмболизации АВМ.

Результаты выполненных исследований позволили распределить когорту прооперированных больных на 3 группы: 1) с тотально выключенной в результате эмболизации за один этап АВМ и уровнем VEGF, вернувшимся к контрольным значениям (13 пациентов); 2) с тотально выключенной в результате эмболизации за 2–7 этапов АВМ и нормализовавшимся уровнем VEGF (30 пациентов); 3) с отсутствием нормализации VEGF после выполнения эмболизации АВМ (6 пациентов).

У 13 из 49 пациентов с АВМ, тотально выключенной за 1 этап (1), уровень VEGF статистически достоверно снижается ($p < 0,001$). У 30 из 49 пациентов с АВМ, тотально выключенной за 2–7 этапов (2), уровень VEGF после тотальной эмболизации также снижается ($p < 0,05$); в этой группе сравнивались уровни факторов ангиогенеза до начала лечения с уровнями тех же факторов после тотальной эмболизации. В третьей группе (6 пациентов с АВМ III–IV градации по Spetzler-Martin), ангиографически тотально эмболизированных АВМ, уровень VEGF несколько нарастает. Отсутствие заполнения АВМ при контрольной ангиографии сразу после операции не всегда свидетельствует о действитель-

Таблица 3. Изменение уровня факторов ангиогенеза в зависимости от радикальности эмболизации

Радикальность эмболизации	абс	VEGF	MMP-9	ANG-2
		М ± m	М ± m	М ± m
Тотальная	49	192 ± 32,3	360,9 ± 59,2	2471 ± 112,8
Частичная	103	309,6 ± 26,3	730,1 ± 51,1	2785 ± 148,8
Итого	152	299,7 ± 24,5	696,9 ± 48,6	2617,6 ± 130,6

Примечание: М — среднее значение показателя, m — ошибка среднего значения показателя

но радикальном выключении АВМ из кровотока из-за возможности спазма сосудов в ответ на раздражение эмболизатом, наличия ангиографически негативного, скрытого компартмента АВМ. При дальнейшем анализе выявлено, что у этих больных говорить о тотальной эмболизации АВМ не приходится, так как при контрольной ангиографии, выполненной через 5–8 месяцев после операции, отмечается остаточное заполнение АВМ, потребовавшее повторной эмболизации. Таким образом, если на послеоперационной ангиографии мы не видим контрастирования АВМ, а уровень VEGF после операции остается повышенным, это свидетельствует о нерадикальном выключении АВМ, а отсутствие нормализации VEGF после эмболизации может являться критерием нерадикального выключения АВМ. Такие результаты требуют в обязательном порядке выполнения контрольной ангиографии через полгода после операции для оценки заполнения АВМ и проведения доэмболизации остаточного фрагмента мальформации. Обязательность верификации полноценности выключения АВМ диктуется высоким риском развития внутричерепного кровоизлияния из нерадикально выключенной АВМ.

Таким образом, выявление АВМ, склонных к росту и повышенному риску кровоизлияний, является важным звеном в формировании персонализированной тактики хирургического лечения (выбор метода — эмболизация или удаление, частота повторных этапов госпитализации для хирургического лечения, индикация достоверности радикальности выключения АВМ). У всех пациентов с гиперэкспрессией факторов роста обнаружены ангиографические признаки образования новой патологической сосудистой сети АВМ после частичной эмболизации. Нормализация всех повышенных факторов роста после тотальной эмболизации является подтверждением отсутствия потенции к рецидивированию АВМ. После исследования базового уровня факторов ангиогенеза их сравнивают с послеоперационными данными. При выявлении повышенных уровней факторов ангиогенеза можно прогнозировать риск кровоизлияния в послеоперационном периоде и возможность роста АВМ между этапами эмболизации. Продолжение изучения молекулярных механизмов роста АВМ на фоне проводимого лечения позволило сформулировать персонализированную концепцию эмболизации, показания и противопоказания, определить необходимую частоту проведения очередных этапов вмешательства, а также выбор эмболизата. Сочетание всех изучаемых технологических решений при эмболизации церебральных АВМ с детализацией биологических особенностей мальформации (вы-

явление АВМ, склонных к росту или рецидивированию) позволит создать оптимальную стратегию хирургического лечения АВМ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Частичная эмболизация не снижает риска кровоизлияний, он остается равным 3 % в год. Реваскуляризация и реканализация АВМ после эмболизации отмечается в 12 % в течение первого года. Стойкие неврологические нарушения после эмболизации возникают у 12,8–25 % больных (легкие нарушения — в 72 %, стойкие выпадения — в 18 %), летальный исход — в 1,6–8 % случаев. Внедрение в клиническую практику неадгезивных эмболизирующих композиций (ONYX) и специальных технологий для их введения способствовало повышению радикальности внутрисосудистых вмешательств до 51–94 % [5]. Повышению радикальности эндоваскулярных эмболизаций АВМ, созданию персонализированной тактики их проведения и посвящено наше исследование.

Из 152 пациентов с повышенными до операции факторами ангиогенеза 98 (64,5 %) имели АВМ III градации по Spetzler-Martin. Наиболее вероятно, что именно эта часть АВМ склонна к дальнейшему росту, так как сверхэкспрессия VEGF вызывает чрезмерное развитие аномальных кровеносных сосудов с нарушением специфичности эндотелиальных клеток (артериальных и венозных) и ухудшением конструкции стенки сосуда при образовании АВМ. В группах с небольшими АВМ (Spetzler-Martin I–II) и с большими и гигантскими АВМ (Spetzler-Martin IV–V) число пациентов с повышенными VEGF, MMP-9 был сопоставимым. В то же время почти в 2 раза чаще — у 45,2 % больных — выявлялся повышенный уровень ANG-2 при больших и гигантских АВМ (Spetzler-Martin IV–V), по сравнению с 25 % пациентов с небольшими АВМ (Spetzler-Martin I–II). Именно для пациентов с гигантскими мальформациями характерно наличие нескольких расширенных венозных дренажей, осуществляющих венозный отток в глубокие вены мозга. Полученные данные подтверждают, на наш взгляд, тот факт, что в периваскулярной области вокруг больших и гигантских церебральных АВМ обнаружена сверхэкспрессия ANG-2, обеспечивающая формирование аномально расширенных вен без зрелой структуры стенок.

Все же наиболее интересными явились результаты оценки показателей ангиогенного статуса в зависимости от радикальности проведенных эндоваскулярных вмешательств. Частичная эмболизация АВМ, независимо от эмболизата, ведет к даль-

нейшему повышению уровня MMP-9 у больных с большими и гигантскими АВМ, уровень VEGF у трети больных во всех группах по Spetzler-Martin продолжает нарастать, повышенный уровень ANG после операции повышается незначительно. Наличие феномена послеоперационного роста АВМ после частичной эмболизации объясняется, с одной стороны, наличием ангиографически негативного, скрытого компартмента АВМ, с другой стороны, тем, что у половины больных с АВМ существуют генетически предрасположенные механизмы роста, приводящие к образованию новых сосудов, активно принимающих участие в возобновлении кровоснабжения мальформации. Проведение тотальной эмболизации АВМ приводило к обратному результату: больных с повышенными показателями ангиогенных факторов после тотальной эмболизации вообще не было. Всем пациентам с тотально эмболизированными АВМ выполнена контрольная ангиография через 6–11 месяцев после завершения лечения, подтвердившая радикальность выключения АВМ. У 6 пациентов при послеоперационной ангиографии мы выявили полностью выключенную АВМ, а уровень VEGF через сутки после операции остался повышенным. При выполнении контрольной ангиографии через полгода обнаружено остаточное функционирование мальформации, потребовавшее еще одного этапа эмболизации. Таким образом, отсутствие нормализации факторов ангиогенеза после эмболизации может являться критерием нерадикального выключения АВМ. При выявлении повышенных уровней факторов ангиогенеза можно прогнозировать риск кровоизлияния в послеоперационном периоде и возможность роста АВМ между этапами эмболизации. На основании полученных данных нами формулируется персонифицированная коррекция плана эндоваскулярного и микрохирургического лечения АВМ (объем эмболизации, выбор эмболизата, необходимость открытого удаления АВМ и радиохирургического лечения), оценка радикальности выключения их из кровотока. Нормализация всех повышенных факторов роста после тотальной эмболизации является подтверждением отсутствия потенции к рецидивированию АВМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Продолжение изучения молекулярных механизмов роста АВМ на фоне проводимого лечения позволит сформулировать персонифицированный подход к эмболизации, показания и противопоказания, определить необходимую частоту проведения очередных этапов вмешательства, а также выбор эмболизата. Наши результаты подтверждают зна-

чимость роли ангиогенеза в патофизиологии АВМ головного мозга, так как дисбаланс факторов роста способствует прогрессированию и росту мальформаций. Сочетание всех изучаемых технологических решений при эмболизации церебральных АВМ с детализацией биологических особенностей мальформации (выявление АВМ, склонных к росту или рецидивированию) позволит создать оптимальную стратегию хирургического лечения АВМ, что делает возможным осуществление самых амбициозных и перспективных научных проектов в современной сосудистой нейрохирургии.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Novakovic RL, Lazzaro MA, Castonguay AC, Zaidat OO. The diagnosis and management of brain arteriovenous malformations. *Neural Clin.* 2013; 31:749–763.
2. Amin-Hanjani S: ARUBA results are not applicable to all patients with arteriovenous malformation. *Stroke.* 2014; 45:1539–1540.
3. Parfenov V, Svistov D, Eliava SH, et al. Clinicheskie rekomendacii po diagnostike i lecheniu arteriovenozni malformaci centralyi nervnoi sistemi. *Associacia neurochirurgov Rossii. Moskva.* 2014. P. 47. In Russian [Парфенов В.Е., Свистов Д.В., Элиава Ш.Ш. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению артериовенозных мальформаций центральной нервной системы. Ассоциация нейрохирургов Российской Федерации. Москва, 2014. С. 47.]
4. Goroshchenko SA, Petrov AE, Rozhchenko LV, Samochernykh KA. Endovascular embolization of high-flow arteriovenous fistulae with non-adhesive agents in the structure of cerebral arteriovenous malformations on the background of adenosine-induced cardioplegia *Zhurnal Voprosy Neirokhirurgii Imeni N. N. Burdenko.* 2020; 84(3): 21–27.
5. Rangel-Castilla L, Russin JJ, Martinez-Del-Campo E. Molecular and cellular biology of cerebral arteriovenous malformations: a review of current concepts and future trends in treatment. *Neurosurg Focus.* 2014; 37(3):1–17.
6. Zhang R, Zhu W, Su H. Vascular Integrity in the Pathogenesis of Brain Arteriovenous Malformation. // *Acta Neurochir Suppl.* 2016; 21:29–35.
7. Starke RM, Komotar RJ, Hwang BY. Systemic expression of matrix metalloproteinase-9 in patients with cerebral arteriovenous malformations. *Neurosurgery.* 2010; 66: 343–348.

8. Moftakhar P, Hauptman JS, Malkasian D, Martin NA. Cerebral arteriovenous malformations. Part 1: cellular and molecular biology. *Neurosurg Focus*. 2009; 26(5): 32–39.

9. Karamysheva AF. The Mechanisms of angiogenesis. *Biochimia*. 2008; 73(7): 751–762. In Russian [Карамышева А.Ф. Механизмы ангиогенеза. *Биохимия*. 2008; 73(7): 751–762.]

10. Chen W, Choi E, McDougall M. Brain Arteriovenous Malformation Modeling, Pathogenesis, and Novel Therapeutic Targets. *Translational Stroke Research*. 2014;5(3): 316–329.

11. Hashimoto T, Lam T, Boudreau NJ, Bollen A, Lawton MT, Young W. Abnormal Balance in the Angiopoietin-Tie2 System in Human Brain Arteriovenous Malformations. *Circulation Research*. 2011; 89:111–113.

12. Kim H, Marchuk DA, Pawlicowska L. Genetic considerations relevant to intracranial hemorrhage and brain arteriovenous malformation. *J. of clinical neurosci.* 2014;21(11):1866–1871.

13. Couquet C, Maizeroi-Eugène F, Bresson D. Development of an angiogenesis animal model featuring brain arteriovenous malformation histological characteristics. *J. of NeuroInterventional Surgery*. 2017; 9(2):204–210.

14. Murphy PA, Kim TN, Huang L. Constitutively active Notch4 receptor elicits brain arteriovenous malformations through enlargement of capillary-like vessels. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2014;111(50):18007–18012.

15. Herbert SP, Huiskens J, Kim TN. Arterial-venous segregation by selective cell sprouting: an alternative mode of blood vessel formation. *Science*. 2009; 326(5950):294–298.

16. Bicer A, Guclu B, Ozkan A. Expressions of angiogenesis associated matrix metalloproteinases and extracellular matrix proteins in cerebral vascular malformations. *J Clin Neurosci*. 2010;17:232–236.

17. Самочерных К.А. Артериовенозные мальформации полушарий большого мозга у детей (вопросы диагностики и результаты хирургического лечения). Автореф. дис. канд. мед. наук/Санкт-Петербург, 2002.

Информация об авторах:

Рожченко Лариса Витальевна, к.м.н., старший научный сотрудник, заведующий НИЛ хирургии сосудов головного и спинного мозга РНХИ им. проф. А. Л. Поленова — филиала ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Дрягина Наталья Владимировна, к.м.н., заведующий клинико-диагностической лабораторией с экспресс-группой РНХИ им. проф. А. Л. Поленова — филиала ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Rozhchenko Larisa V., PhD, Chief of Research Laboratory of Surgery of the vessels of the brain and spinal cord Polenov research neurosurgical institute — branch of Almazov National Medical Research Centre.

Dryagina Natalia V., PhD, Head of the clinical diagnostic laboratory with an express group Polenov research neurosurgical institute — branch of Almazov National Medical Research Centre.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 615.03:616-005.6

ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ КАК ЭЛЕМЕНТ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ В РЕАЛЬНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Бартенева А. С., Воробьева Н. А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Архангельск, Россия

Контактная информация:

Воробьева Надежда Александровна,
ФГБОУ ВО «Северный государственный
медицинский университет» Минздрава
России,
Троицкий пр., д. 51, Архангельск, Россия,
163000.
E-mail: nadejdav0@gmail.com

Статья поступила в редакцию 10.04.2022
и принята к печати 26.04.2022.

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Доказано, что пациенты с тромбозами и высоким риском системных тромбозомболических осложнений (ТЭО), включая пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий (ФП), должны получать эффективную и безопасную антитромботическую терапию [1–3]. Персонализированный подход к продленной терапии ПОАК и АВК ассоциирован с улучшением гемостазиологических маркеров тромбинемии и клинических исходов у пациентов с ВТЭ и неклапанной ФП [4–8]. **Материалы и методы.** Проведено проспективное исследование на базе регионального центра антитромботической терапии (РЦАТТ) Архангельской области «Первой городской клинической больницы им. Е. Е. Волосевич» (ГБУЗ АО ПГКБ). Объект исследования — пациенты, входящие в регистр терапии АВК, обратившиеся в РЦАТТ (n = 107), которым проведено фармакогенетическое тестирование (определение генотипа CYP2C9, CYP4F2, VKORC1) с расчетом индивидуальных доз варфарина, оценкой качества жизни с использованием валидизированных опросников. Проведен анализ эффективности и безопасности варфаринотерапии. **Результаты.** Установлено, что осложнения варфаринотерапии развились вне зависимости от присутствия генотипа (CYP2C9, CYP4F2, VKORC1) и алгоритма дозирования варфарина в условиях наблюдения в АК. Показано, что при условии наблюдения в АК фармакогенетическое тестирование у пациентов с ВТЭ и ФП является дополнительным методом. **Заключение.** Персонализированный подход к продленной терапии АВК с использованием фармакогенетического тестирования целесообразен для пациентов старшей возрастной группы, пациентов с отягощенным геморрагическим анамнезом, частыми малыми кровотечениями при целевых значениях МНО и наличии сопутствующей терапии ингибиторами цитохромов P450.

Ключевые слова: антагонисты витамина К, варфарин, генотип, тромбоз глубоких вен, фармакогенетическое тестирование.

Для цитирования: Бартенева А.С., Воробьева Н.А. Фармакогенетическое тестирование как элемент персонифицированной медицины в реальной клинической практике. *Российский журнал персонализированной медицины*. 2022;2(3):27-37. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-27-37

PHARMACOGENETIC TESTING AS AN ELEMENT OF PERSONALIZED MEDICINE IN REAL CLINICAL PRACTICE

Barteneva A. S., Vorobyeva N. A.

Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia

Corresponding author:

Vorobyeva Nadezda A.,
Northern State Medical University,
Troitskiy Ave., 51, Arkhangelsk, Russia,
163000.
E-mail: nadejdav0@gmail.com

Received 10 April 2022; accepted
26 April 2022.

ABSTRACT

Introduction. It has been proven that patients with thrombosis and with a high risk of systemic thromboembolic complications (TEC), including patients with non-valvular atrial fibrillation (AF) should receive effective and safe antithrombotic therapy [1–3]. A personalized approach to prolonged AVK therapy is associated with an improvement in hemostasiological markers of thrombinemia and clinical outcomes in patients with VTE and non-valvular AF [4–8]. **Materials and methods.** Prospective study was carried out on the basis of the anticoagulant clinic (AC) of the Department of hemostasis and atherothrombosis laboratory of the state budgetary health institution of the Arkhangelsk region “First city clinical hospital named after names E. E. Volosevich” (GBUZ AR FCCH). The object of the study is patients of the AVK registry who applied to the RCATT (n = 107) who underwent pharmacogenetic testing (CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 genotype) with calculation of individual doses of warfarin and assessment of quality of life using validated questionnaires. The analysis of the effectiveness and safety of warfarin therapy was carried out. **Results.** It was found that complications of warfarin therapy developed regardless of the presence of the genotype (CYP2C9, CYP4F2, VKORC1) and the warfarin dosing algorithm under observation in AC. It has been shown that pharmacogenetic testing in patients with VTE and AF is an additional method under the condition of observation in AC. **Conclusion.** A personalized approach to prolonged VKA therapy using pharmacogenetic testing is appropriate for patients of the older age group, patients with a aggravated hemorrhagic history, frequent minor bleeding at target INR values and the presence of concomitant therapy with cytochrome P450 inhibitors.

Key words: deep vein thrombosis, genotype, pharmacogenetic testing, vitamin K antagonists, warfarin.

For citation: Barteneva AS, Vorobyeva NA. Pharmacogenetic testing as an element of personalized medicine in real clinical practice. *Russian Journal for Personalized Medicine*. 2022;2(3):27-37. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-27-37

Список сокращений: АВК — антагонисты витамина К, АК — антикоагулянтный кабинет, ВТЭ — венозный тромбозмблизм, МНО — международное нормализованное отношение, РЦАТТ — региональный центр антитромботической терапии, СГ — стандартная группа, ТЭЛА — тромбозмболия легочных артерий, ТЭО — тромбозмболические осложнения, ФГ — фармакогенетическая группа, ФГТ — фармакогенетическое тестирование, ФП — фибрилляция предсердий, CHA2DS2-VASc (Congestive heart failure or Left ventricular systolic dysfunction, Hypertension, Age ≥ 75 , Diabetes mellitus, Stroke or TIA or thromboembolism, Vascular disease, Age 65–74 years, Sex category) — шкала оценки риска тромбозмболических осложнений, CYP2C9 — цитохром P450 2C9, CYP4F2 — цитохром P450 4 F2, HAS-BLED (Hypertension, Abnormal renal-liver function, Stroke, Bleeding history or predisposition, Labile international normalized ratio, Elderly (65 years), Drugs or alcohol concomitantly) — шкала риска геморрагических событий, TTR (Time in therapeutical range) — время в терапевтическом диапазоне, VKORC1 (Vitamin K-epoxide Reductase Complex subunit 1) — витамин К-эпоксид-редуктазный комплекс, субъединица 1).

ВВЕДЕНИЕ

Многие годы для длительной и непрерывной антикоагулянтной терапии и профилактики тромбозмболических состояний используются препараты антагонистов витамина К (АВК) [1–5]. Совершенствование и оптимизация варфаринотерапии, профилактики возникновения венозного тромбозмблизма/тромбозмболических осложнений (ВТЭ/ТЭО) включают изучение факторов, определяющих индивидуальную чувствительность к АВК, использование фармакогенетического алгоритма дозирования варфарина, контроль за антикоагулянтным действием варфарина [10–15]. Персонализированный подход к продленной терапии АВК ассоциирован с улучшением гемостазиологических маркеров тромбинемии и клинических исходов у пациентов с ВТЭ и фибрилляцией предсердий (ФП) [3, 9].

Сеть антикоагулянтных кабинетов (АК) в Архангельской области (АО) регламентирована Приказом Министерства здравоохранения АО от 2015 года. В 2019 году по распоряжению Министерства здравоохранения АО состоялось официальное открытие РЦАТТ Архангельской области, где проводится обследование и лечение, последующее динамическое наблюдение за пациентами с различной патологией системы гемостаза [2]. Основными направлениями работы РЦАТТ являются консультации пациентов и врачей, в том числе при инфекции Covid-19, осуществляется подбор дозы АВК, мониторинг МНО, проведение ФГТ, контроль терапии пероральными антикоагулянтами, антитромбоцитарной терапии, определение остаточной реактивности тромбоцитов по методике Verify Now. Отдельным направлением работы центра является образование пациентов (обучение в школах по продленному приему антикоагулянтов) для формирования приверженности, образование врачей путем проведения циклов тематического усовершенствования по антитромботической терапии (36 ч). Школа для пациентов, принимающих АВК, функционирует с апреля 2007 года на базе «ПГКБ им. Е. Е. Волоосевич». Данная структура является первой в России школой по варфаринотерапии. На базе РЦАТТ функционирует web-сервер — автоматизированное рабочее место «Cobas IT 1000» с базой данных пациентов, длительно принимающих АВК. Врач-координатор отслеживает эффективность и безопасность терапии АВК (анализ МНО в единой базе данных), формирует рекомендации по дозировке АВК, консультирует врачей других АК, осуществляет централизованный контроль за анализаторами, лотами, реагентами, персоналом, выполняющим измерения. В локальных АК медицинских организациях выполняется определение показателя МНО на портативном коагулометре — коагулометре, проводится коррекция дозы АВК. Обобщающая информация для пациента, получающего антикоагулянты, размещена на сайте ГБУЗ АО ПГКБ (www.lgkb.ru), в разделе «Консультативные центры» → РЦАТТ → онлайн-школы (тел. 8(8182)-632-910). Обучение пациентов, принимающих АВК и пероральные антикоагулянты, идет непрерывно.

Цель исследования — оценить эффективность и безопасность персонифицированного подхода в терапии антагонистами витамина К с использованием фармакогенетического тестирования у пациентов, наблюдающихся в региональном центре антитромботической терапии г. Архангельска.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено проспективное клинико-лабораторное исследование на базе РЦАТТ ГБУЗ АО ПГКБ им. Е. Е. Волосевич г. Архангельска. Методом сплошной выборки были включены пациенты ($n = 107$) с ВТЭ и ФП, обратившиеся в АК для прохождения школы варфаринотерапии в период с марта 2012 года по март 2013 года. Оценивались следующие параметры варфаринотерапии: препарат АВК; показания для варфаринотерапии; уровень медикаментозной гипокоагуляции; кровотечения и тромботические осложнения; мониторинг показателя МНО; факторы риска развития кровотечений, коморбидный фон с оценкой факторов риска ТЭО у пациентов с ФП по шкале CHA₂DS₂-VASc, риск кровотечений по шкале HAS-BLED [16], качество жизни [17]. Определялось значение Time in therapeutic range (TTR), отражающее время нахождения показателя МНО в пределах терапевтических границ.

Выполнено фармакогенетическое тестирование (ФГТ) с определением генотипа VKORC1: 1639 G>A — субъединица 1 витамин К-эпоксид-редуктазного комплекса, CYP2C9: 430 C>T (Arg144Cys) — цитохром P450, семейство 2, подсемейство C, полипептид 9, CYP2C9: 1075 A>C (Ile359Leu) — цитохром P 450, семейство 2, подсемейство C, полипептид 9, CYP4F2: C>T (V433M) — цитохром P 450, семейство 4, подсемейство F, полипептид 2; рассчитывались индивидуальные дозы варфарина с использованием онлайн-калькулятора Gage (www.warfarindosing.org) [18].

Методом простой рандомизации сформированы 2 группы пациентов: стандартная группа (СГ, $n = 57$) — использовался традиционный подход дозиро-

вания АВК; фармакогенетическая группа (ФГ, $n = 50$) — использовался фармакогенетический подход дозирования АВК.

Критерии включения в исследование: использование оригинального препарата варфарина натрия; обязательное обучение в школе варфаринотерапии (АК — РЦАТТ); последующий контроль за показателем МНО и другими показателями системы гемостаза в условиях РЦАТТ; наличие информированного согласия пациента на проведение ФГТ.

Критерии исключения из исследования: пациенты, принимающие некумариновые производные или другие антикоагулянты; отсутствие информированного согласия на участие в исследовании и проведение ФГТ.

Наблюдение за пациентами продолжалось в течение 6 месяцев с момента их обращения в АК. В начале терапии АВК и спустя 6 месяцев проводилось анкетирование пациентов с использованием шкалы Medcare (4 General Health — GH), США [17, 19]; шкалы приверженности к варфаринотерапии в модификации Шапошникова А. В. [6]; индексов качества жизни Karnovski; госпитальной шкалы психического состояния Hospital Anxiety and Depression Scale, A. S. Zigmond и R. P. Snaith [20].

Пациенты в группах были сопоставимы по возрасту и полу (табл. 1).

Так, в СГ возраст пациентов составил 45,0 [33,5–59,0] лет, в ФГ — 47,5 [39,5–58,2] лет ($p = 0,300$). Основными показаниями для назначения АВК в группах являлись тромбоз глубоких вен и фибрилляция предсердий без статистически значимых различий в группах (рис. 1). В СГ пациенты с ТГВ составили 65,0 % [52,0–76,0], $n = 37$, ФГ — 68,0 % [58,3–82,5], $n = 34$ ($p = 0,298$).

Для математической обработки результатов использовалась программа SPSS (версия 20,0) и калькулятор расчета доверительного интервала MedCalc. Ввиду отличного от нормального распределения, большинство количественных данных были представлены как медиана (Me) и квартили [Q_1 – Q_3]. Номинальные данные, отражающие распределение изучаемого признака, были представлены в виде доли и его 95 % доверительного интервала.

Таблица 1. Гендерная и возрастная характеристики пациентов

Признак	СГ, $n = 57$, % (n)	ФГ, $n = 50$, % (n)	p
Мужчины	54,4 (31)	42 (21)	0,707
Женщины	45,6 (26)	58 (29)	0,300
Возраст, годы	45,0 [33,5–59,0]	47,5 [39,5–58,2]	0,300

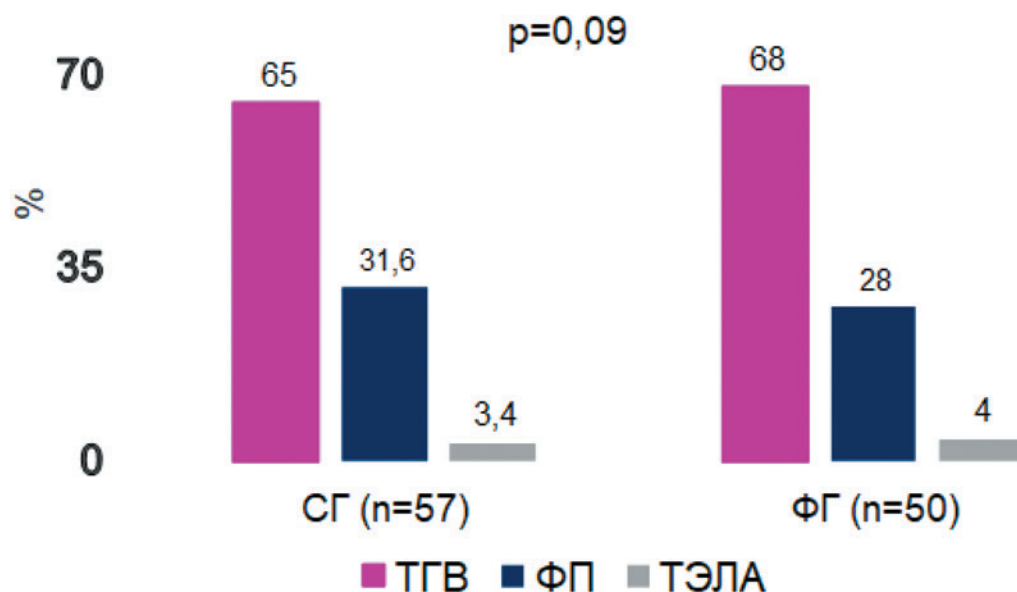


Рис. 1. Показания для варфаринотерапии

Таблица 2. Коморбидность пациентов

Показатели	Пациенты с ВТЭ (n = 75), % [95 % ДИ]	Пациенты с ФП (n = 32), % [95 % ДИ]	p
Возраст более 65 лет	6,7 [2,9–14,7]	15,6 [6,9–31,8]	0,049
Артериальная гипертензия	22,7 [14,7–33,3]	37,5 [30,0–54,8]	0,155
Ишемическая болезнь сердца	9,3 [4,6–18,0]	34,4 [20,4–51,7]	0,010
Острое нарушение мозгового кровообращения/ транзиторная ишемическая атака	9,3 [2,9–14,7] 2,7 [0,7–9,2]	34,4 [20,4–51,7] 15,6 [7,0–32,0]	0,005 0,030
Импантированный кава-фильтр, в том числе съемный постоянный	20,0 [12,5–30,4] 13,3 [7,4–22,8] 6,7 [2,9–14,7]	-	0,010

Количественные переменные сравнивались с использованием непараметрических тестов: критерия Вилкоксона для сравнения парных групп. Для проведения корреляционного анализа использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s). Статистическая значимость присваивалась при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пациентов старше 65 лет с ФП было значимо больше (15,6 % [6,9–31,8]) в сравнении с пациентами с ВТЭ ($p = 0,048$). Артериальная гипертензия

наблюдалась среди пациентов с ВТЭ и ФП без статистически значимых различий. Количество пациентов с острым нарушением мозгового кровообращения (34,4 % [20,4–51,7], $p = 0,005$), транзиторной ишемической атакой (15,6 % [7,0–32,0], $p = 0,005$), ишемической болезнью сердца (34,4 % [20,4–51,7], $p = 0,01$) также преобладало среди пациентов с ФП. Кава-фильтр был установлен пациентам с ВТЭ — в 20,0 % [12,5–30,4] случаев ($p = 0,01$), у 6,7 % [2,9–14,7] пациентов имплантировали постоянный кава-фильтр.

Проведя корреляционный анализ, в ФГ была выявлена корреляция между возрастом и начальной дозой варфарина ($r_s = -0,4$; $p = 0,030$), что означало

необходимость уменьшения дозы АВК с возрастом, а также с поддерживающей дозой варфарина ($r_s = -0,3$; $p = 0,057$). В СГ корреляционная связь возраста с начальной ($r_s = -0,2$; $p = 0,108$) и поддерживающей дозами АВК была статистически незначимой ($r_s = -0,1$; $p = 0,521$).

Результаты ФГТ представлены на рисунках 2, 3, 4. В исследуемых группах наиболее распространенным явился первый аллельный вариант $CYP2C9^*1/*1$ («дикий» тип), отвечающий за нормальный метаболизм варфарина (СГ — 51,0 % [38,2–63,4], ФГ — 67,3 % [54,1–79,3]). Аллельные варианты $CYP2C9^*1/*2$ и $CYP2C9^*1/*3$, требующие снижения дозы, были выявлены в СГ у 15,2 % [7,0–26,0] пациентов по каждому из аллелей; у 19,2 % [9,5–31,0] и 13,4 % [5,2–24,2] пациентов ФГ соответственно.

Статистически значимых различий в группах по выявленным аллелям не обнаружено (рис. 2).

В стандартной группе полиморфизм $VKORC1$ GG встречался у 25,4 % [15,1–37,2] пациентов, в ФГ — у 44,2 % [31,1–57,7]. Патологический аллель А, отвечающий за развитие избыточной гипокоагуляции, наблюдался в 32,2 % [21,0–44,5] случаев. В СГ гетерозиготное носительство (GA) было отмечено у 27,1 % [16,5–39,0] пациентов, гомозиготное носительство (AA) — у 6,8 % [1,2–15,0]. У пациентов в ФГ гетерозиготное носительство аллеля (GA) гена $VKORC1$ было выявлено в 36,5 % [24,1–50,0], гомозиготное носительство (AA) — в 15,3 % [6,6–26,5] случаев (рис. 3).

Генотип $CYP4F2$ представлен на рисунке 4.

В гене $CYP4F2$ также преобладал нормальный

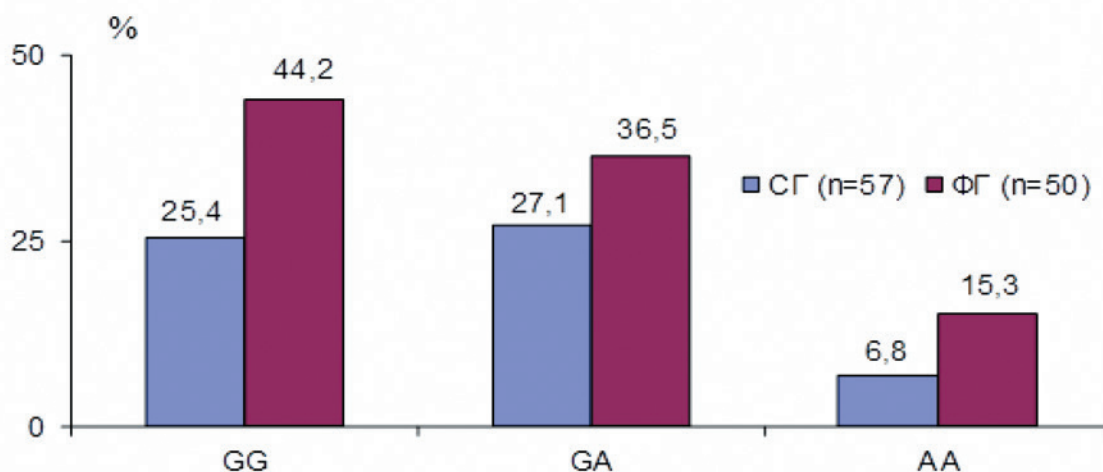


Рис. 2. Распределение частот аллельных вариантов гена $CYP2C9$ в исследуемых группах пациентов, %

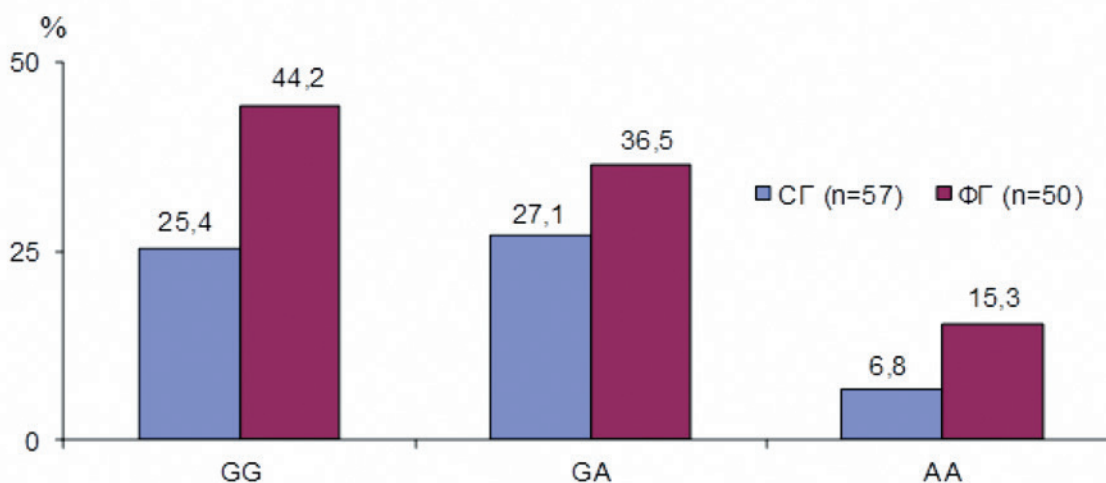


Рис. 3. Распределение частот аллельных вариантов гена $VKORC1$ в исследуемых группах пациентов, %

генотип (CC): СГ — у 68,4 % [55,5–79,0] пациентов; в ФГ — у 68,0 % [54,2–80,0] пациентов. Гетерозиготное носительство (СТ) было отмечено в обеих группах (в СГ — 31,6 % [21,0–44,5], в ФГ — 22,0 % [13,0–35,2]), при этом гомозиготное носительство (ТТ) наблюдалось только у пациентов в ФГ — 10,0 % [3,2–19,0].

Также мы оценили мультигенное носительство полиморфизма сразу в трех генах, отвечающих за метаболизм варфарина (рис. 5), неблагоприятные или потенциально опасные комбинации (генотип VKORC1 GA/AA с CYP2C9*2/*3 при любом варианте CYP4F2) были выявлены у 11,2 % [6,5–18,6] пациентов.

Оказалось, что у одного пациента стандартной группы наблюдалась неблагоприятная комбина-

ция полиморфизма в генах VKORC1 и CYP2C9 — 1,8 % [0,3–9,3] и у одного пациента в ФГ выявлено одновременно 3 полиморфизма в генах VKORC1, CYP2C9, CYP4F2 — 2,0 % [0,4–10,5].

Далее мы оценили уровень наведенной медикаментозной гипокоагуляции (динамику показателя МНО). В обеих группах пациентов в первую неделю подбора дозы варфарина не было зарегистрировано терапевтического диапазона гипокоагуляции по уровню МНО.

На 9-е сутки варфаринотерапии 22,3 % пациентов в СГ достигли оптимальной гипокоагуляции и 23,0 % пациентов в ФГ, к 15-м суткам варфаринотерапии в обеих группах число пациентов с оптимальным значением МНО увеличилось до 40,6 % СГ и 38,5 % ФГ без статистически значимых разли-

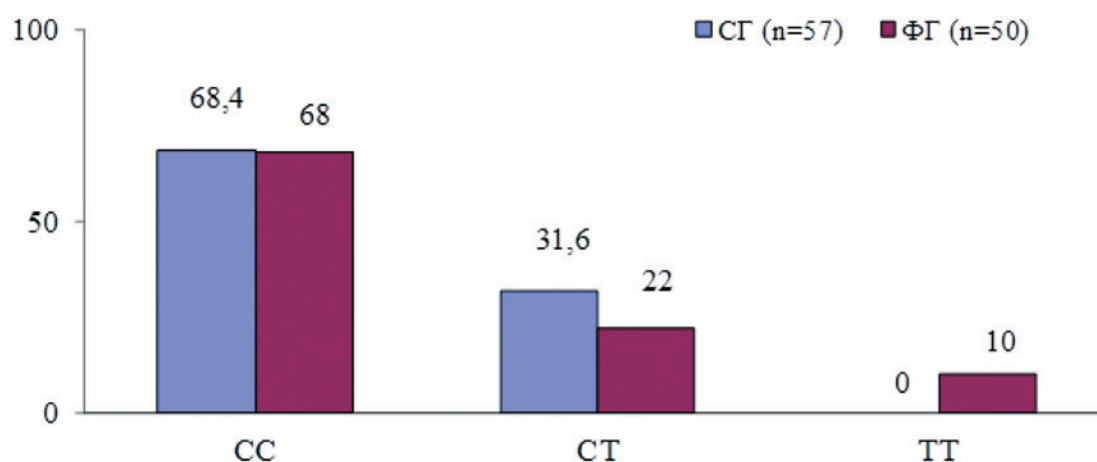


Рис. 4. Распределение частот аллельных вариантов CYP4F2 в исследуемых группах пациентов, %

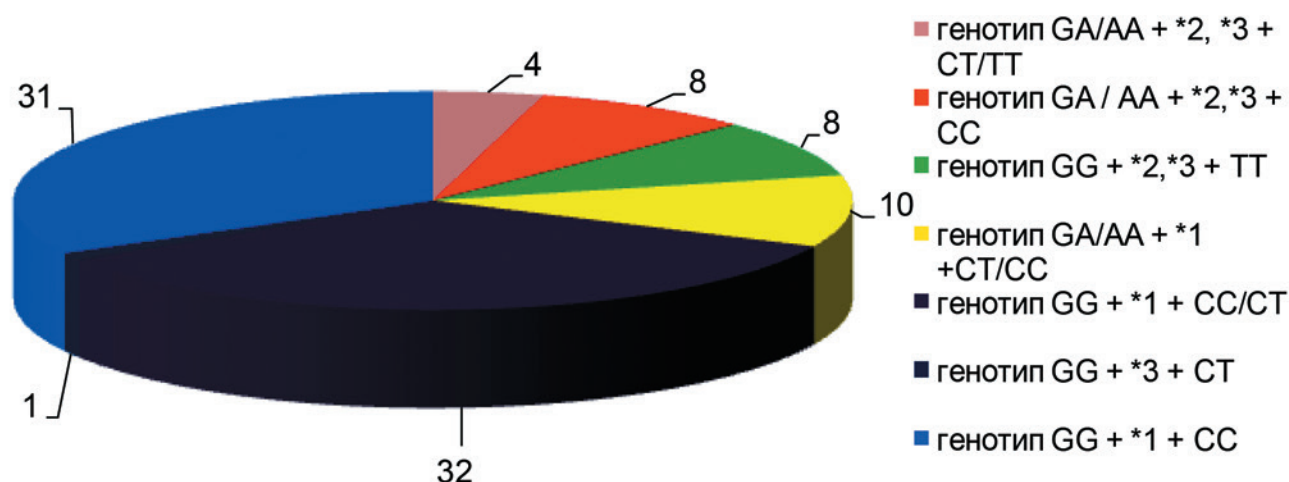


Рис. 5. Частота встречаемости сочетанного полиморфизма в генах (VKORC1 + CYP2C9 + CYP4F2), абс.

Таблица 3. Количество пациентов с МНО в терапевтическом диапазоне и значение TTR за 6 месяцев терапии АВК

Точки контроля МНО		СГ (n = 57) n, % (95 % ДИ)	ФГ (n = 50) n, % (95 % ДИ)	p
Сутки	9-е	22,3 [12,3-33,4] n = 12	23,0 [12,6-35,4] n = 11	0,745
	11-е	25,4 [15,1-37,2] n = 14	21,1 [11,0-33,2] n = 10	0,328
	13-е	34,0 [22,4-46,3] n = 19	19,2 [9,5-31,0] n = 9	0,016
	15-е	40,6 [28,6-53,3] n = 23	38,5 [26,0-52,0] n = 19	0,439
Месяц	1-й	45,6 [33,4-58,4] n = 26	50,0 [36,6-63,4] n = 25	0,241
	6-й	84,2 [72,6-91,5] n = 48	92,0 [81,2-97,0] n = 46	0,776
TTR, %, за 6 месяцев		68,2 [33,7–90,0]	69,1 [33,0–92,3]	0,089
Время (сутки) достижения TTR		11,3 ± 3,6	14,7 ± 2,2	0,06

Таблица 4. Осложнения варфаринотерапии

Показатели, % (n)	СГ (n = 57)	ФГ (n = 50)	p
Малые кровотечения	5,2 (5)	7,7 (4)	0,380
Большие кровотечения	3,5 (2)	-	-
Лабораторные передозировки	14 (8) < 65 лет	18 (9) < 65 лет	0,62 c ² = 14,3; 0,050
Средний балл HAS-BLED, Ме 95 % ДИ	1,0 [0,01–2,0]	2,0 [0,2–2,0]	0,228
ТЭО, % (n) МНО	3,5 (2) 1,4 [1,2–1,6]	2,0 (1) 1,5	0,06 0,57

чий (p = 0,439). К 6-му месяцу варфаринотерапии количество пациентов, находящихся в терапевтическом диапазоне показателя МНО, составило 84,2 % в стандартной группе и 92,0 % в фармакогенетической группе (p = 0,076). Среднее значение времени нахождения показателя МНО в терапевтическом диапазоне (TTR) составило около 70 % в обеих группах, что соответствовало оптимальному уровню варфаринотерапии [10] (табл. 3). Более быстрое достижение показателя TTR наблюдалось у пациентов в СГ — 11,3 ± 3,6 дней в сравнении с пациентами ФГ — 14,7 ± 2,2 дней (p = 0,06).

Следующим этапом явился анализ осложнений терапии АВК и риск развития кровотечений (шкала HAS-BLED (табл. 4)). Риск кровотечений в СГ оказался низким (1,0 [0,01–2,0] балл), ФГ — умеренным (2,0 [0,2–2,0] балла (U = 303,5; p = 0,228)).

Геморрагический синдром был отмечен в 10,3 % [6,0–17,5] случаев и в основном был представлен малыми кровотечениями: в СГ — 5,2 % [1,8–14,1] случаев, ФГ — 7,7 % [1,4–16,8] (p = 0,380). Большие кровотечения зарегистрированы у 3,5 % [1,0–12,0] пациентов в СГ, потребовавших госпитализации в стационар и проведения заместительной терапии. В обеих группах наблюдались эпизоды избыточной медикаментозной гипокоагуляции (МНО > 3,0). В СГ отмечено 14,0 % [7,3–25,3] или 8 случаев, ФГ — 18,0 % [9,8–30,8] (p = 0,620), 9 случаев передозировок АВК, большинство пациентов были моложе 65 лет (7 пациентов — СГ, 4 пациента — ФГ). Нами была выявлена статистически значимая взаимосвязь между возрастом пациента (молже 65 лет) и избыточной гипокоагуляцией (c² = 14,3; p = 0,050).

Таблица 5. Результаты анкетирования по качеству жизни до и после проведения школы варфаринотерапии (n = 107)

Шкалы	Исходно, % [95 % ДИ], n	6 месяцев, % [95 % ДИ], n
Предстоящая адаптация: полная социальная и медицинская частичная социальная и медицинская ухудшение в состоянии	12,0 [9,0-17,0], 13 81,0 [76,6-86,2], 87 7,0 [4,5-8,4], 7	15,4 [11,5-20,5], 15 81,3 [85,0-93,0], 89 3,3 [1,7-6,3], 3*
SF-36 (GH) самочувствие: превосходное очень хорошее удовлетворительное	1,4 [0,5-3,5], 2 21,0 [17,0-26,0], 30 34,1 [29,0-40,0], 75	20,3 [16,0-26,0], 22* 40,7 [35,0-47,0], 44* 10,6 [7,1-15,0], 41*
Индексы Karnovski, % обычная активность — 90 активность снижена — 80 требуется мед. помощи — 70 с трудом самообслуживание — 60	8,0 [5,4-11,8], 9 26,5 [21,0-31,0], 30 34,5 [28,3-40,0], 39 13,6 [10,1-18,1], 29	79,0 [74,0-83,3], 85* 10,5 [7,5-14,6], 11* 5,6 [3,5-8,9], 6* 5,0 [3,0-8,1], 5*
HADS субклиническая тревога субклиническая депрессия отсутствие клинической тревоги отсутствие клинической депрессии	18,0 [13,5-24,0], 19 13,4 [10,0-17,7], 14 27,0 [21,4-33,1], 28 15,3 [12,0-20,0], 46	10,0 [7,1-13,0], 11 9,0 [7,1-12,0], 10* 30,3 [26,3-37,6], 34* 50,7 [40,0-50,3], 52*
* статистически значимые различия, $p < 0,05$		

Повторный тромбоз развился в СГ у 2-х пациентов с одним летальным исходом, где уровень МНО составил $Me\ 1,4\ [1,2-1,6]$, в ФГ — у одного пациента (МНО 1,5) ($p = 0,574$).

Используя опросник для оценки предстоящей социальной и медицинской адаптации в модификации Шапошникова А. В. и опросник SF-36 Medcare (4 GH) для субъективной оценки здоровья пациентов, шкалу индексов физической активности Karnovski, отражающую физическую активность в процентах [19], госпитальную шкалу для оценки психических состояний, разработанную А. S. Zigmond и R. P. Snaith [20], мы выявили следующие параметры качества жизни, приведенные ниже (табл. 5).

Большинство пациентов (81,0 %) с началом варфаринотерапии ожидала частичная социальная и медицинская реадaptация. Через 6 месяцев терапии АВК отмечалось увеличение количества пациентов с полной медицинской и социальной адаптацией с 12,0 до 15,4 % ($p > 0,05$). Также уменьшилось количество больных, имеющих ухудшение в состоянии здоровья и социальном статусе с 7,0 до 3,3 % ($p < 0,05$). Треть пациентов (34,1 %) в начале терапии АВК оценивали свое здоровье как удовлетворительное. В дальнейшем увеличилось число лиц, оценивающих свое состояние как превосходное

с 1,4 до 20,3 % ($p < 0,05$). Количество пациентов, чувствующих себя очень хорошо, также повышалось с 21,0 до 40,7 % ($p < 0,05$). Значительно меньше стало пациентов, оценивающих свое здоровье как удовлетворительное — 10,6 % ($p < 0,05$).

Исходно 34,5 % [28,3–40,0] пациентов оценивали свою повседневную активность как требующую периодической медицинской помощи (70 % индекса), спустя 6 месяцев данный показатель составил 5,6 % ($p < 0,05$). В динамике возросло количество пациентов с обычной активностью и минимальной симптоматикой (90 % индекса) до 79,0 % ($p < 0,05$). В результате данного анализа было выявлено, что у 41,0 % пациентов, принимающих АВК, мы обнаружили признаки клинической тревоги, у 36,3 % — признаки выраженной клинической депрессии.

Психическое состояние пациентов после 6-месячной терапии АВК улучшилось, депрессии не было выявлено у 50,7 % пациентов ($p < 0,05$), однако оставались пациенты с субклиническими признаками депрессии — 9 % ($p < 0,05$).

ВЫВОДЫ

1. Выявлена статистически значимая корреляция между уровнем наведенной избыточной

гипокоагуляции и возрастом пациента менее 65 лет ($c^2 = 14,3; 0,050$) в обеих группах, а у пациентов фармакогенетической группы отрицательная корреляция начальной дозы варфарина с возрастом пациента ($r_s = -0,4; p = 0,030$).

2. Осложнения варфаринотерапии развились вне зависимости от присутствия генотипа (CYP2C9, CYP4F2, VKORC1) и алгоритма дозирования варфарина в условиях наблюдения в антикоагулянтном кабинете.

3. В условиях наблюдения в АК фармакогенетический алгоритм выбора дозы у пациентов с ВТЭ и неклапанной ФП является дополнительным методом, то есть показан для пациентов с геморрагическим анамнезом, частыми малыми кровотечениями при целевых значениях МНО и при наличии сопутствующей терапии ингибиторами цитохромов P450.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Персонализированный подход к продленной терапии АВК с использованием фармакогенетического тестирования целесообразен для пациентов старшей возрастной группы, пациентов с отягощенным геморрагическим анамнезом, частыми малыми кровотечениями при целевых значениях МНО и наличии сопутствующей терапии ингибиторами цитохромов P450. Для оптимизации продленной терапии АВК необходимо формирование приверженности к такой терапии врачей стационарного и амбулаторного звена с использованием образовательных обучающих программ в системе непрерывного медицинского образования на основе опыта работы антикоагулянтных кабинетов.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Belousov YuB. Kliniko-ekonomicheskij analiz effektivnosti dabigatrana eteksilata v sravnenii s varfarinom v aspekte profilaktiki serdechno-sosudistyh oslozhnenij u pacientov s neklapanno-fibrillyaciej predserdij / Yu. B. Belousov, V. Yu. Mareev, I. S. Yavelov // Racional'naya farmakoterapiya v kardiologii. — 2012. — № 8. — С. 37–44. [Белоусов Ю.Б. Клинико-экономический анализ эффективности дабигатрана этексилата в сравнении с варфарином в аспекте профилактики сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий / Ю. Б. Белоусов, В. Ю. Мареев, И. С. Явелов //

Рациональная фармакотерапия в кардиологии. — 2012. — № 8. — С. 37–44.]

2. Vorob'eva NA. Social'no-ekonomicheskoe obosnovanie sozdaniya sistemy centralizovannogo monitoringa antikoagulyantnoj terapii u pacientov v Arhangel'skoj oblasti / N. A. Vorob'eva, A. I. Vorob'eva, A. A. Shchapkov, M. Lisyanskaya, A. A. Karpunov // Sbornik tezisov 2-go Mezhdunarodnogo foruma antikoagulyantnoj terapii. — M., 2017. — С. 41–42. <https://doi.org/10.17116/labs20187256-62> [Воробьева Н.А. Социально-экономическое обоснование создания системы централизованного мониторинга антикоагулянтной терапии у пациентов в Архангельской области / Н. А. Воробьева, А. И. Воробьева, А. А. Щапов, М. Лисянская, А. А. Карпунов // Сборник тезисов 2-го Международного форума антикоагулянтной терапии. — М., 2017. — С. 41–42. <https://doi.org/10.17116/labs20187256-62>]

3. Gorbunova EV. Effektivnost' obuchayushchej programmy u pacientov s infarktom miokarda pri analize mediko-social'nyh faktorov priverzhennosti k lecheniyu / E. V. Gorbunova, D. Yu. Sedyh, O. S. Krestova, I. A. Bryuhanova // Sibirskij medicinskij zhurnal. — 2017. — Т. 32, № 3. — С. 56–59. DOI: 10.29001/2073-8552-2017-32-3-56-59 [Горбунова Е.В. Эффективность обучающей программы у пациентов с инфарктом миокарда при анализе медико-социальных факторов приверженности к лечению / Е. В. Горбунова, Д. Ю. Седых, О. С. Крестова, И. А. Брюханова // Сибирский медицинский журнал. — 2017. — Т. 32, № 3. — С. 56–59. DOI: 10.29001/2073-8552-2017-32-3-56-59.]

4. Kropacheva ES, Borovkov NN, Vavilova TV, Vereina NK, Vorob'eva NA, Lavrinov PA, Rogozina AS. Bystrye tempy насыshcheniya varfarinom — prediktor razvitiya chrezmernoj gipokoagulyacii. Modernizaciya algoritma podbora dozy varfarina Ateroskleroz, № 1, 2015, С. 74–86. <https://doi.org/10.21518/2307-1109-2015-1-74-86> [Кропачева Е.С., Боровков Н.Н., Вавилова Т.В., Верейна Н.К., Воробьева Н.А., Лавринов П.А., Рогозина А.С. Быстрые темпы насыщения варфарином — предиктор развития чрезмерной гипокоагуляции. Модернизация алгоритма подбора дозы варфарина Атеросклероз. № 1, 2015. — С. 74–86. <https://doi.org/10.21518/2307-1109-2015-1-74-86>]

5. Mel'nik MV. Antikoagulyanty nepryamogo dejstviya v terapevticheskoj praktike lecheniya i profilaktiki venoznogo tromboza / M. V. Mel'nik, I. S. Svyatov, A. M. Shilov // Russkij medicinskij zhurnal. — 2006. — Т. 14, № 10. <https://doi.org/10.37489/2588-0519-2020-1-69-79> [Мельник М.В. Антикоагулянты непрямого действия в терапевтической практике лечения и профилактики венозного тромбоза / М. В. Мельник, И. С. Святлов, А. М. Шилов // Русский медицинский журнал. — 2006. — Т. 14, № 10. <https://doi.org/10.37489/2588-0519-2020-1-69-79>]

6. Novik AA. Rukovodstvo po issledovaniyu kachestva zhizni v medicine / A. A. Novik, T. I. Ionova. — M.: OLMA Media Grupp, 2007. — 320 s. [Новик А.А. Руководство по исследованию качества жизни в медицине / А. А. Новик, Т. И. Ионова. — М.: ОЛМА Медиа Групп, 2007. — 320 с.]
7. Rossijskie klinicheskie rekomendacii po diagnostike, lecheniyu i profilaktike venoznyh tromboembolicheskikh oslozhnenij // Flebologiya. — 2018. — Т. 12, N 3. — С. 146–240. [Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбозмболических осложнений // Флебология. — 2018. — Т. 12, № 3. — С. 146–240.]
8. Sychev DA. Prikladnye aspekty primeneniya farmakogeneticheskogo testirovaniya dlya presonalizacii primeneniya peroral'nyh antikoagulyantov v rossijskikh usloviyah / D. A. Sychev // Racional'naya farmakoterapiya v kardiologii. — 2013. — Т. 9, № 5. — С. 525–535. <https://doi.org/10.20996/1819-6446-2013-9-5-525-531> [Сычев Д.А. Прикладные аспекты применения фармакогенетического тестирования для персонализации применения пероральных антикоагулянтов в российских условиях / Д. А. Сычев // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. — 2013. — Т. 9, № 5. — С. 525–535. <https://doi.org/10.20996/1819-6446-2013-9-5-525-531>.]
10. Assessing the relative potency of (S)- and (R)-warfarin with a new PK-PD model, in relation to VKORC1 genotypes / M. Ferrari, V. Pengo, M. Barolo [et al.] // European Journal Clinical Pharmacology. — 2017. — Vol. 73, Is. 6. — P. 699–707. DOI: 10.1007/s00228-017-2248-9.
11. Aomori T. Case report: dose adjustment of warfarin using genetic information and plasma concentration monitoring / T. Aomori, Y. Fujita, K. Obayashi [et al.] // Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. — 2014. — Vol. 39, Is. 3. — P. 319–321. DOI: 10.1016/j.amjmed.2017.02.030.
12. Clarkesmith DE. Educational intervention improves anticoagulation control in atrial fibrillation patients: the TREAT randomised trial / D. E. Clarkesmith, H. M. Pattison, G. Y. Lip, D. A. Lane // PLoS One journal. — 2013. — Vol. 8. — P. 74037. DOI: 10.1371/journal.pone.0074037.
13. Heit JA. The epidemiology of venous thromboembolism in the community / J. A. Heit // Arteriosclerosis. Thrombosis and Vascule Biology. — 2008. — Vol. 28, Is.3. — P. 370–2.
14. Johnson JA. Clinical Pharmacogenetics Implementation. Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1. Genotypes and Warfarin Dosing / J. A. Johnson, L. Gong, M. Whirl-Carrillo, B. F. Gage // Journal of Clinical pharmacology and Therapeutics. — 2011. Vol. 4. — P. 625–629. DOI: 10.1038/clpt.2011.185.
15. Kim TH. Heparin bridging in warfarin anticoagulation therapy initiation could increase bleeding in nonvalvular atrial fibrillation patients: A multicenter propensity-matched analysis / T. H. Kim, J. Y. Kim, H. S. Mun, H. Y. Lee [et al.] // Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2015. — Vol.13, Is. 2. — P.182–190. DOI: 10.1111/jth.12810.
16. Takach S. Influence of sex on risk of bleeding in anticoagulated patients: a systematic review and meta-analysis / S. Takach, N. Cohen, C. Kearon // Journal of Thrombosis and Haemostasis. — 2014. — Vol.12, Is.5. — P. 595–605. DOI 10.1111/jth.12529.
17. Ware JE. SF-36 Physical and Mental Health Summary Scales: A User's Manual / J. E. Ware, M. Kosinski, S. D. Keller // The Health Institute, New England Medical Center. — Boston, Mass, 1994. DOI: 10.1097/00005650-199603000-00003.
18. You JJ. Antithrombotic Therapy for Atrial Fibrillation: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 10th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines / J. J. You, D. E. Singer, P. A. Howard [et al.] // Chest Journal. — 2013. — P. 419–496. DOI: 10.1378/chest.11-2304.
19. Zieren J. Repair of inguinal hernia in the elderly. Results of the plug and patch repair with special reference to quality of life / H. U. Zieren, F. Wenger // Chirurg. — 2000. — Vol. 71, № 5. — P. 564–567. DOI: 10.1007/s001040051103.
20. Zigmond AS. The hospital anxiety and depression scale, HADS / A. S. Zigmond, R. P. Snaith // Acta Psychiatrica Scandinavica. — 1983. — Vol. 67, Is.6. — P.361–370. DOI: 10.1111/j.1600-0447.1983.tb09716.x.

Информация об авторах:

Бартенева Александра Сергеевна, к.м.н., доцент кафедры клинической фармакологии и фармакотерапии ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России;

Воробьева Надежда Александровна, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии и фармакотерапии ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России.

Author information:

Barteneva Aleksandra S., docent of department of clinical pharmacology and pharmacotherapy of the Northern state medical University;

Vorobyeva Nadezda A., doctor of medical sciences, Professor, head of the Department of clinical pharmacology and pharmacotherapy of the Northern State Medical University.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616.36:615.03-065

ИЗОНИАЗИД-ИНДУЦИРОВАННОЕ ПОРАЖЕНИЕ ПЕЧЕНИ: ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Краснова Н. М.¹, Николаев В. М.²

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Восточный федеральный университет имени М. К. Аммосова», Медицинский институт, Якутск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», Якутск, Россия

Контактная информация:

Краснова Наталья Михайловна,
ФГАОУ ВО «Северо-Восточный
федеральный университет им.
М. К. Аммосова»,
ул. Белинского, д. 58, Якутск, Россия,
677000.
E-mail: krasnova14@mail.ru

Статья поступила в редакцию 01.04.2022
и принята к печати 12.04.2022

РЕЗЮМЕ

В клинической практике результаты лечения туберкулеза демонстрируют индивидуальные различия: у одних пациентов противотуберкулезная химиотерапия позволяет достичь желаемого терапевтического эффекта, у других она проявляется недостаточным ответом или его отсутствием, развитием нежелательных побочных реакций, в первую очередь, изониазид-индуцированного поражения печени. Изониазид-индуцированные поражения печени становятся ведущей причиной отмены изониазида, что значительно уменьшает эффективность противотуберкулезной терапии, повышает риск рецидива заболевания и формирует вторичную лекарственную устойчивость микобактерий туберкулеза. Гепатотоксические реакции при химиотерапии туберкулеза обусловлены мутацией генов ферментов биотрансформации изониазида: N-ацетилтрансферазы 2, цитохрома P450 2E1 и глутатион-S-трансферазы.

Полиморфизм гена NAT2 идентифицирован как фактор риска гепатотоксичности изониазида. Нуклеотидные замены в гене NAT2 модифицируют белковую структуру фермента, уменьшают синтез и изменяют его активность. В зависимости от генетически детерминированной скорости ацетилирования выделяют три типа ацетиляторов: быстрый, промежуточный и медленный. В метаанализах и систематических обзорах установлены ассоциативные связи между медленным типом ацетилирования изониазида и частотой гепатотоксических реакций.

На основании исследований получены данные о взаимосвязи полиморфизмов генов цитохрома P450 CYP2E1 с повышенным риском поражения печени при терапии изониазидом. Вклад в токсичность изониазида генотипов GSTM1 и GSTT1 требует более подробных исследований, так как полученные данные неоднозначны и противоречивы.

Ключевые слова: гепатотоксичность, глутатион-S-трансфераза, изониазид, полиморфизм генов, туберкулез, фармакогенетика, цитохром P450, N-ацетилтрансфераза 2.

Для цитирования: Краснова Н.М., Николаев В.М. Изониазид-индуцированное поражение печени: фармакогенетические аспекты. *Российский журнал персонализированной медицины.* 2022;2(3):38-46. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-38-46

ISONIAZID-INDUCED LIVER INJURY: PHARMACOGENETIC ASPECTS

Krasnova N. M.¹, Nikolaev V. M.².

¹ M. K. Ammosov North-Eastern Federal University, Medical Institute, Yakutsk, Russia

² Yakutsk Scientific Center for Complex Medical Problems, Yakutsk, Russia

Corresponding author:

Krasnova Nathalya M.,
M. K. Ammosov North-Eastern Federal
University, Medical Institute,
Belinsky str., 58, Yakutsk, Russia, 677000.
E-mail: krasnova14@mail.ru

Received 01 April 2022; accepted 12 April
2022.

ABSTRACT

Inter-individual differences in anti-tuberculosis chemotherapy outcomes have been demonstrated in clinical practice, such as, achievement of intended therapeutic effect in some patients, and insufficiency or absence of response to treatment in others, with development of adverse drug reactions, especially, isoniazid-induced liver injury. Isoniazid-induced liver injuries are the main reason for isoniazid discontinuation, which further leads to considerably reduced effectiveness of anti-tuberculosis chemotherapy, increased relapse risk, and secondary drug-resistance of *M. tuberculosis*. Hepatotoxic reactions to chemotherapy are predicated by mutations in genes encoding enzymes participating in isoniazid biotransformation: N-acetyltransferase 2 (NAT2), cytochrome P450 2E1, and glutathione-S-transferase.

NAT2 gene polymorphism has been identified as risk factor for isoniazid hepatotoxicity. Nucleotide substitutions in NAT2 gene cause modification of enzyme protein structure, reduction of enzyme synthesis and alteration of its activity. Based on genetically-determined isoniazid acetylation rate, patients are referred to three acetylators types: rapid, intermediate, and slow. Correlations have been established in meta-reviews and systematic reviews between slow acetylator type and frequency of hepatotoxic reactions to isoniazid.

Based on study findings, interrelation was shown between cytochrome P450 CYP2E1 gene polymorphism and increased risk of liver injury during chemotherapy with isoniazid. Contribution of GSTM1 and GSTT1 genotypes to isoniazid toxicity requires further exploration, as the obtained results were ambiguous and controversial.

Key words: cytochrome P450, gene polymorphism, glutathione-S-transferase, hepatotoxicity, isoniazid, N-acetyltransferase 2, pharmacogenetics, tuberculosis.

For citation: Krasnova NM, Nikolaev VM. Isoniazid-induced liver injury: pharmacogenetic aspects. *Russian Journal for Personalized Medicine*. 2022;2(3):38-46. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-38-46

Список сокращений: CYP — цитохром, GST — глутатион-S-трансфераза, NAT2 — N-ацетилтрансфераза 2 типа, $T_{1/2}$ — период полувыведения.

ВВЕДЕНИЕ

В России на протяжении последних 10 лет наблюдается стойкое снижение заболеваемости туберкулезом, в 2021 году по сравнению с 2010 годом этот показатель снизился в 2,5 раза и составил 30,71 случаев на 100 000 населения.

Химиотерапия (этиотропная противотуберкулезная терапия) является основным компонентом лечения туберкулеза вне зависимости от локализации инфекционного процесса, заключается в длительном применении комбинации лекарственных препаратов, подавляющих размножение *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) (бактериостатический эффект) или уничтожающих их в организме пациента (бактерицидный эффект) [1].

Лечение туберкулеза, вызванного лекарственно-чувствительными *M. tuberculosis*, предусматривает применение стандартной схемы химиотерапии, включающей комбинацию противотуберкулезных препаратов: изониазид, рифампицин/рифамбутил, пипразинамид и этамбутол.

По временным и клиническим интервалам противотуберкулезная химиотерапия проводится в 2 фазы: интенсивная фаза и фаза продолжения. Интенсивная фаза химиотерапии — это первый и основной этап лечения туберкулеза, который направлен на ликвидацию клинических проявлений заболевания, максимальное воздействие на популяцию *M. tuberculosis* с целью прекращения бактериовыделения и предотвращения развития лекарственной устойчивости. Стандартной схемой химиотерапии туберкулеза в интенсивной фазе является сочетанное назначение не менее 2 месяцев изониазида, рифампицина, пипразинамида и этамбутола. Фаза продолжения длится не менее 4 месяцев и включает препараты: изониазид, рифампицин или изониазид, рифампицин, этамбутол. Эта фаза на-

правлена на подавление сохраняющейся микобактериальной популяции, дальнейшее уменьшение воспалительных изменений и инволюцию туберкулезного процесса, а также восстановление функциональных возможностей организма [1].

Изониазид — производное гидразида изоникотиновой кислоты, является наиболее активным противотуберкулезным препаратом, используется как для лечения пациентов с впервые выявленным туберкулезом, так и для его профилактики. Изониазид был разработан в 1912 году, а в 1952 году впервые применен в клинической практике. С момента внедрения во фтизиатрическую практику изониазид остается чрезвычайно важным компонентом химиотерапии туберкулеза благодаря своей высокой эффективности и относительно низкой токсичности.

ОСНОВНЫЕ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИЗОНИАЗИДА

Изониазид нарушает синтез миколовых кислот и оказывает селективное бактериостатическое действие на неделящиеся и бактерицидное влияние на *M. tuberculosis* в стадии размножения. Среди противотуберкулезных препаратов первой линии изониазид обладает наибольшей ранней антимикобактерицидной активностью.

При приеме внутрь изониазид быстро и полно абсорбируется (пища снижает абсорбцию и биодоступность), может подвергаться значительной биотрансформации при «первом прохождении» через печень. Препарат хорошо распределяется по всему организму, проникает во все ткани и жидкости организма, включая цереброспинальную, плевральную, асцитическую. Высокие концентрации создаются в легочной ткани, почках, печени, мышцах, слюне и мокроте. Препарат проникает через гематоэнцефалический барьер, плацентарный барьер и в грудное молоко. Связь с белками незначительная — до 10,0 %. Объем распределения равен 0,57–0,76 л/кг.

Изониазид метаболизируется в печени. Основные пути метаболизма изониазида (рис. 1) вклю-

чают реакцию ацетилирования ферментом N-ацетилтрансферазой 2 типа (NAT2) с образованием N-ацетилизониазида, а также гидролиз ферментом амидазой с образованием гидразина и сопутствующим образованием изоникотиновой кислоты.

На следующем этапе биотрансформации N-ацетилизониазид гидролизуется амидазой до токсического метаболита ацетилгидразина и изоникотиновой кислоты. Ацетилгидразин может быть дополнительно гидролизован амидазой до гидразина и ацетилирован NAT2 до диацетилгидразина. Гидразин может быть расщеплен до аммиака и ацетилирован до ацетилгидразина с помощью NAT2. Нужно отметить, что ни один из метаболитов изониазида не обладает противотуберкулезной активностью кроме гепатотоксического ацетилгидразина [2]. Низкая активность фермента NAT2 приводит к накоплению ацетилгидразина, который окисляется при участии изофермента цитохрома P450 2E1 (CYP2E1) в токсичные реакционноспособные метаболиты — ацетилдаизен, кетен и ион ацетилоний [3]. Ферменты семейства глутатион-S-трансферазы (GST) путем реакции конъюгации с глутатионом превращают потенциально опасные электрофильные метаболиты изониазида в менее токсичные

вещества, повышают их выведение из организма. Однако на сегодня не проведено исследований, которые детализировали бы метаболизм изониазида ферментами GST [4].

Изониазид также может конъюгировать с несколькими эндогенными метаболитами [5], включая кетоновые кислоты, витамин B6. Препарат нарушает гомеостаз эндогенных метаболитов, таких как желчные кислоты, холестерин и триглицериды [5, 6]. Изониазид является индуктором изофермента CYP2E1. Ингибирует изоферменты CYP2C19, CYP1A2, CYP2A6, CYP3A4. Среднее значение периода полувыведения ($T_{1/2}$) составляет 3 ч (прием внутрь 600 мг) и 5 ч (прием внутрь 900 мг). При повторных назначениях $T_{1/2}$ укорачивается до 2–3 ч. При почечной недостаточности $T_{1/2}$ может возрастать до 6,7 ч.

Выводится в основном почками: в течение 24 ч выводится 80 % препарата, в виде неактивных метаболитов изониазида (ацетилизониазид и изоникотиновая кислота). Изоникотиновая кислота может выделяться в виде свободного кислотного метаболита или конъюгированного соединения с глицином (изоникотинилглицин). Менее 10 % пероральной дозы изониазида выводится с калом [4].

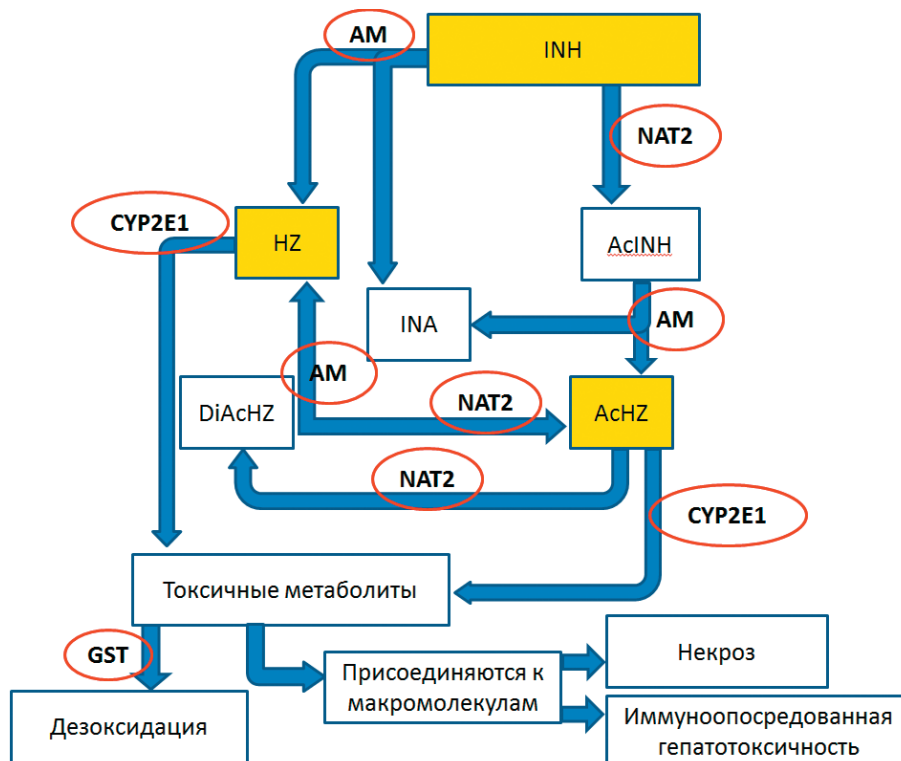


Рис. 1. Схематическое изображение метаболизма изониазида (INH), где:

AcINH — ацетилизониазид; ACHZ — ацетилгидразин; DiACHZ — диацетилгидразин; HZ — гидразин; INA — изоникотиновая кислота; GST — глутатион-S-трансфераза; NAT2 — N-ацетилтрансфераза 2; CYP2E1 — цитохром P450 2E1; AM — амидаза

Фармакокинетика изониазида широко варьирует у пациентов, принимающих стандартные дозы препарата. Вариабельность фармакокинетики изониазида обусловлена полиморфизмом генов ферментов биотрансформации, в частности фермента NAT2.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА NAT2

Ген NAT2 локализован на коротком плече хромосомы 8 (8p23.1), имеет протяженность около 9900 пн., содержит 2 экзона и преимущественно экспрессируется в печени и кишечнике. Ген NAT2 является полиморфным. Исследования, оценивающие метаболизм изониазида у пациентов с туберкулезом, показали наличие множества однонуклеотидных замен (single nucleotide polymorphism, SNP) в кодирующем экзоне гена NAT2. Аллели (гаплотипы) идентифицируют, основываясь на информации, хранящейся на веб-сайте Согласованной номенклатуры генов ариламин-N-ацетилтрансферазы человека (<http://nat.mbg.duth.gr>). Однонуклеотидные замены в структурной области гена NAT2 обуславливают генетические изменения активности фермента [7, 8], приводящие к понижению или, напротив, повышению скорости метаболизма изониазида.

Наибольшее клиническое значение для выбора дозы изониазида при лечении туберкулеза имеют полиморфизмы NAT2: *5, *6, *7, *11, *12, *13. Полиморфные варианты гена NAT2 *11, *12 и *13 ассоциированы с повышенной скоростью метаболизма изониазида [9, 10], в то время как аллельные варианты NAT2 *5, *6, *7 — с замедленной скоростью ацетилирования [11, 12].

Скорость ацетилирования генотипа определяется совокупностью аллелей: быстрые ацетиляторы — носители двух быстрых аллелей; промежуточные — носители одной быстрой и одной медленной аллели; медленные — носители двух медленных аллелей. Следовательно, существует три фенотипа скорости реакции ацетилирования: быстрый, промежуточный и медленный.

При изучении географической распространенности фенотипов ацетилирования изониазида установлено, что европеоиды часто являются медленными ацетиляторами (58 %), реже промежуточными (34 %) и быстрыми — 8 %. Среди жителей Восточной Азии распространены быстрый и промежуточный типы ацетилирования, 40 % и 46 % соответственно, медленный тип встречается только в 14 % случаев. В Центральной и Южной Америке наиболее часто встречается промежуточный тип ацетилирования — 52 %, медленный и быстрый — 27 % и 21 % соответственно. На территории Африки одинаково часто встречаются медленный и про-

межуточный типы ацетилирования, у 46 % и у 40 % соответственно, быстрый тип — у 14 % [13].

Российская Федерация — многонациональная страна, распределение полиморфных вариантов гена NAT2 неравномерное. В европейской части России частота быстрых ацетиляторов составляет 5,4 %, промежуточных — 40,1 % и медленных — 54,5 % [5]. В Республике Саха (Якутия) якуты наиболее часто являются промежуточными ацетиляторами (58,3 %), реже медленными (22,7 %) и быстрыми (18,9 %). Среди татар и башкир, проживающих на территории Республики Башкортостан, наиболее распространены быстрый и промежуточный типы ацетилирования [14].

ПАТОГЕНЕЗ ИЗОНИАЗИД-ИНДУЦИРОВАННОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ

На основании исследований по изучению патогенеза гепатотоксичности изониазида выделяют несколько механизмов ее развития: митохондриальная дисфункция, окислительный стресс, активация иммунной системы [15, 16].

Гидразин в настоящее время считается одним из ключевых факторов, способствующих гепатотоксичности изониазида. Гепатотоксичность гидразина обусловлена его способностью смещать прооксидантно-антиоксидантное равновесие в сторону инициации активных форм кислорода, путем непосредственного участия гидразина в их генерации, нарушения цепи переноса электронов, вследствие чего митохондрии генерируют больше активных форм кислорода [17, 18]. Повышение в клетках печени активных форм кислорода инициирует свободнорадикальные процессы, которые способны нарушать целостность клеточных мембран и быть причиной гибели клеток.

Непосредственное влияние токсичных метаболитов изониазида на развитие лекарственного поражения печени хорошо изучено на моделях экспериментальных животных (крысах, кроликах), и не существует проверенной животной модели, которая полностью повторяла бы клиническую картину повреждения печени, вызванного изониазидом в организме человека. Однако установлено, что гидразин нарушает работу орнитинового цикла, о чем свидетельствуют нарушения в функционировании митохондрий: уменьшение концентрации цитрулина в моче у человека, истощение промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот в митохондриях и пула молекул аденозинтрифосфата, высвобождение внутриклеточной лактатдегидрогеназы [19, 20].

Гидразин и изониазид препятствуют энергетическому обмену в клетках печени, ингибируют митохондриальный комплекс II цепи переноса электронов, тем самым создают потенциально опасность возникновения коллапса энергетического гомеостаза. Коллапс энергетического гомеостаза может случиться, если по каким-то причинам будет нарушена функциональная целостность комплекса I цепи переноса электронов [21]. Следовательно, митохондриальная токсичность изониазида и его метаболитов оказывает прямое воздействие на энергетический гомеостаз или инициацию окислительного стресса, что приводит к гибели клеток.

Повреждение гепатоцитов при применении изониазида возникает при появлении аддуктов ковалентно связанных макромолекул с ацетилгидразином и гидразином. Метаболиты изониазида способны реагировать с остатками лизина на белках гепатоцитов [22]. Некоторые исследователи объясняют отсроченное начало повреждения печени с образованием модифицированных белков и появлением иммунного ответа [23]. Антитела IgG3 вырабатываются при появлении аддуктов изониазида и ацетилгидразина с белками, участвуют в активации комплемента и могут вызывать повреждение гепатоцитов [24].

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ ИЗОНИАЗИДА

Медленный тип ацетилирования — маркер гепатотоксичности изониазида. Медленные ацетиляторы недостаточно быстро ацетилируют изониазид, что приводит к увеличению концентрации препарата и его метаболитов — гидразина и ацетилгидразина в плазме крови [25].

Исследование корреляции между генотипами полиморфизмов гена NAT2 и фармакокинетикой изониазида показало, что концентрация изониазида в плазме выше в 4–6 раз у медленных ацетиляторов и они более подвержены токсическому воздействию данного лекарственного препарата [26].

В метаанализах и систематических обзорах были установлены ассоциативные связи между медленным типом ацетилирования изониазида и частотой гепатотоксических реакций [8, 27, 28]. Было показано, что у лиц, несущих аллельные варианты гена NAT2 в положениях 481C > T, 590G > A, 857G > A, наиболее часто развивались гепатотоксические реакции [29].

Установлено, что у медленных ацетиляторов, особенно в сочетании с рифампицином, значительно увеличивается гидролиз изониазида с образованием большого количества гидразина и, следо-

вательно, повышается риск поражения печени при лечении туберкулеза [30].

Сегодня устанавливается влияние полиморфизмов гена CYP2E1 фермента системы биотрансформации цитохрома P450 на риск развития изониазид-индуцированного поражения печени. Ген CYP2E1 локализован в локусе 10q24.3-qter, преимущественно экспрессируется в печени. Обнаружено более 100 полиморфизмов этого гена, представленных номенклатурой аллелей, хранящихся на веб-сайте <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2E1>. Некоторые полиморфные варианты гена CYP2E1 могут изменять активность фермента. Существуют 3 основных генотипа CYP2E1, которые классифицируются как c1/c1 (дикий тип), c1/c2 и c2/c2 [5].

В метаанализе S. Yang и соавторов (2019) установлена взаимосвязь между частотой развития гепатотоксических реакций и носительством генотипа c1/c1 гена CYP2E1 при применении изониазида. Есть мнение, что более высокая активность фермента CYP2E1 (дикий тип) связана с повышенным риском поражения печени вследствие избыточного образования токсических метаболитов изониазида. Вероятно, метаболиты изониазида, полученные посредством окисления CYP2E1, стимулируют процесс β -окисления митохондрий и увеличивают накопление желчных кислот [31]. Однако прямых доказательств роли CYP2E1 в метаболизме и биоактивации гидразина нет.

Образующиеся при участии фермента CYP2E1 токсичные метаболиты могут быть обезврежены ферментом GST. GST осуществляет конъюгацию сульфгидрильной группы глутатиона с ксенобиотиками или их метаболитами, образовавшимися в I фазе биотрансформации [32].

В организме человека различают 7 классов цитозольных ферментов GST (α , μ , π , θ , σ , ω , ζ), в которые входят 17 изоформ фермента. Каждый из которых кодируется отдельным геном или группой генов, расположенных на разных хромосомах. Наиболее изученными являются делеционные полиморфизмы генов GSTM1 и GSTT1. Ген GSTM1 располагается на коротком плече 1-й хромосомы (1p13.3), состоит из 8 экзонов и 7 интронов, является полиморфным. Особенностью гена GSTM1 является делеция его значительной части — около 16kb, захватывающая целиком ген GSTM1. Другой полиморфный ген — GSTT1, располагается на 22 хромосоме (22q11), состоит из 5 экзонов и 4 интронов, имеет более обширную делецию — 54-kb [33]. Делеционные полиморфизмы генов GSTM1 и GSTT1 проявляются снижением или полным отсутствием экспрессии соответствующих фермен-

тов, в результате чего в организме снижается активность глутатиона и повышается риск токсического поражения печени метаболитами изониазида [34]. В исследованиях изучалось влияние генотипов GSTM1 и GSTT1 на частоту развития нежелательных побочных реакций при применении изониазида, полученные данные были неоднозначными и противоречивыми.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря высокой эффективности в отношении *M. tuberculosis* и благоприятному профилю безопасности, изониазид на протяжении 70 лет остается препаратом выбора для химиотерапии и профилактики туберкулеза. Тем не менее, в клинической практике результаты лечения туберкулеза демонстрируют индивидуальные различия: у одних пациентов противотуберкулезная химиотерапия позволяет достичь желаемого терапевтического эффекта, у других она проявляется недостаточным ответом или его отсутствием, развитием нежелательных побочных реакций. Изониазид-индуцированное поражение печени продолжает оставаться серьезной проблемой в клинической практике, так как является причиной прекращения приема противотуберкулезных средств и ухудшения исхода лечения туберкулеза. Установлено, что изониазид-индуцированное поражение печени обусловлено полиморфизмами генов биотрансформации изониазида, в первую очередь мутацией гена фермента NAT2. В настоящее время во фтизиатрической практике не используются фармакогенетические исследования на носительство полиморфных вариантов гена NAT2. Авторы статьи считают, что для определения индивидуального профиля безопасности и разработки алгоритмов персонализированного применения изониазида фармакогенетическое тестирование необходимо включать в клиническую практику.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Клинические рекомендации «Туберкулез у взрослых» (2022), утвержденные Минздравом России. https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/16_2 (дата обращения 10.04.2022).
2. Wang P, Pradhan K, Zhong XB, et al. Isoniazid metabolism and hepatotoxicity. *Acta Pharm Sin B*. 2016;6(5):384–392. DOI:10.1016/j.apsb.2016.07.014.

3. Erwin ER, Addison AP, John SF, et al. Pharmacokinetics of isoniazid: The good, the bad, and the alternatives. *Tuberculosis (Edinb)*. 2019;116(l):66–70. DOI:10.1016/j.tube.2019.04.012.
4. Klein DJ, Boukouvala S, McDonagh EM, et al. PharmGKBsummary:isoniazidpathway,pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics*. 2016;26(9):436–444. DOI:10.1097/FPC.0000000000000232.
5. Snalina NE., Sychev DA. Genetic predictors of isoniazid hepatotoxicity. *Molecular Medicine* 2018;16(2):31–36. DOI:10.29296/24999490-2018-02-04. In Russian [Сналина Н.Е., Сычев Д.А. Генетические предикторы гепатотоксичности изониазида. *Молекулярная медицина*. 2018;16(2):31–36. DOI:10.29296/24999490-2018-02-04.]
6. Khan SR, Morgan AG, Michail K, et al. Metabolism of isoniazid by neutrophil myeloperoxidase leads to isoniazid-NAD⁺ adduct formation: a comparison of the reactivity of isoniazid with its known human metabolites. *Biochemical Pharmacology*. 2016;106:46–55. DOI:10.1016/j.bcp.2016.02.003.
7. Jarrar YB, Balasmeh AA, Jarrar W. Sequence analysis of the N-acetyltransferase 2 gene (NAT2) among Jordanian volunteers. *Libyan J Med*. 2018;13(1):1408381. DOI:10.1080/19932820.2017.1408381.
8. Khan S, Mandal RK, Elsbali AM, et al. Pharmacogenetic association between gene polymorphisms and isoniazid induced hepatotoxicity: trial sequence meta-analysis as evidence. *Biosci Rep*. 2019;39(1). DOI: 10.1042/BSR20180845.
9. Walraven JM., Zang Yu, et al. Structure/Function Evaluations of Single Nucleotide Polymorphisms in Human N-Acetyltransferase 2. *Curr Drug Metab*. 2008;9(6):471–486. DOI:10.2174/138920008784892065.
10. Zhu R, Kiser JJ, Seifart HI, et al. The pharmacogenetics of NAT2 enzyme maturation in perinatally HIV exposed infants receiving isoniazid. *J Clin Pharmacol*. 2012;52(4):511–519. DOI:10.1177/0091270011402826.
11. Zabost A, Brzezińska S, Kozińska M, et al. Correlation of N-Acetyltransferase 2 Genotype with Isoniazid Acetylation in Polish Tuberculosis Patients. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:853602. DOI:10.1155/2013/853602.
12. Yadav D, Kumar R, Dixit RK, et al. Association of NAT2 gene polymorphism with antitubercular drug-induced hepatotoxicity in the Eastern Uttar Pradesh population. *Cureus*. 2019;11(4):e4425. DOI:10.7759/cureus.4425.
13. Prikladnaya farmakogenetika: Monografiya. Pod redaktsiei D. A. Sycheva. Tver': Triada, 2021. P. 496. In Russian [Прикладная фармакогенетика: Монография/ Под ред. Д. А. Сычева. Тверь: Триада, 2021. С. 496.]

14. Peretolchina NP, Malov IV, Seminskiy IZh. Role of N-acetyltransferase 2 gene polymorphism in the human pathology. *Acta biomedica scientifica*. 2021;6(5):30–43. DOI:10.29413/ABS.2021-6.5.4 In Russian [Перетолчина Н.П., Малов И.В., Семинский И.Ж. Роль полиморфизма гена N-ацетилтрансферазы 2 в патологии человека. *Acta biomedica scientifica*. 2021;6(5):30–43. DOI:10.29413/ABS.2021-6.5.4.]
15. Metushi I, Uetrecht J, Phillips E. Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity: then and now. *Br J Clin Pharmacol*. 2016;81(6):1030–1036. DOI:10.1111/bcp.12885.
16. Boelsterli UA, Lee KK. Mechanisms of isoniazid-induced idiosyncratic liver injury: emerging role of mitochondrial stress. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29(4):678–87. DOI:10.1111/jgh.12516.
17. Hassan HM, Guo HL, Yousef BA. Hepatotoxicity mechanisms of isoniazid: A mini-review. *J Appl Toxicol*. 2015;35(12):1427–1432. DOI:10.1002/jat.3175.
18. Nanashima K, Mawatari T, Tahara N, et al. Genetic variants in antioxidant pathway: risk factors for hepatotoxicity in tuberculosis patients. *Tuberculosis (Edinb)*. 2012;92(3):253–259. DOI:10.1016/j.tube.2011.12.004.
19. Hussain SM, Frazier JM. Cellular toxicity of hydrazine in primary rat hepatocytes. *Toxicol Sci*. 2002;69(2):424–432. DOI:10.1093/toxsci/69.2.424.
20. Ghatineh S, Morgan W, Preece NE, et al. A biochemical and NMR spectroscopic study of hydrazine in the isolated rat hepatocyte. *Arch Toxicol*. 1992;66(9):660–668. DOI:10.1007/BF01981506.
21. Lee KK, Fujimoto K, Zhang C, et al. Isoniazid-induced cell death is precipitated by underlying mitochondrial complex I dysfunction in mouse hepatocytes. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:584–594. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.038.
22. Metushi IG, Cai P, Zhu X, et al. A fresh look at the mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(6):911–914. doi:10.1038/clpt.2010.355.
23. Meng X, Maggs JL, Usui T, et al. Auto-oxidation of Isoniazid Leads to Isonicotinic-Lysine Adducts on Human Serum Albumin. *Chem Res Toxicol*. 2015;28(1):51–58. DOI:10.1021/tx500285k.
24. Metushi IG, Lee WM, Uetrecht J. IgG3 is the dominant subtype of anti-isoniazid antibodies in patients with isoniazid-induced liver failure. *Chem Res Toxicol*. 2014;27(5):738–740. DOI:10.1021/tx500108u.
25. O'Connor, Brady MF. Isoniazid Courtney In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.
26. Kachanova AA, Pimenova YuA, Shuev GN, et al. Study of the effect of polymorphic markers of the NAT2 gene on the risk of adverse drug reactions in patients with pulmonary tuberculosis who received isoniazid and rifampicin. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii = Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2021;9(1):25–33. DOI:10.30895/2312-7821-2021-9-1-25-33. In Russian [Качанова А.А., Пименова Ю.А., Шув Г.Н. и др. Изучение влияния полиморфных маркеров гена NAT2 на риск развития нежелательных реакций у пациентов с легочными формами туберкулеза, получавших изониазид и рифампицин. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2021;9(1):25–33. DOI:10.30895/2312-7821-2021-9-1-25-33.]
27. Suvichapanich S, Fukunaga K, Zahroh H, et al. NAT2 ultraslow acetylator and risk of anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a genotype-based meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics*. 2018;28(7):167–176. DOI:10.1097/FPC.0000000000000339.
28. Zhang M, Wang S, Wilffert B, et al. The association between the NAT2 genetic polymorphisms and risk of DILI during anti-TB treatment: a systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(12):2747–2760. DOI:10.1111/bcp.13722.
29. Lei S, Gu R, Ma X. Clinical perspectives of isoniazid-induced liver injury. *Liver Research*. 2021;5(2):45–52. DOI: 10.1016/j.livres.2021.02.001.
30. Sotsuka T, Sasaki Y, Hirai S, et al. Association of isoniazid-metabolizing enzyme genotypes and isoniazid-induced hepatotoxicity in tuberculosis patients. *In Vivo*. Sep-Oct 2011;25(5):803–12.
31. Yang S, Hwang SJ, Park JY, et al. Association of genetic polymorphisms of CYP2E1, NAT2, GST and SLC01B1 with the risk of anti-tuberculosis drug-induced liver injury: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2019;9(8):e027940. Published 2019 Aug 1. DOI:10.1136/bmjopen-2018-027940.
32. Stepanova NA, Galimzyanov KM, Kantemirova BI. Intoxication syndrome in patients with pulmonary tuberculosis in relation to the system glutathione transferase gene polymorphism. *Journal Infectology*. 2017;9(2):13–16. DOI: 10.22625/2072-6732-2017-9-2-13-16. In Russian. [Степанова Н.А., Галимзянов К.М., Кантемирова Б.И. Синдром интоксикации у больных туберкулезом легких в зависимости от полиморфизма генов системы глутатионтрансфераз. *Журнал инфектологии*. 2017;9(2):13–16. DOI:10.22625/2072-6732-2017-9-2-13-16.]
33. Pourkeramati A, Zare Mehrjardi E, Dehghan Tezerjani M, et al. Association of GSTP1, GSTT1 and GSTM1 Gene Variants with Coronary Artery Disease in Iranian Population: A Case-Control Study. *Int J Gen Med*. 2020;13:249–259. Published 2020 May 28. DOI:10.2147/IJGM.S252552.
34. Leiro V, Fernández-Villar A, Valverde D, et al. Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 homozygous null mutations on the risk of antituberculosis

drug-induced hepatotoxicity in a Caucasian population. *Liver Int.* 2008;28(6):835–839. DOI:10.1111/j.1478-3231.2008.01700.x.

Информация об авторах:

Краснова Наталья Михайловна, к.м.н., доцент Медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова»;

Николаев Вячеслав Михайлович, к.б.н., старший научный сотрудник отдела эпидемиологии хронических неинфекционных заболеваний ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем».

Author information:

Krasnova Natalia M., Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Medical Institute of the M. K. Ammosov North-Eastern Federal University;

Nikolaev Vyacheslav M., PhD, Senior Researcher at the Department of Epidemiology of Chronic Non-Communicable Diseases of the Yakutsk Scientific Center for Complex Medical Problems.

ISSN 2782-3806
 ISSN 2782-3814 (Online)
 УДК 575.113:615.03

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ RS1004467 И RS11191548 ГЕНА *CYP17A1* СВЯЗАНЫ С РАННИМ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКИМ ОТВЕТОМ НА ТЕРАПИЮ РОЗУВАСТАТИНОМ

Кононов С. И.¹, Азарова Ю. Э.¹, Клёсова Е. Ю.¹, Быканова М. А.¹,
Кононова И. Н.², Полоников А. В.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курск, Россия

² Областное бюджетное учреждение здравоохранения «Курская городская клиническая больница скорой медицинской помощи», Курск, Россия

Контактная информация:

Кононов Станислав Игоревич,
 ФГБОУ ВО «Курский государственный
 медицинский университет» Минздрава
 России,
 ул. Карла Маркса, д. 3, Курск, Россия,
 305041.
 E-mail: ck325@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 02.05.2022
 и принята к печати 15.05.2022.

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Полиморфные варианты гена *CYP17A1* известны своей связью с риском развития ишемической болезни сердца (ИБС), артериальной гипертензии (АГ) и дислипидемии, уровнями половых гормонов, однако до настоящего времени не исследовались в контексте фармакогенетики. **Цель.** Изучить связь полиморфных вариантов rs1004467 и rs11191548 гена *CYP17A1* с эффективностью терапии розувастатином в отношении динамики изменения липидов плазмы крови и толщины комплекса интима-медиа (ТИМ) общей сонной артерии, а также исследовать ассоциации данных полиморфизмов с риском развития ИБС и АГ в российской популяции. **Материалы и методы.** В фармакогенетическое исследование включались 116 пациентов с ИБС: стабильной стенокардией напряжения, длительность наблюдения — 12 месяцев; в генетико-ассоциативное: 749 пациентов с ИБС и 737 — с АГ. Генотипирование выполнено по технологии iPLEX на геномном масс-спектрометре MassARRAY-4. **Результаты.** Оба исследованных полиморфизма не были ассоциированы с риском развития ИБС и АГ. Наиболее значимые ассоциации с ослабленной динамикой снижения ХС ЛНП наблюдались через 1 месяц терапии (у гомозигот по минорному аллелю обоих полиморфизмов, $p = 0,0002$), с динамикой триглицеридов — через 6 месяцев терапии (у гетерозигот по rs1004467 и rs11191548, $p = 0,0015$ и $0,0013$ соответственно). Ослабление регресса ТИМ за 6 месяцев наблюдения было ассоциировано с вариантом rs11191548 ($p = 0,034$). **Заключение.** В работе впервые установлены ассоциации полиморфных вариантов

rs1004467 и rs11191548 гена *CYP17A1* с эффективностью применения розувастатина, которые были наиболее значимы в раннем периоде терапии.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, комплекс интима-медиа, липопротеиды низкой плотности, полиморфизм, розувастатин, триглицериды, фармакогенетика, холестерин, *CYP17A1*.

Для цитирования: Кононов С.И., Азарова Ю.Э., Клёсова Е.Ю., Быканова М.А., Кононова И.Н., Полоников А.В. Полиморфные варианты rs1004467 и rs11191548 гена *CYP17A1* связаны с ранним гиполлипидемическим ответом на терапию розувастатином. *Российский журнал персонализированной медицины*. 2022;2(3):47-60. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-47-60

POLYMORPHISMS RS1004467 AND RS11191548 AT *CYP17A1* ARE ASSOCIATED WITH EARLY HYPOLIPIDEMIC RESPONSE TO ROSUVASTATIN THERAPY

Kononov S. I.¹, Azarova Yu. E.¹, Klyosova E. Yu.¹, Bykanova M. A.¹, Kononova I. N.², Polonikov A. V.¹

¹ Federal State Budget Educational Establishment of Higher Education "Kursk State Medical University" Ministry of Health Care of Russian Federation, Kursk, Russia

² Regional Budget Health Care Establishment "Kursk City Clinical Hospital of Emergency Medical Care", Kursk, Russia

Corresponding author:

Kononov Stanislav I.,
Kursk State Medical University,
Karl Marx str., 3, Kursk, Russia, 305041.
E-mail: ck325@yandex.ru

Received 02 May 2022; accepted 15 May 2022.

ABSTRACT

Background. Polymorphisms of the *CYP17A1* gene are known for their association with the risk of coronary artery disease (CAD), and essential hypertension (EH), dyslipidemia, and with the levels of sex hormones. However, pharmacogenetics aspects of these polymorphisms have not so far been investigated. **Objective.** To study the association of rs1004467 and rs11191548 variants at *CYP17A1* with the effectiveness of rosuvastatin therapy in terms of change in plasma lipids and carotid intima-media thickness (CIMT), and the association with the risk of CAD and EH in Russians. **Design and methods.** The pharmacogenetics study included 116 patients with CAD, stable angina pectoris, observation period was 12 months; genetic association study — 749 patients with CAD, 737 EH patients. Genotyping was performed using

the MassARRAY-4 system. **Results.** Both *CYP17A1* polymorphisms were not associated with CAD and EH risk. The most significant associations with the attenuated decrease in LDL-C were observed in 1 month of therapy (in variant homozygotes of both polymorphisms, $p = 0,0002$), and with triglyceride level change in 6 months (in heterozygotes of rs1004467 and rs11191548, $p = 0,0015$ и $0,0013$, respectively). Attenuated CIMT regression in 6 months was associated with rs11191548 variant ($p = 0,034$). **Conclusion.** We have found for the first time the associations of rs1004467 and rs11191548 of *CYP17A1* with the effectiveness of rosuvastatin therapy, and the associations were the strongest in the early period of treatment.

Key words: carotid intima-media thickness, cholesterol, coronary artery disease, *CYP17A1*, low-density lipoproteins, pharmacogenetics, polymorphism, rosuvastatin, triglycerides.

For citation: Kononov SI, Azarova IuE, Klyosova Elu, Bykanova MA, Kononova IN, Polonikov AV. Polymorphisms rs1004467 and rs11191548 at CYP17A1 are associated with early hypolipidemic response to rosuvastatin therapy. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(3):47-60. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-47-60

Список сокращений: АГ — артериальная гипертензия, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМТ — индекс массы тела, ОНП — однонуклеотидный полиморфизм, ОХС — общий холестерин плазмы крови, ТГ — триглицериды, ТИМ — толщина комплекса интима-медиа, ХС ЛВП — холестерин липопротеидов высокой плотности, ХС ЛНП — холестерин липопротеидов низкой плотности, eQTL — expression quantitative trait loci (англ., локусы, связанные с количественными изменениями в профиле экспрессии генов).

ВВЕДЕНИЕ

Персонализированный подход к лечению и профилактике сердечно-сосудистых заболеваний не теряет своей актуальности [1] ввиду сохранения этой категории болезней как ведущей причины смертности населения, как в целом в мире и Европе, так и в России, в частности. Согласно анализу структуры сердечно-сосудистого риска в Европе, Россия в настоящее время остается регионом с очень высоким риском, с уровнем сердечно-сосудистой смертности более 300 случаев на 100 тыс. населения [2]. Важной особенностью большого количества кардиологических пациентов является сочетание ишемической болезни сердца (ИБС), дислипидемии как одной из ее причин и артериальной гипертензии (АГ). Такое сочетание нозологий может объясняться не только общими факторами риска, но и влиянием общих генов. Проведено большое число исследований, вы-

явивших гены предрасположенности к ИБС и АГ. В частности, таковыми являются полиморфные варианты rs1004467 и rs11191548, расположенные в области гена *CYP17A1*, а также генов *NT5C2*, *CNNM2*, *AS3MT*, которые продемонстрировали ассоциации с уровнем артериального давления, риском развития артериальной гипертензии, а также с ответом на гипотензивную терапию [3, 4, 5, 6]. При этом первый из указанных однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) известен своей связью не только с АГ, но и с ИБС [7, 8] и дислипидемией [9]. В России проведено лишь одно исследование полиморфизма rs1004467, в котором установлена его связь с риском развития инсульта, но не выявлено ассоциаций с АГ, дислипидемией и толщиной комплекса интима-медиа (ТИМ) брахиоцефальных артерий [10]. В отношении rs11191548 в России проведены 2 исследования, в которых не было получено статистически значимых ассоциаций с АГ [11, 12], исследования же ассоциаций с уровнями липидов плазмы, риском ИБС и ТИМ не проводились.

Ген *CYP17A1* кодирует фермент 17 α -гидроксилазу/17,20-лиазу, принимающий участие в синтезе кортикостероидов и половых гормонов, в частности, дигидроэпиандростерона, недостаток которого, как известно, способствует развитию дисфункции эндотелия, атерогенезу и метаболическим нарушениям [10]. Вариант rs1004467 ассоциирован с действием половых гормонов еще при внутриутробном развитии, что проявляется в его ассоциации с длиной второго и четвертого пальцев кисти

[13], а также с уровнем общего холестерина (ОХС) [9]. В литературе отсутствуют данные о фармакогенетических исследованиях полиморфных вариантов rs1004467 и rs11191548 при лечении статинами, хотя проведение таковых представляется актуальным, учитывая их связь с ИБС и АГ, липидами плазмы крови. Таким образом, целью настоящего исследования явилось установление связи полиморфных вариантов rs1004467 и rs11191548 в области гена *CYP17A1* с риском развития ИБС и АГ, а также оценка влияния полиморфизмов на динамику изменения липидов плазмы крови и толщины комплекса интима-медиа общих сонных артерий у пациентов с ИБС, получающих терапию розувастатином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Описание выборки. В рамках настоящей работы выполнены генетико-эпидемиологическое и фармакогенетическое исследования. В последнее было включено 116 пациентов, страдающих ИБС: стабильной стенокардией напряжения II–III функциональных классов с наличием дислипидемии, определяемой по уровням ОХС более 4,0 ммоль/л и уровню холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛНП) более 1,8 ммоль/л в соответствии с Российскими рекомендациями по лечению и профилактике нарушений липидного обмена V пересмотра, которые действовали на момент сбора материала. Диагноз стабильной стенокардии напряжения устанавливался на основании клинических данных, данных нагрузочных проб (тредмил-тест или велоэргометрия), а также суточного ЭКГ-мониторирования. Средний возраст пациентов составил $61,0 \pm 7,25$ года (среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение), мужчины и женщины соотносились в пропорции 73:27 %, средний индекс массы тела (ИМТ) составил $28,8 \pm 4,2$ кг/м², большинство пациентов — 113 (97,5 %) страдали сопутствующей гипертонической болезнью. Стартовые показатели липидного обмена составляли: 5,28 (4,61; 6,03) ммоль/л для ОХС (данные представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей), 3,27 (2,70; 4,08) ммоль/л для ХС ЛНП, 1,06 (0,97; 1,28) ммоль/л для холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛВП), и 1,68 (1,22; 2,37) ммоль/л для триглицеридов (ТГ). Стартовые показатели ТИМ составили 0,80 (0,60; 1,00) мм для максимальной и 0,70 (0,55; 0,85) мм для средней ТИМ. В генетико-эпидемиологическое исследование, кроме описанной выше выборки пациентов ($n = 116$), было включено 633 пациента с ИБС (включающей стабильную стенокардию напряжения и перенесенный инфаркт

миокарда, средний возраст $59,9 \pm 8,8$ года, средний ИМТ — $29,9 \pm 6,0$ кг/м²), а также 403 относительно здоровых человека (средний возраст $60,4 \pm 8,1$ года, средний ИМТ $27,0 \pm 4,5$ кг/м²) (всего 1152 лица, из них 749 пациентов с ИБС) из биобанка НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии Курского государственного медицинского университета, данные о которых были накоплены в ранее проведенных генетических исследованиях [14, 15, 16, 17]. Расширение объема выборки позволило увеличить мощность исследования для анализа ассоциаций генотипов с риском развития ИБС и с показателями липидного обмена и ТИМ. Для анализа ассоциаций ОНП с риском развития АГ были доступны данные 737 пациентов, страдающих гипертонической болезнью (средний возраст — $60,9 \pm 9,0$ лет, средний ИМТ — $29,6 \pm 5,9$ кг/м²; в их число вошли 113 пациентов из 116, включенных в фармакогенетическое исследование, имеющие сопутствующую гипертоническую болезнь), и данные ранее указанных относительно здоровых лиц, накопленные в биобанке НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии. Все участники исследования являлись жителями Центральной России славянского происхождения.

Дизайн фармакогенетического исследования. Фармакогенетическое исследование являлось проспективным, в него включались пациенты, ранее регулярно не принимавшие статины. Пациентам рекомендовалась диета со сниженным содержанием насыщенных жиров. Розувастатин назначался в стартовой дозе 5 мг в сутки для достижения целевых показателей липидного обмена (ОХС менее 4,0 ммоль/л, ХС ЛНП менее 1,8 ммоль/л) согласно Российским рекомендациям V пересмотра по диагностике и коррекции нарушений липидного обмена. Липидный спектр оценивался через 1 месяц, при достижении целевых показателей пациент продолжал принимать препарат в указанной дозе с контролем липидных показателей через 6 и 12 месяцев терапии. При недостижении целевых показателей доза последовательно повышалась до 10–20–40 мг в сутки с контролем 1 раз в месяц.

Лабораторные и инструментальные исследования. Для оценки липидного состава проводился забор венозной крови из кубитальной вены после 12-часового голодания и легкого ужина накануне. Уровни ОХС и ТГ определялись энзиматическим методом на автоматическом лабораторном анализаторе Vitalab Flexor E (Vital Scientific, Нидерланды) с использованием реагентов производства компании Analyticon® Biotechnologies AG (Германия).

Содержание ХС ЛВП определялось прямым иммунотурбидиметрическим методом без предварительного осаждения с использованием реагентов производства Roche Diagnostics (Германия) на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas с 311 (Германия). Уровень ХС ЛНП рассчитывался по формуле Фридвальда при условии уровня ТГ не более 4,5 ммоль/л.

Дуплексное сканирование сонных артерий выполнялось в В-режиме линейным датчиком ультразвукового разрешения на ультразвуковой системе MyLab™ 40 (Esaote, Нидерланды). Толщина комплекса интима-медиа измерялась с обеих сторон в дистальной трети общей сонной артерии на 1–1,5 см проксимальнее бифуркации по задней стенке как расстояние между первой и второй эхопозитивными линиями [18, 19]. Оценивались два показателя — максимальная ТИМ (максимальное значение из всех измерений с обеих сторон) и средняя ТИМ (среднее арифметическое из всех измерений с обеих сторон); в дальнейшем эти показатели оценивались в динамике — через 6 и 12 месяцев терапии.

Анализ генетических ассоциаций. Полиморфизм rs1004467 гена *CYP17A1* был отобран для настоящего исследования в связи с его ассоциацией с ИБС [7, 8], АГ [4, 20, 21] и липидами плазмы крови [9]. Также принято во внимание влияние полиморфизма rs1004467 на функцию *CYP17A1* — метаболизм половых гормонов (в основном, дигидроэпиандростерона) и его потенциальное участие в обмене холестерина [10, 13, 22]. Известно, что полиморфный вариант rs11191548 ассоциирован с артериальной гипертензией [5, 6, 21].

ДНК из венозной крови выделялась стандартным методом фенол-хлороформной экстракции и преципитации этанолом. Генотипирование проводилось по технологии iPLEX на геномном масс-спектрометре MassARRAY-4 производства компании Agena Bioscience (США). Программное обеспечение MassARRAY Assay Design Suite (<https://agenasx.com>) использовалось для дизайна мультиплексной панели генотипирования ОНП.

Статистический анализ. Данные проверялись на соответствие их распределения нормальному закону распределения по критериям Колмогорова-Смирнова и Лиллиефорса, Шапиро-Уилка. Показатели липидного обмена и ТИМ характеризовались распределением, отличным от нормального, и представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей. Статистическая значимость изменения уровней липидов и ТИМ за время терапии препаратом оценивалась с помощью критерия

Вилкоксона для парных сравнений. Соответствие распределения генотипов закону Харди-Вайнберга определялось в соответствии с точным критерием Фишера. Для оценки влияния генотипа на уровни липидов и ТИМ, их динамику использован линейный регрессионный анализ трансформированных переменных. Тестируются генетические модели: доминантная, рецессивная, кодоминантная, сверхдоминантная, лог-аддитивная. Ассоциации ОНП с фенотипами оценивались с поправкой на пол, возраст, ИМТ, дозу розувастатина. Связь генотипов с риском развития заболеваний рассчитана методом логистического регрессионного анализа с поправкой на пол, возраст, ИМТ. Результаты всех расчетов считались статистически значимыми при значении $p < 0,05$. Статистическая обработка данных выполнялась с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) и онлайн-инструмента SNPStats (<https://SNPstats.net>) [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение генотипов обоих исследованных полиморфных вариантов — rs1004467 ($p = 0,45$) и rs11191548 ($p = 0,25$) — соответствовало закону Харди-Вайнберга.

Оценивалось наличие ассоциаций генотипов по изучаемым ОНП с риском развития ИБС и АГ. В отношении как ИБС ($p = 0,65$ и $0,19$ для rs1004467 и rs11191548 соответственно), так и АГ ($p = 0,75$ и $0,54$ для rs1004467 и rs11191548 соответственно, дополнительно с поправкой на наличие ИБС) статистически значимых ассоциаций в исследованной нами российской популяции обнаружено не было.

Среди пациентов, страдающих ИБС, оценивалось наличие ассоциаций с уровнями липидов плазмы крови и ТИМ вне гиполипидемической терапии (доступны данные ОХС для 637 пациентов, ХС ЛНП — для 414, ХС ЛВП — для 421, ТГ — для 489 пациентов). Уровень ОХС составил 5,6 (4,79; 6,20) ммоль/л, ХС ЛНП — 2,00 (1,35; 2,75) ммоль/л, ХС ЛВП — 1,36 (1,10; 1,70) ммоль/л, ТГ — 3,04 (1,80; 3,82) ммоль/л. Результаты анализа ассоциаций генотипа с уровнями липидов представлены в таблице 1.

Значимые ассоциации были установлены только для полиморфного варианта rs1004467 — у носителей минорного аллеля G с высоким уровнем ХС ЛНП ($p = 0,033$) и более низким уровнем ХС ЛВП ($p = 0,042$). ОНП rs11191548 статистически значимых ассоциаций с уровнями липидов плазмы не показал. В отношении ТИМ как полиморфный вариант rs1004467 ($p = 0,22$ и $0,18$ для средней и максимальной ТИМ соответственно), так и rs11191548 ($p =$

Таблица 1. Связь полиморфных вариантов rs1004467 и rs11191548 гена CYP17A1 со стартовыми уровнями липидов плазмы крови

Ген (ОНП)	Генотип	Частоты генотипов		Значение уровней липидов
		N	%	Ме (Q1; Q3)
ОХС				
CYP17A1 rs1004467 (A>G)	A/A	470	73,8	5,64 (4,69; 6,2)
	A/G	158	24,8	5,5 (4,94; 6,28)
	G/G	9	1,4	5,15 (4,99; 5,82)
CYP17A1 rs11191548 (T>C)	T/T	493	77,5	5,65 (4,7; 6,2)
	T/C	138	21,7	5,5 (4,92; 6,18)
	C/C	5	0,8	5,5 (4,99; 5,82)
ХС ЛНП				
CYP17A1 rs1004467 (A>G)	A/A	296	71,5	1,90 (1,29; 2,66)
	A/G	111	26,8	2,00 (1,49; 3,00)
	G/G	7	1,7	2,24 (2,00; 2,40)
CYP17A1 rs11191548 (T>C)	T/T	314	76,0	1,9 (1,3; 2,7)
	T/C	94	22,8	2,0 (1,48; 2,99)
	C/C	5	1,2	2,3 (2,24; 2,4)
ХС ЛВП				
CYP17A1 rs1004467 (A>G)	A/A	301	71,5	1,4 (1,14; 1,7)
	A/G	113	26,8	1,32 (1,1; 1,58)
	G/G	7	1,7	1,14 (0,93; 1,89)
CYP17A1 rs11191548 (T>C)	T/T	319	76,0	1,4 (1,13; 1,7)
	T/C	96	22,8	1,32 (1,08; 1,59)
	C/C	5	1,2	1,14 (1,01; 1,6)
ТГ				
CYP17A1 rs1004467 (A>G)	A/A	352	72,0	3,08 (1,84; 3,83)
	A/G	130	26,6	2,88 (1,62; 3,82)
	G/G	7	1,4	2,47 (2,41; 3,25)
CYP17A1 rs11191548 (T>C)	T/T	372	76,2	3,06 (1,85; 3,83)
	T/C	111	22,8	2,8 (1,55; 3,82)
	C/C	5	1,0	2,45 (2,41; 3,0)

* - значение p с поправкой на пол, возраст, индекс массы тела.

ОНП — однонуклеотидный полиморфизм; ОХС — общий холестерин, ХС ЛНП — холестерин липопротеидов низкой плотности, ХС ЛВП — холестерин липопротеидов высокой плотности, ТГ — триглицериды; Me (Q1; Q3) — медиана (первый-третий квартили)

0,23 и 0,23 для средней и максимальной ТИМ соответственно) не показали статистически значимых ассоциаций.

По результатам фармакогенетического исследования установлено статистически значимое снижение уровня ОХС по прошествии 1 месяца терапии розувастатином (-28,57 (-38,48; -19,84) % от исходного значения, $p < 0,0001$), а также 6 (-36,8 (-44,84;

-27,8) %, $p < 0,0001$) и 12 месяцев (-35,87 (-43,17; -29,47) %, $p < 0,0001$). Также значимая динамика имела место для ХС ЛНП (-41,45 (-53,53; -29,06) %, -52,53 (-60,38; -40,62) %, -50,0 (-60,26; -40,09) % для 1, 6 и 12 месяцев терапии соответственно, p на всех точках $< 0,0001$) и ТГ (-14,71 (-38,25; 0,69) %, -17,41 (-37,13; -2,78) %, -24,15 (-39,26; -5,62) % для 1, 6 и 12 месяцев терапии соответственно, p на всех точках

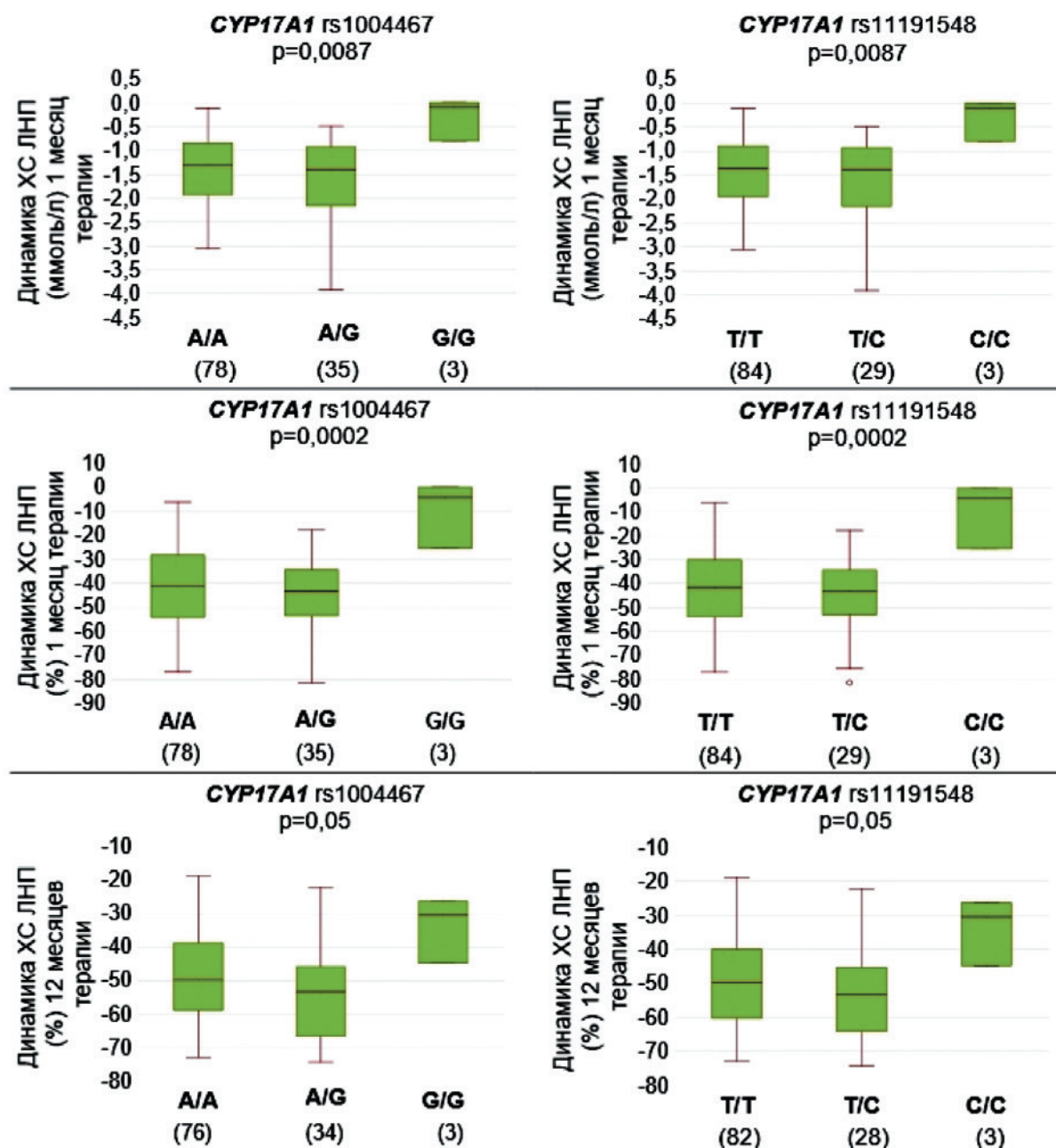


Рис. 1. Ассоциации полиморфных вариантов rs1004467 и rs11191548 с динамикой изменения уровней холестерина липопротеидов низкой плотности у пациентов с ИБС при лечении розувастатином

$< 0,0001$). Динамика ХС ЛВП была статистически незначимой ($-1,17$ ($-13,16$; $12,5$) %, 0 ($-15,15$; $7,27$) %, $1,85$ ($-12,83$; $13,32$) % для 1, 6 и 12 месяцев терапии соответственно, $p = 0,42$, $0,16$ и $0,87$ соответственно). На конечной точке (12 месяцев от начала терапии) исследование завершили 113 человек (97,4 %).

Затем нами были оценены ассоциации исследуемых полиморфизмов с динамикой уровней липидов (в абсолютных значениях — ммоль/л и в относительных — в %) на контрольных точках исследования. Все уровни значимости представлены с поправкой на пол, возраст, ИМТ и дозу розувастатина. В отношении ОХС ассоциаций не было, как для rs1004467 ($p = 0,34$ и $0,33$ для абсолютной и относительной динамики за 1 месяц терапии, $p = 0,55$ и $0,58$ за 6 месяцев, $p = 0,73$ и $0,7$ за 12 месяцев терапии соответственно), так и для второго исследованного варианта rs11191548 ($p = 0,4$ и $0,33$ для абсолютной и относительной динамики за 1 месяц терапии, $p = 0,86$ и $0,58$ за 6 месяцев, $p = 0,73$ и $0,82$ за 12 месяцев терапии соответственно). Значительно более выраженные ассоциации были обнаружены в отношении связи исследованных ОНП с дина-

микой ХС ЛНП, в особенности, по итогам первого месяца терапии (см. рис. 1).

Данные представлены в виде диаграмм размаха, где горизонтальная линия отражает медиану, «ящик» — нижний и верхний квартили для динамики холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛНП) в абсолютных (ммоль/л) или относительных (%) значениях, как отмечено на графиках. В скобках указано число пациентов с представленными генотипами

По итогам 1 месяца лечения имело место наличие ассоциаций обоих ОНП как с динамикой изменения ХС ЛНП в ммоль/л ($p = 0,0087$ для обоих полиморфных вариантов), так и с динамикой, выраженной в относительных значениях — % от исходного уровня ($p = 0,0002$ для обоих полиморфизмов), — более слабый гиполипидемический эффект препарата был характерен для гомозигот по редкому аллелю — rs1004467-G/G и rs11191548-C/C (см. рис. 1). Впоследствии по прошествии 6 месяцев терапии отмечалось более выраженное снижение уровня ХС ЛНП (в ммоль/л) у гетерозигот rs1004467-A/G ($p = 0,045$), при этом значимой связи

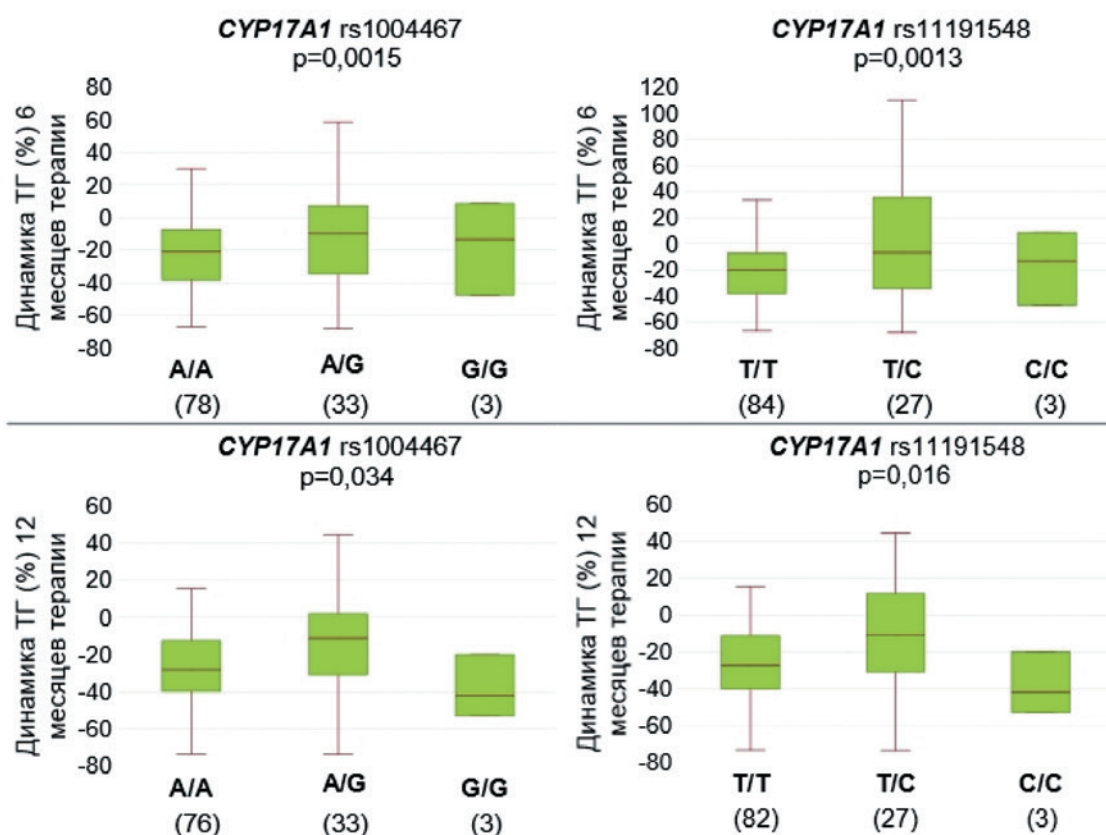


Рис. 2. Ассоциации полиморфных вариантов rs1004467 и rs11191548 с динамикой изменения уровней триглицеридов у пациентов с ИБС при лечении розувастатином

с rs11191548 не было ($p = 0,17$). Изменение ХС ЛНП за 6 месяцев терапии, выраженное в %, не было ассоциировано с генотипом по обоим вариантам ($p = 0,16$ и $0,27$ для rs1004467 и rs11191548 соответственно). По итогам 12 месяцев терапии для гетерозигот rs1004467-A/G сохранилась связь с абсолютной динамикой ХС ЛНП в виде более выраженного гиполлипидемического эффекта (сверхдоминирование, $p = 0,032$) при отсутствии значимой ассоциации для второго варианта rs11191548 ($p = 0,11$). И наконец, при оценке связи относительной динамики ХС ЛНП за 12 месяцев терапии с генотипом вновь сработала рецессивная модель — ассоциация с ослабленным эффектом, зарегистрированная на начальном этапе терапии (1 месяц), повторилась вновь — гомозиготы по вариантным аллелям обоих полиморфизмов характеризовались менее выраженным снижением уровня ХС ЛНП (в % от исходного уровня) в сравнении с носителями аллелей «дикого» типа, однако с пограничным уровнем значимости ($p = 0,05$ для обоих вариантов; см. рис. 1). Таким образом, гиполлипидемический эффект розувастатина (в отношении ХС ЛНП) в исследовании продемонстрировал свою зависимость от генотипов *CYP17A1* пациентов, как это было видно в постепенном снижении уровня статистической значимости от 1 месяца ($p = 0,0002$) к 12 месяцам терапии ($p = 0,05$). Данная закономерность может указывать на генетическую детерминированность именно раннего ответа на лекарственную терапию со стороны ХС ЛНП.

Также нами были обнаружены ассоциации исследованных ОНП с динамикой триглицеридов плазмы крови. В отличие от ХС ЛНП, первый ме-

сяц терапии не отличился связью с динамикой ТГ ($p = 0,17$ и $0,16$ для rs1004467, $p = 0,21$ и $0,23$ для rs11191548 в отношении абсолютной и относительной динамики ТГ соответственно). Однако изменения имели место по итогам 6 месяцев терапии: носители вариантных аллелей обоих ОНП (rs1004467-G и rs11191548-C, доминантная модель) характеризовались ослабленным гиполлипидемическим эффектом розувастатина в отношении ТГ в абсолютных числах (в ммоль/л; $p = 0,031$ и $0,036$ для rs1004467 и rs11191548 соответственно). Для динамики изменений ТГ, выраженной в %, наиболее статистически значимой была модель сверхдоминирования — гетерозиготы по обоим полиморфизмам характеризовались ослабленным регрессом уровней ТГ в крови ($p = 0,0015$ и $0,0013$ для первого и второго вариантов соответственно; см. рис. 2). Эффект сверхдоминирования также наблюдался относительно динамики ТГ по итогам 12 месяцев терапии ($p = 0,034$ и $0,016$ для rs1004467 и rs11191548 соответственно; см. рис. 2). Абсолютная динамика ТГ по итогам 12 месяцев терапии не ассоциировалась с носительством изученных полиморфных вариантов ($p = 0,12$ и $0,1$ для rs1004467 и rs11191548 соответственно).

Данные представлены в виде диаграмм размаха, где горизонтальная линия отражает медиану, «ящик» — нижний и верхний квартили для динамики триглицеридов (ТГ) в относительных значениях (%). В скобках указано число пациентов с представленными генотипами

При оценке изменения толщины комплекса интима-медиа установлена статистически значимая

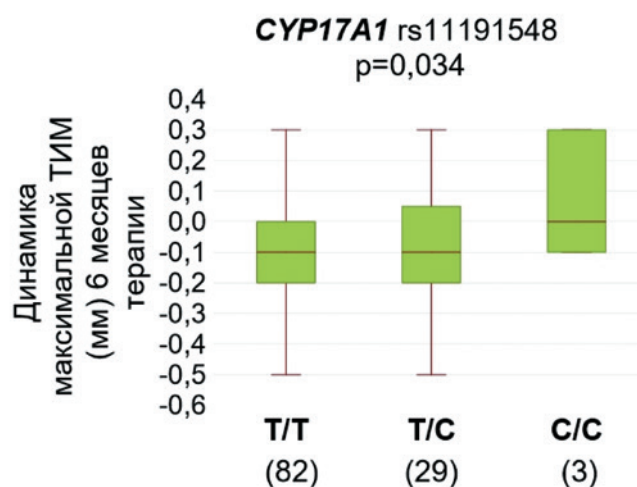


Рис. 3. Ассоциация полиморфного варианта rs11191548 с динамикой изменения максимальной толщины комплекса интима-медиа общей сонной артерии у пациентов с ИБС при лечении розувастатином

динамика ее уменьшения за время наблюдения. Изменение максимальной ТИМ за 6 месяцев составило $-0,10$ ($-0,20-0$) мм ($p < 0,0001$), за 12 месяцев $-0,10$ ($-0,25-0$) мм ($p < 0,0001$). Изменение средней ТИМ за 6 месяцев составило $-0,05$ ($-0,15-0,07$) мм ($p = 0,025$), за 12 месяцев $-0,07$ ($-0,15-0,02$) мм ($p < 0,0001$).

Мы оценили ассоциации генотипов с динамикой изменения ТИМ. Обнаружена статистически значимая связь полиморфного варианта rs11191548 с динамикой максимальной ТИМ по итогам 6 месяцев наблюдения ($p = 0,034$, аддитивная модель; см. рис. 3).

Данные представлены в виде диаграмм размаха, где горизонтальная линия отражает медиану, «ящик» — нижний и верхний квартили для динамики максимальной толщины комплекса интима-медиа (ТИМ) в миллиметрах (мм). В скобках указано число пациентов с представленными генотипами

Ассоциация данного ОНП с динамикой средней ТИМ за тот же период наблюдения ($p = 0,12$), а также с динамикой ТИМ за 12 месяцев терапии ($p = 0,21$ и $0,23$ для максимальной и средней ТИМ соответственно) была незначимой. В отношении rs1004467 связи с динамикой ТИМ выявить не удалось ($p = 0,11$ и $0,12$ за 6 месяцев, $p = 0,46$ и $0,23$ за 12 месяцев терапии для максимальной и средней ТИМ соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании впервые установлено, что полиморфные варианты rs1004467 и rs11191548 гена *CYP17A1* представляют собой фармакогенетические маркеры, влияющие на эффективность гиполипидемической терапии розувастатином в отношении динамики изменения липидов плазмы крови и ТИМ. Ген *CYP17A1* экспрессируется преимущественно в надпочечниках, в печени же уровень экспрессии мРНК невысок, а белок, кодируемый данным геном, в печени не экспрессируется [24]. Рассматривая роль гена *CYP17A1* в организме, стоит указать на то, что данный ген кодирует фермент с двойной активностью: 17 α -гидроксилазу/17,20-лиазу, который является ключевым регулятором биосинтеза андрогенов, конвертируя прегненолон в 17-гидроксипрегненолон и дигидроэпиандростерон, а также прогестерон в 17-гидроксипрогестерон и андростендион в надпочечниках и тека-клетках яичников. Прегненолон образуется из холестерина под действием CYP11A1 [25]. Из литературы известна связь полиморфных вариантов rs1004467 и rs11191548 гена *CYP17A1* со сниженным уровнем общего холестерина плазмы крови [9]. В нашем исследовании связи ОНП

с ОХС обнаружено не было, однако была установлена ассоциация rs1004467 с повышенными уровнями ХС ЛНП и сниженными — ХС ЛВП. Упомянутое выше исследование является единственным, в котором была установлена связь rs1004467 с дислипидемией, и проводилось оно в китайской популяции Хань, в России же в исследовании С. Ю. Никулиной и соавторов (2018) связи данного ОНП с дислипидемией обнаружено не было [10]. При этом по данным проекта «1000 геномов» существуют значительные различия в частоте минорного аллеля между указанной китайской популяцией (36,4 %) и европейской популяцией (9,4 %) [26]; в настоящем же исследовании частота минорного аллеля rs1004467-G составила 14 %.

Нами также установлено влияние минорных аллелей обоих исследованных полиморфизмов на динамику холестерина ЛНП при лечении розувастатином в виде ослабления гиполипидемического действия препарата у вариантных гомозигот (rs1004467-GG и rs11191548-CC) через 1 месяц от начала терапии, в последующем к 6 и 12 месяцам терапии такой эффект нивелировался и проявлялся только в виде гиполипидемического действия у гетерозигот (rs1004467-GA), и ассоциация ослаблялась к 12 месяцам терапии. Другими словами, имела место вариабельность ответа на терапию преимущественно в раннем периоде назначения препарата. Аналогичная ассоциация наблюдалась с динамикой максимальной ТИМ, но только для ОНП rs11191548 в виде ослабления регресса ТИМ у носителей минорного аллеля rs11191548-C по прошествии первых 6 месяцев наблюдения.

Однозначно объяснить влияние ОНП на динамику липидов и ТИМ не представляется возможным, однако можно предположить, что участие *CYP17A1* в метаболизме половых гормонов способно оказывать влияние на изменение липидных показателей. Так, известно, что при носительстве вариантного аллеля rs1004467-G имеет место снижение соотношения длины 2 пальца правой руки к четвертому, что предполагает повышенный уровень андрогенов и сниженный уровень эстрогенов еще во внутриутробном развитии. В целом, мужчины характеризуются большей длиной безымянного пальца по отношению к указательному, а женщины наоборот, что объясняется действием половых гормонов на плод [13]. Известно, что мужчины с генотипом rs1004467-GG характеризуются более высоким уровнем тестостерона и дигидротестостерона, что, возможно, находит отражение в большей встречаемости у таких лиц рака предстательной железы [22], который также ассоциирован со снижением вышеупомянутого соотношения второго пальца к чет-

вертому [27]. Наряду со связью описанного ОНП с уровнями гормонов, он также связан со сниженными уровнями ОХС [9] и сниженным риском развития артериальной гипертензии [28]. Это не доказывает прямого влияния полиморфизма на липиды через CYP17A1, но и не исключает его.

Следующим вопросом, возникающим при обсуждении результатов, является вопрос о возможности уже самих статинов влиять на CYP17A1. Известна способность статинов снижать сыровоточные уровни андрогенов у пациенток с поликистозом яичников. Авторы установили механизм такого эффекта на культуре тека-клеток, который заключался в ингибировании процесса изопренилирования, что приводило к снижению экспрессии (снижению уровней мРНК) CYP17A1 [25, 29]. Влияние непосредственно андрогенов на уровни холестерина и CYP17A1 было установлено в онкологии. Опухоль синтезирует андрогены для стимулирования ее собственного роста [30], кроме того, для опухолей характерен усиленный синтез холестерина, также ведущий к усилению их роста [31, 32, 33], при этом усиление синтеза андрогенов и синтеза холестерина связаны между собой посредством андрогенового рецептора и вовлечения сигнального пути: андрогеновый рецептор-SCAP-SREBPs-CYP17/ГМГ-КоА-редуктаза, что подтверждалось и клинически в виде синергизма статинов (ингибиторов ГМГ-КоА-редуктазы) и ингибиторов CYP17A1 в отношении подавления роста опухоли [34]. Разумеется, вышеизложенные данные в отношении опухолей нельзя экстраполировать на здоровые ткани организма, однако стоит принять во внимание связь половых гормонов и регуляции синтеза холестерина через CYP17A1, ГМГ-КоА-редуктазу и участие статинов в этом механизме. Подводя итог обсуждению возможных механизмов, лежащих в основе выявленных в настоящем исследовании ассоциаций, можно предположить, что установленная нами связь полиморфных вариантов *CYP17A1* с эффектом розувастатина может быть объяснена генетически обусловленными различиями активности и/или экспрессии CYP17A1 посредством его влияния на метаболизм половых гормонов [9, 22]. Исследованные ОНП ассоциированы с изменением экспрессии ряда генов в надпочечниках, сосудах (коронарные, большеберцовые артерии, аорта), в крови (данные портала GTEx, <https://gtexportal.org/home/>) [35]. К сожалению, данные об изменении экспрессии генов в печени (что актуально в связи с синтезом ХС, липопротеидов именно в этом органе) отсутствуют. Тем не менее, из известной информации можно сделать вывод о сходстве функциональных эффектов полиморфизмов

в связи с изменением экспрессии ряда одинаковых генов, ассоциированных с исследованными нами ОНП — *MARCKSLIP1*, *ARL3*, *NT5C2*, *USMG5*, *TMEM180*, *AS3MT*, *SFXN2*. Для варианта rs11191548 изменение экспрессии рядом расположенных генов является логичным в связи с его межгенным расположением (между генами *CNNM2* и *NT5C2*, рядом с *AS3MT*; данные FIVEh browser) [35]. Кроме того, принимая во внимание расположение rs11191548 в 3'-нетранслируемой области, вариант ассоциирован с рядом микро-РНК, связанных как с усилением (*hsa-miR-662*), так и с потерей мишени (*hsa-miR-4262*, *hsa-miR-181a-5p*, *hsa-miR-181b-5p*, *hsa-miR-181c-5p*, *hsa-miR-181d-5p*) по данным базы miRNASNP-v3 [36]. Таким образом, функциональные эффекты изученных ОНП реализуются через изменение экспрессии рядом расположенных генов, а также для rs11191548 — через функции микро-РНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании, проведенном среди пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца: стабильной стенокардией напряжения, впервые была продемонстрирована связь полиморфных вариантов rs1004467 и rs11191548 гена *CYP17A1* с динамикой изменения уровней липидов плазмы крови и толщины комплекса интима-медиа сонных артерий в течение 1 года лечения розувастатином. Генотип, а именно: носительство редких аллелей исследованных полиморфизмов (rs1004467-G и rs11191548-C) было связано с ослаблением гиполипидемического действия препарата в отношении ХС ЛНП и ТГ, при этом, наиболее выраженные различия в лекарственном ответе имели место на ранних сроках лечения — через 1 месяц после назначения препарата. Регресс ТИМ также отличался в зависимости от генотипа по полиморфному варианту rs11191548 в виде его ослабления также на относительно раннем для данного показателя сроке — через 6 месяцев наблюдения. Ранее заявленные ассоциации полиморфных вариантов с риском развития ИБС и АГ в настоящем исследовании не были подтверждены, однако была установлена связь полиморфизма rs1004467 со стартовыми уровнями липидов плазмы крови (ХС ЛНП, ХС ЛВП вне гиполипидемической терапии) у лиц, страдающих ишемической болезнью сердца.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Mirzaev KB, Fedorin DS, Ivashchenko DV, et al. Multi-Ethnic Analysis of Cardiac Pharmacogenetic Markers of Cytochrome p450 and Membrane Transporters Genes in the Russian Population. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2019;15(3):393–406. In Russian [Мирзаев К.Б., Федоринов Д.С., Иващенко Д.В. и др. Мультиэтнический анализ кардиологических фармакогенетических маркеров генов цитохрома P450 и мембранных транспортеров в российской популяции. *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии*. 2019;15(3):393–406.]
2. SCORE2 working group and ESC Cardiovascular risk collaboration. SCORE2 risk prediction algorithms: new models to estimate 10-year risk of cardiovascular disease in Europe. *Eur Heart J*. 2021;42(25):2439–2454.
3. Tabara Y, Kohara K, Kita Y, et al. Common variants in the ATP2B1 gene are associated with susceptibility to hypertension: the Japanese Millennium Genome Project. *Hypertension*. 2010;56(5):973–80.
4. Liu C, Li H, Qi Q, et al. Common variants in or near FGF5, CYP17A1 and MTHFR genes are associated with blood pressure and hypertension in Chinese Hans. *J Hypertens*. 2011 Jan;29(1):70–5. DOI: 10.1097/HJH.0b013e32833f60ab. PMID: 20852445.
5. Huber M, Lezius S, Reibis R, et al. A Single Nucleotide Polymorphism near the CYP17A1 Gene Is Associated with Left Ventricular Mass in Hypertensive Patients under Pharmacotherapy. *Int J Mol Sci*. 2015;16(8):17456–68.
6. Hamrefors V, Sjögren M, Almgren P, et al. Pharmacogenetic implications for eight common blood pressure-associated single-nucleotide polymorphisms. *J Hypertens*. 2012;30(6):1151–60.
7. Dai CF, Xie X, Yang YN, et al. Relationship between CYP17A1 genetic polymorphism and coronary artery disease in a Chinese Han population. *Lipids Health Dis*. 2015;14:16.
8. Dai CF, Xie X, Ma YT, et al. Haplotype analyses of CYP17A1 genetic polymorphisms and coronary artery disease in a Uyghur population. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2015;16(2):389–398.
9. Zhang N, Chen H, Jia J, et al. The CYP17A1 gene polymorphisms are associated with hypercholesterolemia in Han Chinese. *J Gene Med*. 2019;21(8):e3102.
10. Nikulina SY, Shulman VA, Chernova AA, et al. Role of Single Nucleotide Polymorphism of CYP17A Gene in the Development of Stroke. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2018;14(4):488–493. In Russian [Никилина С.Ю., Шульман В.А., Чернова А.А. и др. Роль однонуклеотидного полиморфизма гена CYP17A в развитии инсульта. *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии* 2018;14(4):488–493.]
11. Kanaeva MD, Glotov AS, Vashukova YeS, et al. Research of genetic markers in susceptibility to arterial hypertension in Russian Northwest Region children. *Ecological genetics*. 2013;11(2):34–40. In Russian [Канаева М.Д., Глотов А.С., Вашукова Е.С. и др. Исследование генетической предрасположенности к развитию артериальной гипертензии у детей Северо-Западного региона России. *Экологическая генетика*. 2013;11(2):34–40.]
12. Kiseleva AV, Klimushina MV, Tyupaeva SA, et al. Contribution of genetic markers and production factors in the development of arterial hypertension in men in an organized workers cohort of machine-building plant. *Russ J Cardiol*. 2017;10(150):55–60. In Russian [Киселева А.В., Климушина М.В., Тюпаева С.А. и др. Вклад генетических маркеров и производственных факторов в развитие артериальной гипертензии у мужчин в организованной когорте работников машиностроительного завода. *Российский кардиологический журнал*. 2017;10(150):55–60.]
13. Zhang J, Yang M, Luan P, et al. Associations Between Cytochrome P450 (CYP) Gene Single-Nucleotide Polymorphisms and Second-to-Fourth Digit Ratio in Chinese University Students. *Med Sci Monit*. 2021;27:e930591.
14. Solodilova MA, Medvedeva MV, Bykanova MA, et al. Polymorphism of the VEGFA gene, smoking and coronary heart disease: the significance of gene-environmental interactions for disease susceptibility. *Res. Results Biomed*. 2020;6(3):350–366.
15. Zvyagina MV, Mal GS, Bushueva OY, et al. Estimating the effectiveness of hypolipidemic therapy with rosuvastatin in patients with coronary heart disease depending on the genotype of lipoprotein lipase. *Eksp. Klin. Farmakol*. 2016;79(1):15–19.
16. Polonikov A, Kharchenko A, Bykanova M, et al. Polymorphisms of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 and risk of coronary heart disease in Russian population. *Gene*. 2017;627: 451–459.
17. Polonikov AV, Vialykh EK, Churnosov MI, et al. The C718T polymorphism in the 3'-untranslated region of glutathione peroxidase-4 gene is a predictor of cerebral stroke in patients with essential hypertension. *Hypertens. Res*. 2012;35(5):507–512.
18. Balakhonova TV, Tripoten' MI, Pogorelova OA. Ultrasonic methods for assessing the thickness of the intima-media complex of the arterial wall. *SonoAce-Ultrasound*. 2010;21:57–63. In Russian [Балахонова Т.В., Трипотень М.И., Погорелова О.А. Ультразвуковые методы оценки толщины комплекса интима-медиа артериальной стенки. *SonoAce-Ultrasound*. 2010;21:57–63.]
19. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, et al. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct

measurement with ultrasound imaging. *Circulation*. 1986;74(6):1399–1406.

20. German CA, Sinsheimer JS, Klimentidis YC, et al. Ordered multinomial regression for genetic association analysis of ordinal phenotypes at Biobank scale. *Genetic Epidemiology*. 2020;44(3):248–260.

21. Wei BL, Yin RX, Liu CX, et al. CYP17A1-ATP2B1 SNPs and Gene-Gene and Gene-Environment Interactions on Essential Hypertension. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:720884.

22. Poniah P, Mohamed Z, Apalasamy YD, et al. Genetic polymorphisms in the androgen metabolism pathway and risk of prostate cancer in low incidence Malaysian ethnic groups. *Int J Clin Exp Med*. 2015;10(8):8.

23. Solé X, Guinó E, Valls J, et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928–1929.

24. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.

25. Ortega I, Cress AB, Wong DH, et al. Simvastatin reduces steroidogenesis by inhibiting Cyp17a1 gene expression in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod*. 2012;86(1):1–9.

26. 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68–74.

27. Bunevicius A. The association of digit ratio (2D:4D) with cancer: A systematic review and meta-analysis. *Dis Markers*. 2018;2018:7698193.

28. Zhang N, Jia J, Ding Q, et al. Common variant rs11191548 near the CYP17A1 gene is associated with hypertension and the serum 25(OH) D levels in Han Chinese. *J Hum Genet*. 2018;63(6):731–37.

29. Sokalska A, Stanley SD, Villanueva JA, et al. Comparison of effects of different statins on growth and steroidogenesis of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod*. 2014;90(2):44.

30. Sun J, Wang D, Guo L, et al. Androgen Receptor Regulates the Growth of Neuroblastoma Cells in vitro and in vivo. *Front Neurosci*. 2017;11:116.

31. Allott EH, Howard LE, Cooperberg MR, et al. Serum lipid profile and risk of prostate cancer recurrence: Results from the SEARCH database. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23:2349–2356.

32. Munir MT, Ponce C, Powell CA, et al. The contribution of cholesterol and epigenetic changes to the pathophysiology of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;183:1–9.

33. Hashimoto M, Kobayashi K, Yamazaki M, et al. Cyp3a deficiency enhances androgen receptor activity and cholesterol synthesis in the mouse prostate. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;163:121–128.

34. Hu Z, Cheng C, Wang Y, et al. Synergistic Effect of Statins and Abiraterone Acetate on the Growth Inhibition of Neuroblastoma via Targeting Androgen Receptor. *Front Oncol*. 2021;11:595285.

35. GTEx Consortium. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science*. 2020;369(6509):1318–1330.

36. Liu CJ, Fu X, Xia M, et al. miRNASNP-v3: a comprehensive database for SNPs and disease-related variations in miRNAs and miRNA targets. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D1276–D1281.

Информация об авторах:

Кононов Станислав Игоревич, к.м.н., ассистент кафедры внутренних болезней № 2 ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Азарова Юлия Эдуардовна, к.м.н., доцент кафедры биохимии, заведующий лабораторией биохимической генетики и метаболомики НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Клёсова Елена Юрьевна, ассистент кафедры биологии, медицинской генетики и экологии, младший научный сотрудник лаборатории биохимической генетики и метаболомики НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Быканова Марина Алексеевна, к.б.н., ассистент кафедры биологии, медицинской генетики и экологии, научный сотрудник лаборатории геномных исследований НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Коконова Ирина Николаевна, врач-кардиолог ОБУЗ «Курская городская клиническая больница скорой медицинской помощи»;

Полоников Алексей Валерьевич, д.м.н., директор НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Author information:

Kononov Stanislav I., candidate of medical sciences, assistant lecturer of the Department of Internal Medicine N 2, Kursk State Medical University;

Azarova Yulia E., candidate of medical sciences, associate professor of the Department of Biochemistry; head of Laboratory of Biochemical Genetics and Metabolomics, Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology, Kursk State Medical University;

Klyosova Elena Yu., assistant lecturer of the Department of Biology, Medical Genetics and Ecology; junior researcher of Laboratory of Biochemical Genetics and Metabolomics, Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology, Kursk State Medical University

Bykanova Marina A., candidate of biological sciences, assistant lecturer of the Department of Biology, Medical Genetics and Ecology; researcher of Laboratory of Genomic Research, Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology, Kursk State Medical University;

Kononova Irina N., cardiologist of Kursk City Clinical Hospital of Emergency Medical Care;

Polonikov Alexey V., doctor of medical sciences, professor of the Department of Biology, Medical Genetics and Ecology; Head of Research Institute for Genetic and Molecular Epidemiology, Kursk State Medical University.

ISSN 2782-3806

ISSN 2782-3814 (Online)

УДК 575.17:616.12-008.1:615.03(=161.1)(=512.31)

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *CYP2C19* И КЛИНИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ПАЦИЕНТОВ РУССКОЙ И БУРЯТСКОЙ НАЦИОНАЛЬНОСТЕЙ, ПЕРЕНЕСШИХ СТЕНТИРОВАНИЕ КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ И ПРИНИМАВШИХ КЛОПИДОГРЕЛ

Зеленская Е. М.¹, Донирова О. С.², Воронина Е. Н.¹,
Ковалева А. Я.¹, Протасов К. В.³, Лифшиц Г. И.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Государственное автономное учреждение здравоохранения «Республиканская клиническая больница имени Н. А. Семашко» Министерства здравоохранения Республики Бурятия, Улан-Удэ, Россия

³ Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования — филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иркутск, Россия

Контактная информация:

Зеленская Елена Михайловна,
ФГБУН «Институт химической биологии
и фундаментальной медицины»
Сибирского отделения РАН,
пр. Академика Лаврентьева, д. 8,
Новосибирск, Россия, 630090.
E-mail: helenzlinsk@gmail.com

Статья поступила в редакцию 12.05.2022
и принята к печати 25.05.2022.

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Клопидогрел часто используется на амбулаторном этапе в составе двойной антитромботической терапии. Однако наличие аллелей гена *CYP2C19* rs4244285(*2) и rs4986893(*3) ассоциировано со снижением эффективности клопидогрела. Эти аллели встречаются с различной частотой у пациентов разной национальности, поэтому может различаться эффективность клопидогрела у этнических групп, проживающих в России. **Цель.** Оценить частоту встречаемости аллелей гена *CYP2C19*, их ассоциацию с клиническими исходами у русских и бурят, принимавших клопидогрел по поводу острого коронарного синдрома. **Материалы и методы.** В исследование включены 142 пациента бурятской национальности и 150 пациентов русской национальности, прошедших стент-

тирование коронарных сосудов по поводу острого коронарного синдрома. Все пациенты получали клопидогрел. Определены аллели *CYP2C19*2* и *CYP2C19*3*, оценены конечные точки эффективности, проведена оценка сопутствующей терапии омепразолом. **Результаты.** У бурят достоверно чаще встречаются аллель *CYP2C19*3* (11,6 % против 1,3 %, $p < 0,001$), чем у русских. У бурят выявлена ассоциация возобновления ангинозной боли при физических нагрузках с носительством хотя бы одного аллеля *CYP2C19*3* и/или *CYP2C19*2* ($p = 0,015$) а также с приемом омепразола ($p = 0,015$). У русских пациентов была выявлена ассоциация конечных точек эффективности при лечении клопидогрелом с носительством хотя бы одного аллеля *CYP2C19*2* и/или *CYP2C19*3* ($p = 0,036$). **Заключение.** Наличие минорных аллелей *CYP2C19*3* и *CYP2C19*2* и прием омепразола ассоциированы с жалобами на возобновление ангинозной боли при умеренных и незначительных физических нагрузках без изменений по ЭКГ и без повышения биохимических показателей повреждения миокарда у бурят. Возобновление ангинозной боли после стентирования коронарных сосудов может являться прогностическим признаком тромботических осложнений у бурят.

Ключевые слова: буряты, клопидогрел, омепразол, острый коронарный синдром, стентирование коронарных сосудов, этнические особенности, *CYP2C19*.

Для цитирования: Зеленская Е.М., Донирова О.С., Воронина Е.Н., Ковалева А.Я., Протасов К.В., Лифшиц Г.И. Ассоциация полиморфных аллелей гена *CYP2C19* и клинических показателей у пациентов русской и бурятской национальностей, перенесших стентирование коронарных сосудов и принимавших клопидогрел. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(3):61-70. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-61-70

ASSOCIATION OF SNP *CYP2C19* AND CLINICAL PARAMETERS IN RUSSIAN AND BURYAT PATIENTS AFTER TAKING CLOPIDOGREL AFTER CORONARY STENTING

Zelenskaya E. M.¹, Donirova O. S.², Voronina E. N.¹, Kovaleva A. Ya.¹, Protasov K. V.³, Lifshits G. I.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Republican Clinical Hospital named after N. A. Semashko, Ministry of Healthcare of the Republic of Buryatia, Ulan-Ude, Russia

³ Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education — Branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Healthcare of Russian Federation, Irkutsk, Russia

Corresponding author:

Zelenskaya Elena M.,
Institute of Chemical Biology and
Fundamental Medicine,
Akademika Lavrentieva Ave., 8, Novosibirsk,
Russia, 630090.
E-mail: helenzlnsk@gmail.com

Received 12 May 2022; accepted 25 May
2022.

ABSTRACT

Background. Clopidogrel is often used in patients undergoing coronary stenting for acute coronary syndrome. However, the CYP2C19 variants rs4244285(*2), rs4986893 (*3) affect the metabolism of clopidogrel. These alleles occur with different frequencies in patients of different nationalities, so the clopidogrel efficacy may differ in ethnic groups living in Russia. **Objective.** to assess the associations between genetic determinants of the risk of thrombotic complications during clopidogrel treatment and the clinical characteristics of Buryat and Russian patients, in order to search for personalized informative prognosis markers. **Design and methods.** The study included 142 Buryat and 150 Russian patients undergoing coronary stent placement for acute coronary syndrome. All patients received clopidogrel. Patients were stratified by the presence of CYP2C19*2, CYP2C19*3 alleles. In all patients efficacy endpoints were assessed, as well as corresponding therapy. **Results.** In Buryat patients CYP2C19*3 allele was significantly more common (11,6 % versus 1,3 %, $p < 0,001$) than in Russian. In Buryat patients, recurrence of anginal pain during exercise was associated with the CYP2C19*3 and/or CYP2C19*2 genotypes ($p = 0,015$), as well as with the taking omeprazole ($p = 0.015$). In Russian patients, efficacy endpoints in clopidogrel treatment were associated with the presence of CYP2C19*2 and/or CYP2C19*3 alleles ($p = 0.036$). **Conclusion.** The presence of minor CYP2C19*3 and CYP2C19*2 alleles, along with the reports of recurrence of anginal pain during moderate and light exercise in Buryat patients may be considered as a prognostic sign of thrombotic complications.

Key words: acute coronary syndrome, clopidogrel, coronary stenting, CYP2C19, ethnic characteristics, omeprazole, the Buryats.

For citation: Zelenskaya EM, Donirova OS, Voronina EN, Kovaleva AY, Protasov KV, Lifshits GI. Association of SNP CYP2C19 and clinical parameters in russian and buryat patients after taking clopidogrel after coronary stenting. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(3):61-70. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-61-70

Список сокращений: ЛПНП — липопротеиды низкой плотности, ОКС — острый коронарный синдром, ARC — Academic Research Consortium-2.

ВВЕДЕНИЕ

Двойная антитромботическая терапия является важным компонентом для профилактики осложнений острого коронарного синдрома (ОКС) [1]. В состав двойной антитромботической терапии входит один из ингибиторов рецепторов тромбоцитов P2Y₁₂ — клопидогрел или тикагрелор, использование которых позволяет снизить частоту тромботических осложнений. Однако, по данным Европейского общества кардиологов (2020), у части пациентов наблюдается резистентность к клопидогрелу вследствие наличия «loss-of-function» аллелей в гене *CYP2C19* (*CYP2C19**2 rs4244285 и *CYP2C19**3 rs4986893), влияющих на метаболизм этого препарата [2]. Тем не менее, клопидогрел используется в России наиболее широко в силу его доступности, что повышает комплаентность к лечению на амбулаторном этапе. Пациенты после ОКС часто также получают препараты группы ингибиторов протонной помпы для предотвращения геморрагических осложнений. Метаболизм омепразола также проходит с участием фермента *CYP2C19*, и те аллели (*CYP2C19**2 rs4244285 и *CYP2C19**3 rs4986893) влияют на его метаболизм. Конкурентное взаимодействие снижает эффект обоих препаратов и повышает риск повторной госпитализации пациентов с ОКС [3]. Буряты — одна из самых многочисленных национальных групп, проживающих в Сибири, согласно данным Всероссийской переписи населения [4]. Исследований, посвященных генетическим и клиническим особенностям течения сердечно-сосудистых заболеваний в этой этнической группе, практически не встречается, однако есть исследование о частоте встречаемости аллелей гена *CYP2C19* среди здоровых добровольцев [5]. Ранее было показано, что у бурят выше частота встречаемости аллелей, связанных со снижением метаболизма клопидогрела [5, 6]. Целью исследования явилась оценка ассоциаций генетических маркеров, связанных с риском развития тромботических и геморрагических осложнений при лечении клопидогрелом, и клиническими исходами пациентов бурятской и русской национальностей с острым коронарным синдромом для поиска персонализированных информативных маркеров прогноза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование последовательно включены жители Республики Бурятия: 142 пациента бурятской

национальности и 150 пациентов русской национальности с острым коронарным синдромом, перенесших чрескожное коронарное вмешательство со стентированием коронарных сосудов (СКС). Этническая принадлежность определялась методом анализа родословной до второго поколения (самоидентификация пациентов и идентификация пациентами их родителей). Этот метод показал соответствие между самоидентификацией субъекта и определением генетических маркеров этнической принадлежности на 99,86 % [7].

Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено локальными этическими комитетами организаций, участвующих в исследовании (Государственное автономное учреждение здравоохранения «Республиканская клиническая больница им. Н. А. Семашко», Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук).

Все пациенты получали двойную антитромботическую терапию в составе комплексного лечения, соответствующего стандартам медицинской помощи. Пациенты получали клопидогрел в дозе 300 мг — нагрузочная, 75 мг — поддерживающая. Всем пациентам были определены аллельные варианты гена *CYP2C19**2 (rs4244285), *CYP2C19**3 (rs4986893) на базе лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови проводили стандартным фенол-хлороформным методом. Определение аллелей *CYP2C19**2, *CYP2C19**3 проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-Time PCR) на приборе Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

У всех пациентов проводился анализ жалоб, анамнестических данных, оценивались клинические исходы через 30 дней после включения в исследование. Всем пациентам проведена коронароангиография и СКС. Проводилась оценка лабораторных показателей (Тропонин I, КФК -МВ, липидограмма, креатинин, глюкоза) сопутствующей терапии: прием ингибиторов протонной помпы (омепразол). Показанием к назначению омепразола являлось значение более 30 баллов по шкале CRUSADE [8].

В качестве конечной точки эффективности оценивался определенный или вероятный ранний тромбоз коронарного стента в течение 30 дней с момента стентирования коронарных артерий, согласно классификации Academic Research Consortium-2 (ARC) [9]. Кроме того, в отдельную группу были выделены пациенты, которые не соответствовали критериям ARC — не имели признаков тромбоза установлен-

ного стента, ухудшения изменений по ЭКГ и изменения биохимических маркеров, характерных для ОКС, однако жаловались на возобновление ангинозной боли при легкой и умеренной физической нагрузке после стентирования коронарных сосудов. Боль у таких пациентов купировалась самостоятельно либо при приеме нитроглицерина, в остальном пациенты придерживались назначенной ранее схемы лечения. Статистическая обработка: характер распределения

количественных признаков определяли методом Колмогорова–Смирнова, в случае нормального распределения вычисляли среднее значение (М) и стандартное отклонение (SD). Межгрупповое сравнение по распределению качественных признаков проводилось с помощью критериев χ^2 . Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости для отклонения нулевой статистической гипотезы (р) принимался равным 0,05.

Таблица 1. Клиническая характеристика группы пациентов бурятской и русской национальностей

Параметры	Национальность		Р
	Буряты (n = 142)	Русские (n = 150)	
Возраст, годы (М ± m)	64,9 ± 12,1	64,9 ± 11,2	0,990
Число мужчин, n (%)	90 (63,8)	91 (60,7)	0,496
Анамнез жизни и сопутствующие заболевания			
Артериальная гипертензия, n (%)	104 (73,8)	115 (76,7)	0,566
Сахарный диабет, n (%)	25 (17,7)	26 (17,3)	0,806
Почечная недостаточность, n (%)	2 (1,4)	1 (0,7)	0,526
Отягощенная наследственность по ССЗ, n (%)	10 (7,1)	18 (12)	0,156
Курение, n (%)	41 (29,1)	55 (36,7)	0,169
Прием омепразола 2 визит, n (%)	82 (58,9)	114 (76)	0,002
Прием омепразола 3 визит, n (%)	80 (56,7)	115 (76,6)	<0,001
Прием омепразола 4 визит, n (%)	42 (29,7)	100 (66,6)	<0,001
Лабораторные показатели			
Уровень глюкозы, ммоль/л (М ± m)	8,03 ± 3,62	7,97 ± 3,43	0,893
Уровень ОХС, ммоль/л (М ± m)	4,45 ± 1,04	4,61 ± 1,21	0,240
Уровень ЛПНП, ммоль/л (М ± m)	2,89 ± 0,87	3,38 ± 1,07	<0,001
Уровень ТГ, ммоль/л (М ± m)	1,29 ± 0,75	1,35 ± 0,94	0,587
СКФ, мл/мин/1,73 м ² (М ± m)	83,55 ± 21,6	79,09 ± 20,7	0,142
Уровень креатинина, мкмоль/л (М ± m)	79,09 ± 21,3	91,97 ± 79,8	0,059

ОХС — общий холестерин, ЛПНП — липопротеиды низкой плотности, ТГ — триглицериды, СКФ — скорость клубочковой фильтрации (СКД-EPI), ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания

РЕЗУЛЬТАТЫ

Группы пациентов статистически не отличались между собой по полу, возрасту и наличию сопутствующих заболеваний. Лабораторное обследование пациентов при поступлении в стационар показало, что уровень липопротеидов низкой плотности был статистически выше у пациентов русской группы. Также русские пациенты достоверно чаще получали в качестве сопутствующей терапии ингибитор протонной помпы (омепразол). Результаты сопоставления групп пациентов представлены в таблице 1.

Частота аллелей *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* представлена в таблице 2.

Было показано, что у пациентов с ОКС бурятской национальности достоверно чаще встречается аллель *CYP2C19*3* ($p < 0,001$). Число пациентов бурятской национальности, имеющих хотя бы один аллель *CYP2C19*2* и/или *CYP2C19*3*, составило 66 из 142 человек (46,4 %), среди русских пациентов — 43 из 150 человек (28,6 %).

В таблице 3 представлены данные о частоте клинических исходов у пациентов русской и бурятской национальности. У пациентов бурятской национальности достоверно реже, чем у русских пациентов, возникали боли за грудиной при легкой и умеренной физической нагрузке, не сопровождающиеся ухудшением по ЭКГ и повышением биохимических маркеров, характерных для ОКС ($p = 0,002$).

У русских пациентов была выявлена ассоциация конечных точек эффективности (тромбоз стента по критериям ARC, ОНМК по типу ишемического инсульта) с наличием хотя бы одного аллеля *CYP2C19*2* и/или *CYP2C19*3* ($p = 0,036$). У пациентов бурятской национальности не было показано достоверной ассоциации ($p = 0,098$) (табл. 4).

Однако у бурят была выявлена ассоциация ангинозных болей за грудиной с носительством хотя бы одного аллеля *CYP2C19*2* и/или *CYP2C19*3* ($p = 0,006$), чего не было показано для русских пациентов ($p = 0,589$) (табл. 5).

При оценке сопутствующей терапии было выявлено, что пациенты бурятской национальности реже, чем русские пациенты, получали ингибиторы протонной помпы ($p = 0,002$). Прием омепразола у бурят был достоверно ассоциирован как с конечными точками эффективности по критериям ARC ($p = 0,025$) (табл. 7), так и с возобновлением ангинозной боли при физической нагрузке после СКС (табл. 8). У русских пациентов такой ассоциации выявлено не было ($p = 0,688$ и $p = 0,764$ соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

Лабораторное обследование показало, что в среднем уровень липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и уровень триглицеридов был выше рекомендуемого Российским кардиологическим об-

Таблица 2. Различия в частоте аллелей гена *CYP2C19* у русских и бурят из Улан-Удэ

Частота аллелей, %	Буряты (n = 142)	Русские (n = 150)	p
<i>CYP2C19*2</i> , G681A, (rs4244285)	13,4	14,7	0,591
<i>CYP2C19*3</i> , G636A, (rs4986893)	11,6	1,3	< 0,001

Таблица 3. Оценка исходов

	Буряты	Русские	p
Всего пациентов	142	150	
Конечные точки эффективности (ARC)	8 (5,6 %)	6 (4,7 %)	0,514
Боли за грудиной при легкой и умеренной физической нагрузке, не сопровождающиеся ухудшением по ЭКГ	13 (9,2 %)	34 (22,7 %)	0,002

ARC — Academic Research Consortium-2

Таблица 4. Ассоциация конечных точек эффективности с носительством хотя бы одного аллеля *CYP2C19*2* или *CYP2C19*3*

Конечные точки эффективности (ARC)	да	нет	χ^2	p
Буряты (n = 142)				
CYP2C19*2+*3 есть	2	62	1,379	0,241
CYP2C19*2+*3 нет	6	72		
Русские (n = 150)				
CYP2C19*2+*3 есть	4	39	4,41	0,036
CYP2C19*2+*3 нет	2	105		

Таблица 5. Ассоциация жалоб на ангинозные боли при физической нагрузке с носительством хотя бы одного аллеля *CYP2C19*2* или *CYP2C19*3*

Жалобы на ангинозные боли при физической нагрузке	да	нет	χ^2	p
Буряты (n = 142)				
CYP2C19*2+*3 есть	11	54	9,697	0,004
CYP2C19*2+*3 нет	2	75		
Русские (n = 150)				
CYP2C19*2+*3 есть	11	32	0,292	0,589
CYP2C19*2+*3 нет	23	84		

ществом как для пациентов очень высокого риска сердечно-сосудистых заболеваний, так и для пациентов высокого риска [10]. У бурят уровень ЛПНП был достоверно ниже, чем у русских, что может быть связано с особенностью питания: предпочтением молочных и мучных продуктов перед мясными [11]. Возможно также, что другие генетические факторы сосудистого старения [12] играют значимую роль в липидном обмене у пациентов бурятской национальности.

В этом исследовании было показано, что 46,4 % пациентов бурятской национальности являются носителями «loss-of-function» аллелей гена *CYP2C19*, это достоверно больше, чем у пациентов русской национальности в этом же регионе (28,6 %) ($p < 0,05$). По результатам наших предыдущих исследований [13–15], в различных регионах России 16–27,5 % пациентов имеют хотя бы один из «loss-of-function» аллелей гена *CYP2C19*.

Пациенты русской и бурятской национальностей также различались по частоте приема омепразола. Для определения показаний к назначению омепразола использовалась шкала CRUSADE. Шкала CRUSADE рекомендована Европейским обществом кардиологов для определения 30-дневного риска кровотечения, не связанного с проведением оперативного вмешательства, у пациентов, перенесших ОКС. К факторам риска развития кровотечения по этой шкале относятся исходно низкий уровень гематокрита, снижение клиренса эндогенного креатинина, увеличение частоты сердечных сокращений, наличие признаков застойной сердечной недостаточности, указания на предшествующие заболевания сосудов, наличие сахарного диабета, уровень систолического артериального давления ниже 110 и выше 180 мм рт. ст. [8].

Прием омепразола пациентами бурятской национальности был достоверно ассоциирован как с ве-

Таблица 6. Ассоциация конечных точек эффективности с приемом омепразола

Прием омепразола на визите 2	да	нет	χ^2	p
Буряты (n = 138)				
Конечные точки эффективности есть	7	0	5,036	0,025
Конечных точек эффективности нет	75	56		
Русские (n = 149)				
Конечные точки эффективности есть	5	1	0,162	0,688
Конечных точек эффективности нет	109	34		

Таблица 7. Ассоциация жалоб на ангинозные боли при физической нагрузке и приема омепразола

Прием омепразола на визите 4	да	нет	χ^2	p
Буряты (n = 133)				
Жалобы на ангинозные боли при физической нагрузке есть	8	34	5,985	0,015
Жалоб на ангинозные боли при физической нагрузке нет	5	86		
Русские (n = 146)				
Жалобы на ангинозные боли при физической нагрузке есть	24	10	0,090	0,764
Жалоб на ангинозные боли при физической нагрузке нет	76	36		

роятными и подтвержденными тромбозами стента по критериям ARC и ишемическими инсультами, так и с жалобами на возобновление ангинозных болей при физической нагрузке, не повлекших за собой экстренного медицинского вмешательства. Это можно объяснить конкурентным взаимодействием омепразола и клопидогрела за фермент CYP2C19, в результате чего эффективность клопидогрела снизилась [3].

Стоит отметить, что у бурятских пациентов не было показано достоверных ассоциаций тромбоза стента и ишемического инсульта с генетическими маркерами CYP2C19*2 и/или CYP2C19*3, а только с приемом омепразола. Тогда как возобновление ангинозных болей при физической нагрузке у бурятских пациентов было ассоциировано не только с приемом омепразола, но и с наличием хотя бы одного аллеля loss-of-function аллелей гена CYP2C19 (CYP2C19*2 и CYP2C19*3. Эти данные

позволяют предположить, что возобновление ангинозной боли при физической нагрузке у бурятских пациентов может являться неблагоприятным прогностическим признаком для развития тромботических осложнений, так как по данным более продолжительных, чем наше, исследований [3, 16], *2 и *3 аллель и прием омепразола являлись независимыми предикторами риска тромботических осложнений.

У русских пациентов была выявлена только ассоциация конечных точек эффективности при лечении клопидогрелом с носительством аллелей «loss-of-function» CYP2C19*2 и/или CYP2C19*3, что соответствует данным литературы [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У 46,4 % пациентов бурятской национальности имеются генетические маркеры предрасположенности к возникновению тромботических осложне-

ний на фоне приема клопидогрела после стентирования коронарных сосудов. Наличие хотя бы одного аллеля аллелей «loss-of-function» *CYP2C19*2* и/или *CYP2C19*3*, а также прием омепразола были ассоциированы с возобновлением жалоб на ангинозные боли после стентирования коронарных сосудов у пациентов бурятской национальности. Приведенные данные позволяют предположить, что этот симптом может являться прогностическим признаком тромботических осложнений у пациентов бурятской национальности, перенесших СКС по поводу ОКС. На наш взгляд, это актуальный клинический маркер, который может помочь врачу в амбулаторных условиях без использования сложных тестов прогнозировать неблагоприятные исходы и персонализировать терапию.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Финансирование / Funding

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300045-2. / This work was supported by the Russian state-funded project for ICBFM SB RAS (grant number 121031300045-2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, et al. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice.: Developed by the Task Force for cardiovascular disease prevention in clinical practice with representatives of the European Society of Cardiology and 12 medical societies With the special contribution of the European Association of Preventive Cardiology (EAPC). *European Heart Journal*. 42(34). 2021; 3227–3337. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab484>
2. Collet JP, Thiele H, Barbato E, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 42(14), 2021; 1289–1367. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa575>
3. Juurlink DN, Gomes T, Ko DT, et al. A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel. *CMAJ*. 2009; 180(7):713–718. DOI:10.1503/cmaj.082001.
4. The volume of the official publication of the 2010 All-Russian Population Census. Volume 4. National composition and language proficiency, citizenship: 742–845. In Russian [Тома официальной публикации итогов Всероссийской переписи населения 2010 года. Том 4. Национальный состав и владение языками, гражданство: 742–845.] https://www.gks.ru/free_doc/new_site/perepis2010/croc/vol4pdf-m.html (18 April 2022).
5. Kitaeva EY, Shprakh VV, Mirzaev KB, et al. The frequency of *CYP2C19* and *ABCB1* polymorphisms associated with a change in the antiplatelet effect of clopidogrel is in Russians and Buryats. *Siberian Medical Review*. 2018; 3: 43–50. In Russian [Китаева Е.Ю., Шпрах В.В., Мирзаев К.Б. и др. Частота полиморфизмов генов *CYP2C19* и *ABCB1*, ассоциированных с изменением антиагрегантного действия клопидогрела, у русских и бурят. *Сибирское медицинское обозрение*. 2018; 3:43–50.]. DOI: 10.20333/2500136-2018-3-43-50.
6. Zelenskaya EM, Lifshits GI, Nikolaev KY, et al. The frequency of the minor polymorphisms in the *CYP2C19*, *VEGFR-2* genes and clinical outcomes in Russian and Buryat patients with acute coronary syndrome. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2020; 24(6):338–342.
7. Tang H, Quertermous T, Rodriguez B. Genetic Structure, Self-Identified Race/Ethnicity, and Confounding in Case-Control Association Studies. *American Journal of Human Genetics*. 2005;76(2):268–275. DOI: 10.1086/427888.
8. Subherwal S, Bach RG, Chen AY, et al. Baseline Risk of Major Bleeding in Non-ST-Segment — Elevation Myocardial Infarction The CRUSADE (Can Rapid risk stratification of Unstable angina patients Suppress ADverse outcomes with Early implementation of the ACC/AHA guidelines) Bleeding Score. *Circulation*. 2009; 119(14):1873–1882
9. Garcia-Garcia HM, McFadden EP, Farb A, et al. Standardized End Point Definitions for Coronary Intervention Trials: The Academic Research Consortium-2 Consensus Document. *Circulation*. 2018; 137(24):2635–2650. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029289>
10. Boytsov SA, Pogosova NV, Bubnov MG, et al. Cardiovascular prevention 2017. Russian national recommendations. *Russian Journal of Cardiology* 2018; 23 (6):7–122. In Russian [Бойцов С.А., Порогова Н.В., Бубнова М.Г. и др. Кардиоваскулярная профилактика 2017. Российские национальные рекомендации. *Российский кардиологический журнал*. 2018; 23 (6):7–122.] <http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-6-7-122>
11. Borinskaya SA, Kozlov AI, Yankovsky NK. Genes and food traditions. *Ethnographicheskoe obozreniye*. 2009; 3: 117–137 In Russian [Боринская С.А., Козлов

А.И., Янковский Н.К. Гены и традиции питания. Этнографическое обозрение. 2009; 3: 117–137.]

11. Slepukhina AA, Zelenskaya EM, Lifshits GI. Genetic risk factors for vascular aging: molecular mechanisms, polymorphism of candidate genes and gene networks. Russian Journal of Cardiology. 2019; 10:78–85. In Russian [Слепухина А.А., Зеленская Е.М., Лифшиц Г.И. Генетические факторы риска сосудистого старения: молекулярные механизмы, полиморфизм генов-кандидатов и генные сети. Российский кардиологический журнал. 2019; 10:78–85.] <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2019-10-78-85>

12. Mirzaev KB, Zelenskaya EM, Barbarash OL, et al. CYP2C19 polymorphism frequency in Russian patients in Central Russia and Siberia with acute coronary syndrome. Pharmgenomics. Pers Med. 2017; 10:107–114. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S126305>

13. Zelenskaya EM, Nikolaev KY, Donirova OS, et al. Association between genetic determinants of clopidogrel metabolism and clinical cardiovascular risk indicators in Buryat patients. Patologiya Krovooobrashcheniya i Kardiokhirurgiya, 2019; 23(3): 39–46. In Russian [Зеленская Е.М., Николаев К.Ю., Донирова О.С. Ассоциация генетических детерминант метаболизма клопидогрела и клинических показателей сердечно-сосудистого риска у пациентов бурятской национальности. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2019; 23(3): 39–46.]. DOI: 10.21688/1681-3472-2019-3-39-46

14. Knauer NY, Lifshits GI, Voronina EN, et al. Informativeness of genetic markers for optimizing personalized therapy with clopidogrel. Cardiologiya. 2013; 53(8):72–75 In Russian [Кнауэр Н.Ю., Лифшиц Г.И., Воронина Е.Н. и др. Информативность генетических маркеров для оптимизации персонализированной терапии клопидогрелом. Кардиология. 2013; 53(8):72–75.]

15. Mega JL, Simon T, Collet JP, et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. JAMA 2010; 304(16): 1821–30.

Информация об авторах:

Зеленская Елена Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения РАН;

Донирова Оюна Сергеевна, к.м.н, заведующий отделением неотложной кардиологии ГАУЗ «Республиканская клиническая больница им. Н. А. Семашко» Минздрава Республики Бурятия;

Воронина Елена Николаевна, к.б.н., старший научный сотрудник, заведующий группой молекуляр-

ной генетики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения РАН;

Ковалева Анна Ярославовна, младший научный сотрудник лаборатории персонализированной медицины ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения РАН;

Протасов Константин Викторович, д.м.н., профессор, заместитель директора по науке и развитию Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования — филиала ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;

Лифшиц Галина Израилевна, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией персонализированной медицины ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения РАН.

Author information:

Zelenskaya Elena M., junior researcher Laboratory of personalized medicine of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine;

Donirova Oyuna S., PhD, Head of the Department of Emergency Cardiology, Republican Clinical Hospital named after N. A. Semashko;

Voronina Elena N., Senior Researcher, PhD, Head of the Molecular Genetics Group of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine;

Kovaleva Anna Ya., junior researcher Laboratories of personalized medicine of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine;

Protasov Konstantin V., Doctor of Medical Sciences, Professor, Deputy Director for Science and Development of Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education;

Lifshits Galina I., Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Laboratory of personalized medicine of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616.126.3-089

ПРИМЕНЕНИЕ ПУЛЬС-ДУПЛИКАТОРА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРОТЕЗОВ КЛАПАНОВ СЕРДЦА

Квиндт П. А., Толпыгин Д. С., Успенский В. Е., Филиппов А. А.

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

Контактная информация:

Квиндт Павел Александрович,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: kvindt_pa@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 08.04.2022
и принята к печати 18.04.2022.

РЕЗЮМЕ

Врожденные и приобретенные клапанные пороки сердца являются глобальной проблемой системы здравоохранения. Ежегодно проводится огромное количество операций протезирования клапанов сердца, но до сих пор не существует идеального искусственного заместителя сердечного клапана. Разработка новых протезов клапанов сердца непрерывно продолжается и включает оценку функционирования протезов клапанов и исследование их гидродинамических характеристик. Для подобных исследований были разработаны и применяются аппаратные системы дублирования импульсов (пульс-дубликаторы). В статье рассмотрены назначение и функции, механические компоненты, принцип работы устройства, программное обеспечение, возможности анализа, преимущества и недостатки подобных систем.

Ключевые слова: гемодинамический стенд, гидродинамика, клапаны сердца, программное обеспечение, протезы клапанов сердца, пульс-дубликатор.

Для цитирования: Квиндт П.А., Толпыгин Д.С., Успенский В.Е., Филиппов А.А. Применение пульс-дубликатора в экспериментальных исследованиях протезов клапанов сердца. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(3):71-77. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-71-77

POSSIBILITIES OF APPLICATION OF PULSE DUPLICATOR IN STUDYING THE AORTIC ROOT

Kvindt P. A., Tolpygin D. S., Uspenskiy V. E., Filippov A. A.

Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Kvindt Pavel A.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: kvindt_pa@almazovcentre.ru

Received 08 April 2022; accepted 18 April 2022.

ABSTRACT

Congenital and acquired valvular heart diseases are a global problem of the healthcare system. A huge number of prosthetic heart valve surgeries are performed annually, but there is still no ideal artificial substitute for a heart valve. The development of new prosthetic heart valves continues continuously, and includes an assessment of the functioning of prosthetic valves and the study of their hydrodynamic characteristics. Hardware pulse duplication systems (pulse duplicators) have been developed and used for such studies. The article discusses the purpose and functions, mechanical components, the principle of operation of the device, software, analysis capabilities, advantages and disadvantages of such systems.

Key words: heart valves, heart valve prostheses, hemodynamic, hydrodynamics, pulse duplicator, software, test stand.

For citation: Kvindt PA, Tolpygin DS, Uspenskiy VE, Filippov AA. Possibilities of application of pulse duplicator in studying the aortic root. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(3):71-77. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-71-77

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения нормального функционирования клапанного аппарата сердца лежат в основе различных заболеваний системы кровообращения, представляя собой глобальную проблему для здравоохранения. Во всем мире ежегодно выполняется примерно 275 000 операций протезирования клапанов сердца [1]. С прогрессирующим старением населения растет потребность в клапанных протезах и число имплантаций. Современной тенденцией является рост числа имплантаций биологических протезов (БП), которые, по сравнению с механическими (МП), имеют лучшие гидродинамические характеристики и не требуют пожизненной антикоагулянтной терапии. Тем не менее, ни МП, ни БП, рутинно применяющиеся в настоящее время в клинической практике, не в состоянии полностью устранить риск ассоциированных осложнений и обеспечить гидродинамические характеристики, аналогичные нативным клапанам сердца [2, 3].

Оценка функционирования клапана и его гидродинамических характеристик в моделированных условиях, сравнимых с присутствующими в работающем сердце (в режиме реального времени, в условиях устойчивого и пульсирующего потока в контролируемой среде), необходима с целью выявления недостатков и изготовления оптимального заместителя клапана сердца [4, 5]. Для подобных исследований были разработаны и применяются системы повторного моделирования импульсов (пульс-дубликаторы), создающие пульсирующий поток и колебания давления и позволяющие определять механические, гидродинамические характеристики, а также выполнять ультразвуковую визуализацию, доплеровские измерения потока, визуализацию скорости частиц и т. д. [6]. Ранее большинство пульс-дубликаторов были системами «самостоятельной сборки», а сегодня это коммерчески доступные системы от различных производителей, которые нашли широкое применение. В настоящей публикации рассматриваются принципы работы, назначение и возможности применения подобных систем в исследованиях корня аорты.

Основная цель использования пульс-дубликатора состоит в реалистичной оценке функционирования протеза сердечного клапана в смоделированных условиях работы сердца в контролируемой среде. Система функционирует как гидравлическая модель, напоминающая артериальное сердце человека, связанная с моделью Windkessel большого круга кровообращения человека. Большинство систем работают по принципу, согласно которому жидкость поступает в модель из резервуара пред-

варительной нагрузки, который имитирует легкие с двумя жесткими легочными венами. Жидкость проходит через клапан и достигает резервуара левого желудочка, последний выбрасывает ее через клапан в систему постнагрузки, состоящую из воздушной камеры и системы гидравлического сопротивления. Гидравлическая функция артериол и капилляров имитируется сопротивлением, постоянное венозное давление поддерживается венозным резервуаром. Как преднагрузка легких, так и венозный резервуар снабжены системой перелива, оканчивающейся центральным буферным резервуаром, из которого тестируемая жидкость непрерывно перекачивается в резервуар легких [7, 8]. Имитатор левого желудочка заключен в корпус из плексигласа и представляет собой силиконовый мешок анатомической формы. Силиконовый мешок окружен водой и подключен к внешнему контуру, состоящему из цилиндрических резервуаров из плексигласа. Сокращение и расслабление камеры контролируются сжатым воздухом, который подается во внешний контур. Поскольку система пульс-дубликатора управляется компьютером, целевая кривая давления в камере левого желудочка отправляется в компьютерную систему, а система обратной связи регулирует количество подаваемого сжатого воздуха так, чтобы целевая кривая была как можно точнее. Система позволяет изменять физиологические параметры, такие как частота сердечных сокращений, ударный объем и уровни давления [7]. Тестовая жидкость, используемая в системе, также адаптирована таким образом, чтобы имитировать вязкость крови. В качестве тестовой жидкости обычно используется смесь 40 % глицерина и 60 % воды для имитации динамической вязкости крови [5].

Система пульс-дубликатора моделирует большой круг кровообращения, включая левое предсердие, левый желудочек и крупные артерии. Дубликатор должен быть оснащен клапанной камерой соответствующих размеров для воспроизведения гемодинамических характеристик потоков жидкости, проходящей через клапан. Большой круг кровообращения представлен резервуаром (левое предсердие), насосом (левый желудочек), элементом эластичности (аорта) и элементом сопротивления (периферическое сопротивление). Система должна быть способна формировать волны давления и потока, которые имитируют ряд физиологических параметров в состояниях покоя и физической нагрузки [8].

Большинство испытательных стендов можно разделить на четыре секции [9]:

- 1) насос, используемый для создания пульсирующих потоков для имитации работы сердца;

2) два однонаправленных клапана вместе с их монтажными приспособлениями (обычно один из них является контрольным клапаном);

3) набор гидравлических компонентов, представляющих систему кровообращения, имитирующих постнагрузку;

4) инструментальная система для сбора и анализа данных.

Модель артериального сердца системы ViVidro (ViVidro Labs) имитирует давление и потоки. Система имитирует физиологические или другие сложные изменения потока, позволяя пользователю изменять периферическое сопротивление и эластичность системы. Давление может быть измерено в аорте, желудочке и предсердии через порты измерения давления, а объемная скорость потока измеряется перед аортальным клапаном. Прозрачные точки обзора позволяют наблюдать за клапаном под разными углами, включая приток и отток, перпендикулярно и параллельно направлению потока (рис. 1) [10].

Система состоит из трех клапанных камер: камера желудочка, камера предсердия и камера аорты. Для гидродинамической оценки протеза клапана последний устанавливается в соответствующее аортальное или митральное положение модели левого желудочка [11]. Пришивная манжетка клапана закрепляется в фитинге из силиконовой резины, повторяющей форму испытательной камеры (рис. 2). Силиконовый каучук обеспечивает полностью герметичную посадку для устранения утечек между камерами желудочка и аорты. Камера аппарата

является важнейшей частью испытательного стенда, поскольку геометрия камер дубликатора влияет на характеристики исследуемого клапана. Это определяет динамическое давление или форму волны потока, создаваемой на испытательном стенде [8, 12].

Формой сигналов давления можно управлять, регулируя давление воздуха в камерах. Вязкоупругий адаптер сопротивления, расположенный между линейным приводом и желудочком, может уменьшить начальный скачок давления из-за жесткой системы и может отсрочить пиковый поток, чтобы воспроизвести физиологические условия потока. Периферическое сопротивление регулируется для контроля давления в аорте и имитации системного сопротивления тела [13].

Также существует система сбора данных гидродинамических испытаний, которая является частью программного обеспечения пульс-дубликатора. Пульс-дубликатор управляется с помощью этой системы при одновременном измерении давления и расхода. Он отслеживает, обрабатывает и сообщает такие данные, как фракция регургитации, эффективная площадь отверстия и другие показатели работы клапана. Выходные файлы доступны в формате .csv для удобного анализа в Excel и MatLab [10].

До начала тестирования протеза клапана сердца на пульс-дубликаторе важно учесть следующие факторы [12]:

1) жидкость для тестирования должна подходить для протеза, а ее температура должна быть такой же, как нормальная температура тела;

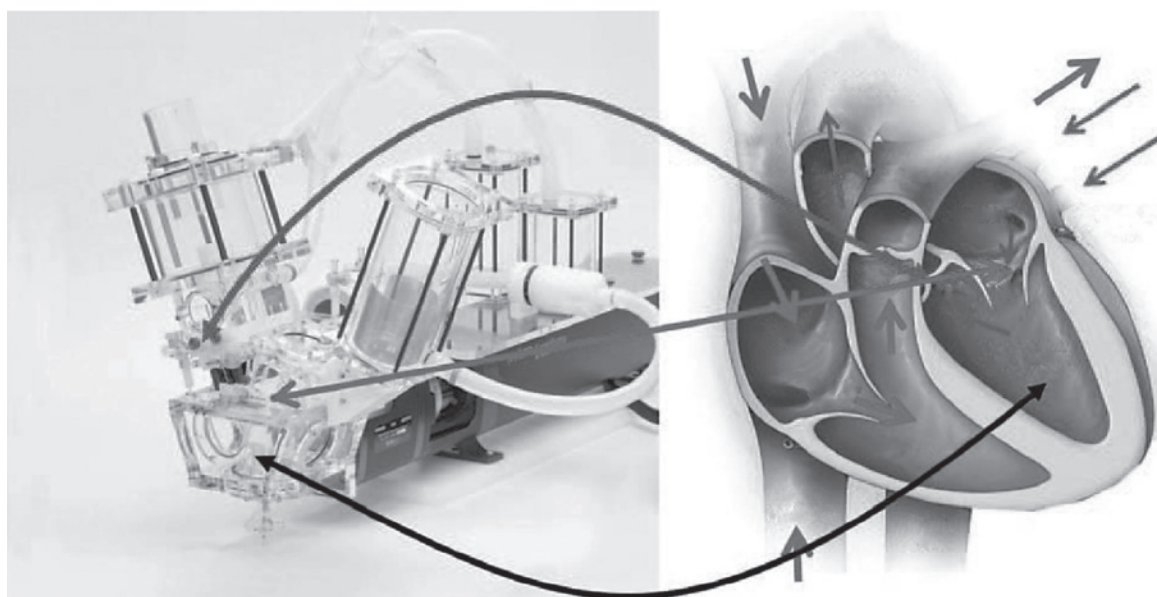


Рис. 1. Система ViVidro со схематическим изображением соответствующих моделируемых камер сердца (адаптировано из vivitrolabs.com) [10]

2) характеристики потока пульс-дубликатора должны быть известны, воспроизводимы и максимально приближены к физиологическому потоку;

3) геометрия проходов через систему должна соответствовать сосудам и камерам нормального сердца;

4) испытательный стенд должен быть способен тестировать как самые маленькие, так и самые большие протезы митрального и аортального клапанов при клиническом использовании;

5) испытательный стенд должен быть ориентирован на воздействие гравитационных сил, подобных тем, которые обнаруживаются у пациента;

6) следует выбрать подходящие точки измерения давления.

Для оценки работы клапана при пульсирующем потоке необходимо охватить следующие параметры: а) перепад давления и утечку при неппульсирующем потоке; б) перепад давления при пульсирующем потоке в различных условиях в качестве эталона для клинических состояний; в) объем закрытия и регургитации как меру гемодинамической точности; г) потери энергии, приводящие к дополнительной нагрузке на сердце; д) детальную оценку скорости и характеристик потока для оценки степени застоя и рециркуляции в контексте потенциального отложения тромбов; е) ламинарные и турбулентные напряжения сдвига как параметры

механического повреждения форменных элементов крови и активации тромбоцитов [14].

Измерения давления и расхода являются основными факторами, определяющими характеристики клапана, и оцениваются по следующим параметрам [14]:

1) ударный объем: объем жидкости, протекающей через клапан в прямом направлении во время сердечного цикла;

2) регургитация: объем жидкости, который проходит через клапан в обратном направлении за один цикл. Он представляет собой сумму объема закрытия и объема утечки и выражается в процентах от ударного объема;

3) сердечный выброс: средний поток через клапан в минуту;

4) средняя разница систолического давления: среднее значение разницы давлений на клапане во время систолы (давление в желудочке — давление в аорте).

Использование пульс-дубликатора для оценки функциональности клапана при пульсирующем потоке или для исследования клапанной механики относительно хорошо известно, однако, как система, так и работа не лишены проблем. Несмотря на то что дубликаторы импульсов при правильном использовании могут давать воспроизводимые данные, измерять мгновенный расход через клапан и обеспе-

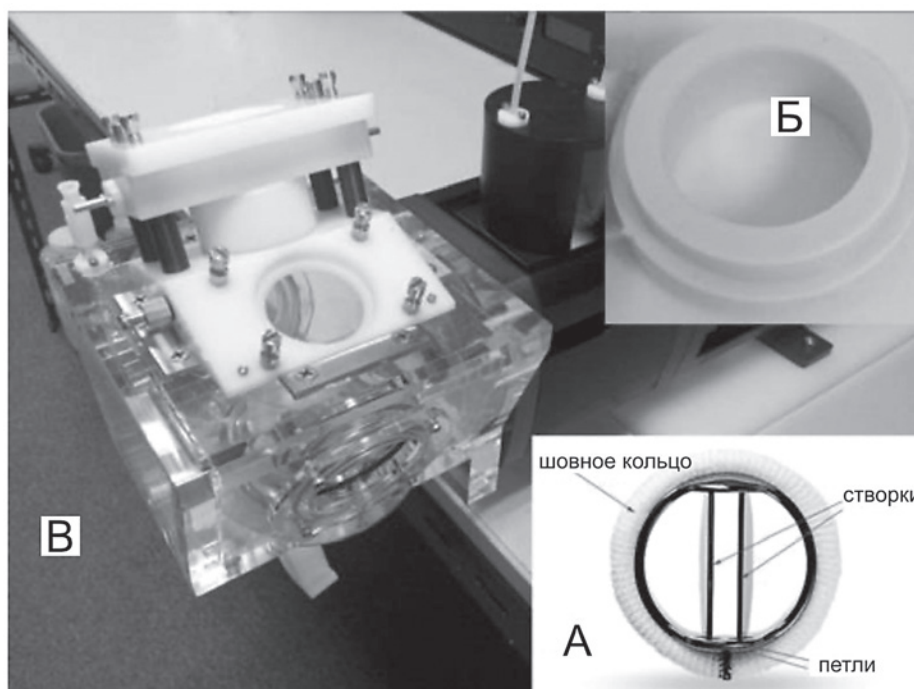


Рис. 2. Вставка камер в пульс-дубликатор (адаптировано из vivitrolabs.com) [10]:
А — протез клапана сердца, **Б** — второе пластиковое кольцо для крепления клапана,
В — пластиковый паз в аппарате, в котором фиксируется протез клапана

чивать хорошую видимость тестируемого клапана, они также имеют недостатки. Многие передовые лаборатории провели исследования для сравнительной оценки заменителей клапанов, но не дали никакого представления о работе клапанов *in vivo*. К интерпретации таких результатов *in vitro* следует подходить с осторожностью, признавая их ограниченность при экстраполяции на ситуацию *in vivo* [14].

Основные недостатки заключаются в том, что модели потока в левом желудочке не моделируются, а инерция жидкости в жестких трубках может искажать форму волны давления [8]. Известно, что жесткие трубки не имитируют эластичность ткани, однако некоторые пульс-дубликаторы, например ViVitro, включают в себя камеру эластичности аорты и корня аорты, для максимальной имитации. Схемы течения жидкости нельзя оценить визуально, чтобы определить области рециркуляции или высоких напряжений сдвига.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Испытания протезов клапанов сердца *in vitro* должны включать все наиболее современные технологические достижения, в том числе пульс-дубликаторы, чтобы расширить понимание о функционировании протезов клапанов сердца до имплантации пациентам, совершенствовать заместители сердечных клапанов, выявлять и устранять осложнения.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Sierad LN, Simionescu A, Albers C, Chen J, Maivelett J, Tedder ME, et al. Design and testing of a pulsatile conditioning system for dynamic endothelialization of polyphenol-stabilized tissue engineered heart valves. *Cardiovasc Eng Technol* [Internet]. 2010;1(2):138–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13239-010-0014-6>
2. Harken DE, Curtis LE. Heart surgery--legend and a long look. *Am J Cardiol* [Internet]. 1967;19(3):393–400. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0002914967904535>
3. Kuan YH, Dasi LP, Yoganathan A, Leo HL. Recent advances in polymeric heart valves research. *Int J Biomater Res Eng* [Internet]. 2011;1(1):1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.4018/ijbre.2011010101>
4. Dasi LP, Simon HA, Sucosky P, Yoganathan AP. Fluid mechanics of artificial heart valves. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 2009;36(2):225–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05099.x>
5. Bazan O, Ortiz JP. Design conception and experimental setup for in vitro evaluation of mitral prosthetic valves. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2011;26(2):197–204.
6. Bazan O, Ortiz JP. Experimental validation of a cardiac simulator for in vitro evaluation of prosthetic heart valves. *Rev Bras Cir Cardiovasc* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.5935/1678-9741.20160041>
7. Verdonck P, Kleven A, Verhoeven R, Angelsen B. Relevancy of a computer controlled in-vitro model of cardiac mechanics in physiological circumstances. In: *Proceedings Computers in Cardiology*. IEEE Comput. Soc. Press; 2003. p. 591–4.
8. Fisher J, Jack GR, Wheatley DJ. Design of a function test apparatus for prosthetic heart valves. Initial results in the mitral position. *Clin Phys Physiol Meas* [Internet]. 1986;7(1):63–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1088/0143-0815/7/1/005>
9. Rajeev A, Sivakumaran N, Sujesh S, Muraleedharan CV. A linear after-load model for a cardio-vascular pulse duplicator. In: *Proceedings of the International Conference on Advances in Computing, Communications and Informatics – ICACCI '12*. New York, New York, USA: ACM Press; 2012.
10. Information about our pulse duplicator system [Internet]. ViVitro Labs. 2013 [cited 2022 Feb 1]. Available from: <http://vivitrolabs.com/product/pulse-duplicator/>
11. Baldwin JT, Campbell A, Luck C, Ogilvie W, Sauter J. Fluid dynamics of the CarboMedics kinetic bileaflet prosthetic heart valve. *Eur J Cardiothorac Surg* [Internet]. 1997;11(2):287–92. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s1010-7940\(96\)01034-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1010-7940(96)01034-2)
12. Thompson-Jooste L. Comparison of heart valve flow dynamics assessment between echocardiography and pulse duplication. Bloemfontein: Central University of Technology, Free State; 2017.
13. Jennings LM, Butterfield M, Walker PG, Watterson KG, Fisher J. The influence of ventricular input impedance on the hydrodynamic performance of bioprosthetic aortic roots in vitro. *J Heart Valve Dis*. 2001;10(2):269–75.
14. Black MM, Drury PJ, Tindale WB. Twenty-five years of heart valve substitutes: a review. *J R Soc Med* [Internet]. 1983;76(8):667–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/014107688307600809>

Информация об авторах:

Квиндт Павел Александрович, младший научный сотрудник НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Толпыгин Дмитрий Сергеевич, к.м.н., врач сердечно-сосудистый хирург отделения сердечно-сосудистой хирургии № 3 ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Успенский Владимир Евгеньевич, д.м.н., заведующий НИЛ заболеваний аорты и аортального клапана ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Филиппов Алексей Александрович, младший научный сотрудник НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НЦМУ «Центр персонализированной медицины», младший научный сотрудник НИЛ заболеваний аорты и аортального клапана, врач сердечно-сосудистый хирург отделения сердечно-сосудистой хирургии № 1 ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Kvindt Pavel A., Junior Researcher of the Research Laboratory of diseases with excessive calcification of the World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Tolpygin Dmitry S., Ph.D, Cardio-thoracic surgeon of the Department of cardio-thoracic surgery of the Almazov National Medical Research Centre;

Uspenskiy Vladimir E., MD, PhD, Head of the Research Laboratory of the aorta and aortic valve diseases of the Almazov National Medical Research Centre;

Filippov Aleksei A., Junior Researcher of the Research Laboratory of diseases with excessive calcification of the World-Class Research Centre for Personalized Medicine; Junior Researcher of the Research Laboratory of the aorta and aortic valve diseases, Cardio-thoracic surgeon of the Department of cardio-thoracic surgery of the Almazov National Medical Research Centre.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616.126.52 -089:57.089.67

ОЦЕНКА СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ РЕИМПЛАНТИРОВАННОГО АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА ЧЕРЕЗ 18 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ DAVID I С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДИКИ ВЫСОКОТОЧНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ СТРУКТУР КОРНЯ АОРТЫ

Филиппов А. А.¹, Успенский В. Е.¹, Грубенко Г. А.²,
Толпыгин Д. С.¹, Карев Е. А.¹, Квиндт П. А.¹, Ананьевская П. В.¹,
Колодяжная А. О.¹, Малашичева А. Б.¹, Гордеев М. Л.¹

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

² Компания «ООО Кошелек.ру», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Филиппов Алексей Александрович,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: aleksei.filippov.chb@gmail.com

Статья поступила в редакцию 05.04.2022
и принята к печати 20.04.2022.

РЕЗЮМЕ

Патологическое расширение корня аорты во многих случаях сопровождается недостаточностью аортального клапана. Наиболее предпочтительным методом хирургического лечения данной патологии является операция David, представляющая собой реимплантацию аортального клапана в протез корня аорты. В настоящее время не имеется исчерпывающих данных о влиянии исходных геометрических параметров структур корня аорты на функционирование реимплантированного аортального клапана после выполнения клапансохраняющего протезирования корня аорты. Нами была создана методика построения и сегментации трехмерной реконструкции аортального клапана и корня аорты, предполагающая последовательное построение реконструкции и сегментацию структур аорты в двух средах автоматизированного проектирования: In Vesalius v 3.1.1 (Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer, CTI) и 3-Matic v. 13.0 (Materialise, Leuven, Belgium). Предложенный метод позволяет выполнять точное измерение и оценку планиметрии створок АК, параметров фиброзного кольца, синусов Вальсальвы и синотубулярного соединения. С использованием разработанной методики была выполнена оценка анатомических и функциональных особенностей аортального клапана у пациен-

та в возрасте 68 лет, перенесшего операцию David I. Была произведена сегментация и измерение геометрических параметров корня аорты на дооперационном этапе, а также через 18 месяцев после оперативного лечения. Для оценки функции аортального клапана в непосредственном и отдаленном послеоперационном периодах использовалась детальная эхокардиографическая оценка клапанно-аортального комплекса, включавшая определение объема и площади потока регургитации, ширины vena contracta, фракции регургитации. Наличие высокоточной 3D-реконструкции открывает дополнительные возможности в области оперативного лечения патологии корня аорты и АК: преимущества в выборе индивидуальной пациент-ориентированной тактики оперативного лечения, в выборе параметров имплантируемого операционного материала и/или устройства, а также в прогнозировании отдаленных результатов оперативного лечения.

Ключевые слова: аневризма восходящей аорты, аортальный клапан, корень аорты, синусы Вальсальвы, створки аортального клапана.

Для цитирования: Филиппов А.А., Успенский В.Е., Грубенко Г.А., Толпыгин Д.С., Карев Е.А., Квиндт П.А., Ананьевская П.В., Колодяжная А.О., Малашичева А.Б., Гордеев М.Л. Оценка структурных и функциональных особенностей реимплантированного аортального клапана через 18 месяцев после операции David I с использованием методики высокоточного моделирования структур корня аорты. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(3):78-88. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-78-88

EVALUATION OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL FEATURES OF REIMPLANTED AORTIC VALVE AFTER DAVID I PROCEDURE WITH THE USE OF HIGH-PRECISION 3-DIMENSIONAL SEGMENTATION OF THE AORTIC ROOT

Filippov A. A.¹, Uspenskiy V. E.¹, Grubenko G. A.², Tolpygin D. S.¹, Karev E. A.¹, Kvindt P. A.¹, Ananyevskaya P. V.¹, Kolodiazhnaya A. O.¹, Malashicheva A. B.¹, Gordeev M. L.¹

¹ Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

² "Koshelek.ru" Company, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Filippov Aleksei A.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: aleksei.filippov.chb@gmail.com

Received 05 April 2022; accepted 20 April 2022.

ABSTRACT

Aneurysm of the aortic root accompanied by aortic insufficiency is a common cardiovascular pathology. The optimal method of surgical treatment of this pathology is the reimplantation of the aortic valve into the aortic root synthetic prosthesis (David procedure). Currently, there is no comprehensive data on the influence of initial geometric parameters of the aortic root structures on the functioning of the reimplanted aortic valve after valve-preserving aortic root replacement. We have introduced a novel technique for creation and segmentation of a three-dimensional reconstruction of the aortic valve and root, which involves the sequential application of two computer-aided design environments: In Vesalius v 3.1.1 (Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI)) and 3-Matic v. 13.0 (Materialise, Leuven, Belgium). The proposed method allows accurate measurement and evaluation of spatial parameters of the AV leaflets, fibrous ring, sinuses of Valsalva and sinotubular junction. The developed technique was used to evaluate the anatomical and functional features of the aortic valve in a 68-year-old patient who underwent David I procedure. Segmentation and measurement of the geometric parameters of the aortic root were performed before operation, as well as 18 months after surgical treatment. To assess the function of the reimplanted aortic valve during the long-term follow-up, a detailed echocardiographic assessment was used. Echocardiographic assessment included measuring volume and area of the regurgitation flow, the width of vena contracta, and the regurgitation fraction. The application of high-precision 3D reconstruction opens up additional opportunities in the field of surgical treatment of the aortic root and AV pathology: advantages in choosing an individual patient-oriented surgical tactics, parameters of the implanted surgical material and/or device, and in predicting long-term results of surgical treatment.

Key words: aneurysm of the ascending aorta, aortic root, aortic valve, aortic valve leaflets, Valsalva sinuses

For citation: Filippov AA, Uspenskiy VE, Grubenko GA, Tolpygin DS, Karev EA, Kvindt PA, Ananyevskaya PV, Kolodiyhnaya AO, Malashicheva AB, Gordeev ML. Evaluation of structural and functional features of reimplanted aortic valve after David I procedure with the use of high-precision 3-dimensional segmentation of the aortic root. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(3):78-88. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-78-88.

Список сокращений: АВА — аневризма восходящей аорты, АК — аортальный клапан, АН — аортальная недостаточность, ВА — восходящая аорта, ВТЛЖ — выходной тракт левого желудочка, РКТА — рентгеновская компьютерно-томографическая ангиография, САП — среды автоматизированного проектирования, СВ — синусы Вальсальвы, СТС — синотубулярное соединение, ФК — фиброзное кольцо, ЭхоКГ — эхокардиография, ХСН — хроническая сердечная недостаточность.

ВВЕДЕНИЕ**Клапансохраняющая хирургия аневризм корня аорты**

Реконструктивная хирургия патологии восходящего отдела аорты, сопровождающейся аортальной недостаточностью, является одной из наиболее сложных проблем современной сердечно-сосудистой хирургии. Сочетание нарушений функционирования аортального клапана с аневризмой восходящей аорты встречается в 5,9 случая на 100 000

населения [1] и ассоциировано с крайне высоким риском развития летальных осложнений.

Единственным эффективным способом лечения данной патологии сегодня является хирургическая коррекция в условиях искусственного кровообращения. Аневризма восходящей аорты без оперативного лечения характеризуется крайне высоким риском острого расслоения, разрыва стенки аневризмы и внезапной смерти [2]. В течение 2 лет после установления данного диагноза около 70 % пациентов имеют высокий риск разрыва аневризмы, и при этом осложнении летальность достигает 95 %. Выживаемость в течение 5–10 лет не превышает 13–19 % [3]. Госпитальная летальность после хирургической реконструкции восходящего отдела аорты и аортального клапана составляет от 3 до 15 % [4]. На сегодня существует 3 основных подхода к хирургическому лечению патологии восходящего отдела аорты: клапансохраняющая операция при отсутствии или слабо выраженных морфологических изменениях аортального клапана, раздельное протезирование восходящей аорты и аортального клапана при невозможности сохранения створок последнего и отсутствии патологии синусов Вальсальвы и полное замещение клапанно-аортального комплекса комбинированным клапансодержащим протезом (кондуитом) [5].

Наиболее распространенной клапансохраняющей реконструктивной операцией на корне аорты в мире в настоящее время является операция Дэвида (реимплантация аортального клапана в протез) в различных модификациях. В 1992 году Т. David и С. Feindel реализовали революционную идею в хирургии корня аорты, предложив при аневризме восходящей аорты, сопровождающейся аортальной регургитацией, протезировать аорту с сохранением аортального клапана при его удовлетворительном состоянии. При этом иссекались стенки расширенной аорты вместе с синусами Вальсальвы, а створки клапана на комиссурах «подвешивались» (ресуспензировались) внутри протеза; устья коронарных артерий при этом reimplanтировались в просвет протеза. Такой метод позволял также дополнительно стабилизировать фиброзное кольцо аортального клапана за счет фиксации протеза к выходному тракту желудочка — зоне аортожелудочкового соединения [6]. Существуют альтернативные методики клапансохраняющих операций, не предусматривающие жесткой фиксации структур аорты к протезу и сохраняющие динамические изменения корня аорты в ходе сердечного цикла, например, операция Yacoub (или ремоделирование корня аорты), предложенная в 1989 году и являющаяся первой выполненной в мире клапансохраняющей операцией.

Общим преимуществом клапансохраняющих операций является: 1) сохранение клапанно-аортального комплекса в физиологичном состоянии; 2) снижение риска кровотечений, связанных с приемом антикоагулянтов; 3) исключение возможности дисфункции протеза клапана сердца вследствие тромбоза, первичной и вторичной дегенерации ксенопротеза [7]. В настоящее время количество выполненных операций в мире неуклонно растет, однако, развитие этих методик ограничивается целым рядом обстоятельств, ведущими из которых являются техническая сложность операции, а также отсутствие объективных критериев интраоперационной визуальной оценки состоятельности reimplanтированного аортального клапана.

Важнейшим критерием в оценке отдаленных результатов подобных вмешательств является свобода от аортальной регургитации. По данным исследований, свобода от аортальной недостаточности более 2+ степени при клапансохраняющих операциях в отдаленном (48–56 месяцев) периоде составляет 87,7–88,9 %, вне зависимости от выбора методики операции [8].

Высокоточное моделирование корня аорты

В последние годы был опубликован ряд исследований, детально анализирующих связи геометрических параметров всех компонентов reimplanтированного клапанно-аортального комплекса со свободой от аортальной регургитации в отдаленном периоде [9–11]. Так, было показано, что каждая створка аортального клапана имеет сложную трехмерную планиметрию, похожую на «подвесной мост» с зоной прикрепления к аорте, телом и свободным краем створки, коаптирующим с соседними створками. Одним из самых заметных эффектов успешной клапансохраняющей операции стало изменение формы створок от продолговатой, относительно плоской структуры до треугольной чашеобразной конфигурации с удлинением свободного края каждой створки и увеличением периметра зоны коаптации [10]. С другой стороны, длина свободного края каждой створки находится в прямой зависимости от размеров фиброзного кольца аортального клапана и не должна быть избыточной. Фиброзное кольцо АК, в свою очередь, также имеет ряд особенностей. Большое значение придается его форме, которая изменяется в ходе сердечного цикла: от более овальной во время диастолы до круглой во время систолы. Предполагается, что эти динамические изменения снижают сопротивление опорожнению желудочков во время систолы и уменьшают гидродинамическую нагрузку на створках во время диастолы за счет уменьшения площади отверстия

(принимającego более эллипсовидную форму) без изменения периметра последнего [12]. Интересно отметить, что при наиболее распространенной клапансохраняющей операции Дэвида эти динамические изменения минимальны за счет жесткой фиксации кольца аортального клапана протезом. Наконец, сохранение физиологичной конфигурации синусов аорты имеет большое значение для поддержания адекватного коронарного кровотока, а также резервуарной функции аорты [13]. Частично эта проблема была решена использованием при операции Дэвида протезов восходящей аорты с аналогами синусов Вальсальвы.

Для более целостной оценки физиологических изменений аортального клапана и корня аорты до и после оперативного лечения в последних зарубежных исследованиях используется построение графических (трехмерных) реконструкций, создаваемых на основе данных рентгеновской компьютерно-томографической ангиографии (РКТА) [14]. Данные модели доступно и наглядно демонстрируют конфигурацию некоторых элементов клапано-аортального комплекса и корня аорты. На основании анализа таких моделей было высказано предположение, что ряд параметров (например,

длина свободного края и глубина створок, а также соотношение этих величин между соседними створками), форма и объем синусов аорты до операции и их изменение после оперативной коррекции, а также конфигурация фиброзного кольца аортального клапана могут являться независимыми предикторами успеха клапансохраняющей процедуры на дооперационном этапе, а также способствовать формированию более точного прогноза свободы от аортальной недостаточности в отдаленном периоде [15, 16]. Анализ стандартных данных эхокардиографии и РКТА аорты не могут предоставить данных для полноценной оценки этих параметров и обладают меньшей точностью измерений в сравнении с трехмерными моделями, созданными с участием специализированного программного обеспечения. Построение трехмерных реконструкций, как правило, производится в среде автоматизированного проектирования (САП). Данные методики были подробно описаны в исследованиях Вах и соавторов, а также группы Schafers и коллег, однако, ни один из известных методов в настоящее время не способен обеспечить точное измерение всех структур корня аорты [17, 18]. Таким образом, задача создания универсального, высокоточного и легко

Таблица 1. Данные трансторакальной ЭхоКГ и МСКТ перед оперативным вмешательством

Параметр ЭхоКГ и РКТА	Значение
КДО ЛЖ, мл	175
КСО ЛЖ, мл	79
Ударный объем ЛЖ, мл	94
Фракция выброса ЛЖ (Teicholz), %	64
ФК АК, мм	27
Диаметр синусов Вальсальвы (max), мм	57
Диаметр синусов Вальсальвы (min), мм	51
Скорость кровотока на АК, м/с	2,3
Средний градиент на АК, мм рт. ст.	9
Vena contracta, мм	8,5
Rvol AP по PISA, мл	48
Фракция регургитации, %	52

Примечания:

КДО — конечно-диастолический объем, КСО — конечно-систолический объем, ЛЖ — левый желудочек, ФК — фиброзное кольцо, АК — аортальный клапан, Rvol — объем регургитации, AP — аортальная регургитация

Таблица 2. Геометрические параметры корня аорты

Стереометрические параметры корня аорты		Значение
Длины свободных краев створок, мм	правая	29
	левая	31
	некоронарная	32
Площади створок, мм ²	правая	294
	левая	303
	некоронарная	312
Макс. расстояние от центра дуги СВ до центра зоны коаптации, мм	правый	24
	левый	27
	некоронарный	27
Периметр фиброзного кольца АК, мм		177
Диаметр ФК АК на уровне аорто-желудочкового соединения, мм		28,1
Диаметр ФК АК на уровне вершин комиссур, мм		30,2
Эффективная высота, мм		9,0

Примечания: СВ — синусы Вальсальвы, ФК АК — фиброзное кольцо аортального клапана

воспроизводимого способа построения трехмерной реконструкции клапанно-аортального комплекса на сегодняшний день остается нерешенной.

Применение высокоточной 3d-реконструкции клапанно-аортального комплекса в клапансохраняющей хирургии корня аорты

Пациент С., 62 лет, был планово госпитализирован в отделение сердечно-сосудистой хирургии НМИЦ им. В. А. Алмазова с диагнозом «Несиндромная несемейная аневризма корня аорты. Аортальная недостаточность 3 степени». У пациента отсутствовали фенотипические признаки дисплазий соединительной ткани, семейный анамнез также не имел случаев формирования аневризм аорты и других заболеваний соединительной ткани. Наблюдались клинические проявления хронической сердечной недостаточности (ХСН) на уровне 2 функционального класса (NYHA), с значительным прогрессированием одышки и снижением толерантности к физической нагрузке в течение последних 4 месяцев. Значимые сопутствующие заболевания у пациента отсутствовали. По результатам дообследования было принято решение о выполнении одномоментной хирургической коррекции аневризмы корня аорты и тяжелой аортальной недостаточно-

сти в условиях экстракорпорального кровообращения, по методике David I. Данные дооперационной трансторакальной эхокардиографии и РКТА представлены в таблице 1.

Для создания 3D-реконструкции аортального клапана и восходящей аорты использовались данные РКТА в формате DICOM. РКТА грудной аорты с ЭКГ-синхронизацией была выполнена с использованием томографа Somatom Definition (Siemens — 128 slices). Все срезы КТ имели разрешение 512×512 пикселей, и средний размер пикселя составил $0,8 \pm 0,01$ мм. Толщина среза составила $0,82 \pm 0,01$ мм.

Данные РКТА были импортированы в программу InVesalius 3.1. Первым этапом была проведена первичная сегментация аортального клапана. Для этого была сформирована первичная реконструкция аорты и выполнено выделение корня аорты из изображений органокомплекса грудной клетки с удалением всех находящихся в непосредственной близости структур: камеры сердца, трахея, бронхи, пищевод, легкие. На полученной реконструкции обязательно должны отображаться все стенки аорты и створки АК без дефектов, кроме того, наблюдалось значительное число мелких зернистых структур в просвете аорты (вероятно, отражение рентгеновских лучей от контрастного вещества и клеток крови). При неполном отображении структур корня аорты или наличии де-

Таблица 3. Показатели детальной эхокардиографической оценки функции аортального клапана в отдаленном послеоперационном периоде

Показатель	Значение
Vena contracta, мм	1,0
Rvol AP по PISA, мл	3,6;
Rvol AP по уравнению непрерывности потока MV SV-LVOT SV, мл	4,2
EROA AP по PISA, см ²	0,02
Фракция регургитации по УНП, %	4,1
По сумме данных аортальная AP, ст.	0–1

Примечания: Rvol — объем регургитации, AP — аортальная регургитация, EROA — площадь потока регургитации, УНП — уравнение непрерывности потока

фектов створок необходимо повторно осуществить подбор их рентгеновской плотности до получения изображения соответствующего качества. Далее вручную выполнялось удаление всех структур грудной клетки вокруг корня и восходящей аорты. При наличии на структурах корня аорты образований, значительно отличающихся по рентгеновской плотности от тканей аорты (кальцинаты, вегетации, полости абсцессов), возможно их отдельное выделение путем подбора соответствующего значения рентгеновской плотности с последующим созданием их реконструкции. Далее работа осуществлялась в среде автоматизированного проектирования 3-Matic (Materialise, Leuven, Belgium). В программу 3-Matic v. 13.0 загружалась первичная трехмерная реконструкция корня аорты (файл в формате STL), удалялись все оставшиеся искажения и артефакты со стороны аорты и желудочковой поверхности створок аортального клапана. Следует отметить, что категорически запрещается обрабатывать таким образом структуры максимальным размером более 0,3 мм. После этого осуществлялось выделение из целостной модели аорты створок аортального клапана. Необходимо помнить, что фиксированный край каждой створки прикрепляется к фиброзному кольцу, а свободный располагается в просвете аорты и коаптит (смыкается) с соседними створками. Общий вид трехмерной реконструкции восходящей аорты после обработки в среде автоматизированного проектирования 3-Matic (Materialise, Leuven, Belgium) показан на рисунке 1.

Результаты измерения параметров клапанно-аортального комплекса

Все измерения выполнялись в среде программы In Vesalius v 3.1.1 (Centro de Tecnologia da Informação

Renato Archer, СТИ). Интересующие нас параметры фиброзного кольца включали в себя измерение диаметра виртуального фиброзного кольца, анатомического фиброзного кольца (на уровне аорто-желудочкового соединения) и синотубулярного соединения. Диаметр виртуального фиброзного кольца измерялся на уровне оснований створок аортального клапана. Диаметр анатомического фиброзного кольца измерялся на уровне прикрепления миокарда выходного отдела левого желудочка к фиброзным структурам аорты. Диаметр синотубулярного соединения измерялся на уровне высших точек комиссур. Также выполнялось измерение максимального диаметра синусов Вальсальвы в зоне фиброзного кольца путем расчета диаметра описанной вокруг корня аорты окружности, центром которой являлся центр зоны коаптации. Периметр фиброзного кольца определялся как сумма длин фиксированных краев полулунных створок. Площади створок аортального клапана определялись программой автоматически, при этом точность определения площади напрямую зависит от точности проведения первичной сегментации створок клапана. Для определения длин свободных краев створок клапана между двумя точками прикрепления створок к стенке аорты строилась кривая линия по верхней границе соответствующей створки при помощи инструмента «Измерить расстояние». Далее ее длина определялась автоматически и принималась за длину свободного края створки. Высоты комиссур АК определялись как наименьшее расстояние от точек прикрепления полулунных створок до плоскости виртуального фиброзного кольца. За максимальное расстояние от геометрического центра аорты до синуса Вальсальвы принимался радиус сферы, описывающей синус в границах синотубулярного

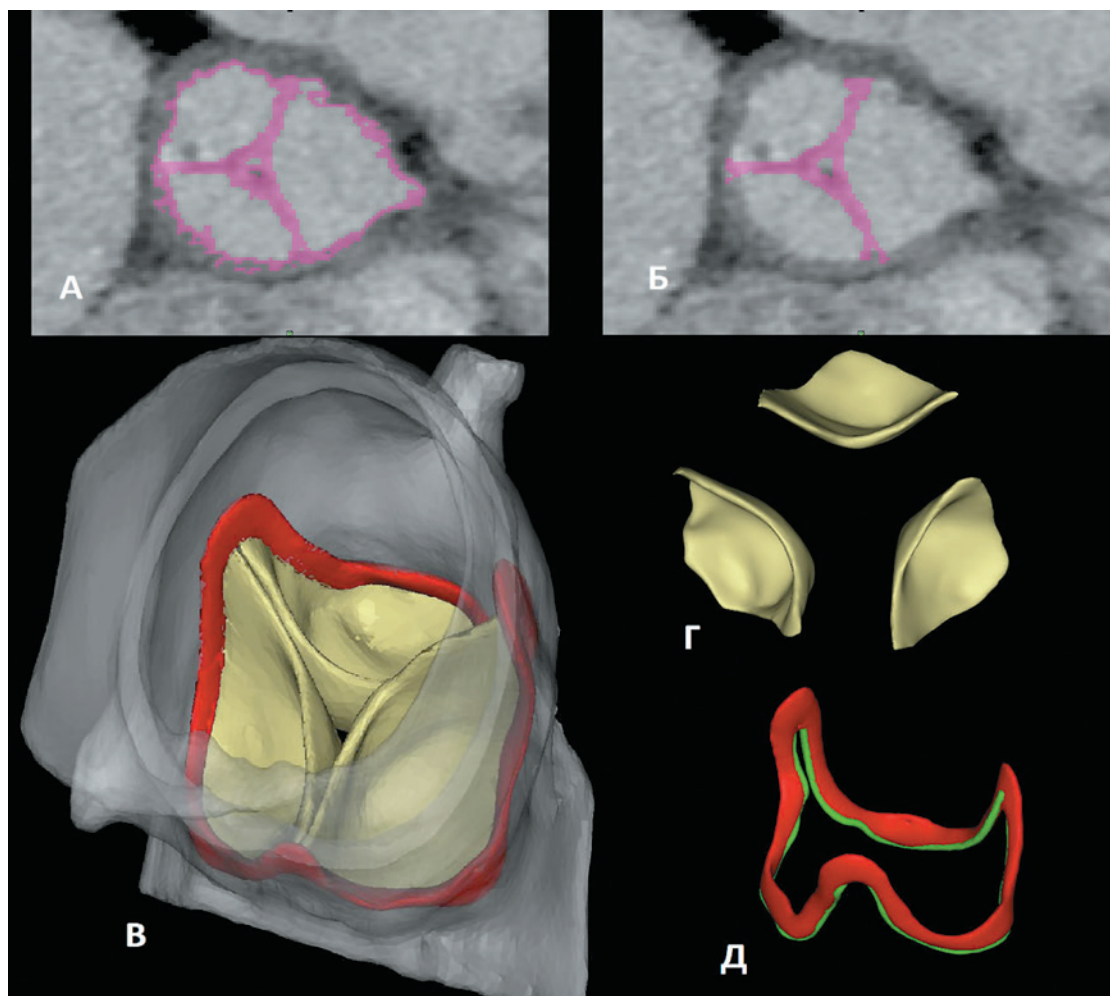


Рис. 1. Этапы построения высокоточной трехмерной реконструкции:

а — создание «3D-маски» аортального клапана, б — выделение зоны коаптации из органокомплекса АК, в — общий вид высокоточной реконструкции корня аорты (обращает на себя внимание нарушение смыкания створок в центре зоны коаптации); г, д — створки и фиброзное кольцо АК после выполнения сегментации структур корня аорты

соединения с центром, совпадающим с геометрическим центром зоны коаптации.

Данные измерений стереометрических параметров корня аорты исследуемого пациента представлены в таблице 2.

Анализ полученных данных показал значительное расширение фиброзного кольца аортального клапана, а также увеличение площадей его створок. Как следствие, отмечалось значительное уменьшение эффективной высоты створок и уменьшение длины зоны коаптации, что, в свою очередь, привело к формированию тяжелой центральной аортальной недостаточности. При этом отмечалось относительно симметричное расширение корня аорты на уровне синусов Вальсальвы, с небольшим преобладанием размеров некоронарной створки и соответствующе-

го синуса аорты. Симметричный характер расширения корня аорты и ретракция створок в сторону соответствующих синусов закономерно обуславливают нарушение смыкания створок в центре зоны коаптации и формирование соответствующего типа АН. Данное наблюдение было подтверждено как данными ЭхоКГ, так и визуализацией АК с помощью трехмерной реконструкции (рис. 1, в).

Симметричный характер расширения корня аорты и отсутствие эксцентричной аортальной регургитации представляют удовлетворительные условия для выполнения клапансохраняющего протезирования корня аорты. Оперативное лечение аневризмы корня аорты было выполнено по методике David I в условиях экстракорпорального кровообращения и изотермической кровяной кардиopleгии. Пери-



Рис. 2. Общий вид реконструкции аортального клапана, реимплантированного в протез корня аорты (18 месяцев после операции David I).

Розовым цветом отмечено устье левой коронарной артерии, реимплантированное на «площадке» по Kouchoukos

операционный период протекал без особенностей, пациент был переведен из отделения интенсивной терапии в общую палату на 1-е сутки после операции и выписан из стационара на 16-е сутки после операции. Интраоперационно и при выписке по данным ЭхоКГ отмечалась приклапанная АН.

Оценка реимплантированного аортального клапана в отдаленном послеоперационном периоде

Контрольное обследование пациента с целью оценки функционирования реимплантированного аортального клапана было выполнено через 18 месяцев после оперативного вмешательства. Клинически отмечалась полная регрессия явлений застойной ХСН, значимое повышение толерантности к физической нагрузке. Инструментальный этап обследования включал выполнение контрольной ЭхоКГ и РКТА с повторным построением высокоточной 3D-реконструкции реимплантированного АК и оценкой его структурных и функциональных особенностей. Данные ЭхоКГ в отдаленном периоде представлены в таблице 3.

По данным ЭхоКГ, прогрессирования АН в отдаленном периоде не отмечалось. Аортальная регургитация по сумме данных не превышала приклапанную (0–1 ст.). Полученные данные коррелировали с клинической картиной регрессировавшей ХСН, а также послеоперационными данными высокоточ-

ной реконструкции, показавшей восстановление коаптации створок, а также отсутствие их пролапса или рестрикции (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основным результатом данного исследования была разработка алгоритма сегментации корня аорты и построения высокоточной трехмерной реконструкции АК, а также разработка алгоритма определения основных его геометрических параметров. Описанный метод представляет ценность как для определения тактики и технических особенностей оперативного лечения пациента, так и для изучения влияния анатомии корня аорты на развитие рецидива АН после операции. Метод позволяет построить высокоточную трехмерную реконструкцию внутренних структур корня аорты в течение нескольких часов. При этом трехмерная реконструкция дает возможность детально визуализировать область интереса, что позволяет хирургу получить полную картину состояния корня аорты и АК перед операцией. При исследовании влияния планиметрических параметров АК на развитие патологии в послеоперационном периоде с помощью метода РКТА точность измерений размеров аорты в значительной степени зависит от квалификации специалиста и от правильной ориентации поперечных «срезов» аорты перпендикулярно ее оси. 3D-реконструкция позволяет

измерять расстояния между интересующими объектами с точностью до 0,2 мм. При этом используется метод аппаратного построения тангенциальной центральной оси аорты, и измерения размеров сосуда производятся перпендикулярно ей, исключается погрешность, обусловленная ориентацией срезов. Еще одним преимуществом метода над стандартной интерпретацией данных РКТА аорты является возможность измерять такие параметры корня аорты, как площади участков сложной формы (створки АК, синусы аорты), длины объектов сложной формы (периметр ФК АК), минимальные и максимальные расстояния между объектами, что, в свою очередь, служит дополнительным обширным массивом информации и представляет большой интерес для изучения. Точность измерений достигает 0,2 мм. Нельзя забывать и об ограничениях. Так как описанный метод использует исходные данные РКТА аорты, точность получаемых результатов напрямую зависит от разрешающей способности томографа и от качества выполненного исследования. Наличие высокоточной 3D-реконструкции открывает дополнительные возможности в области оперативного лечения патологии корня аорты и АК: преимущества в выборе индивидуальной пациент-ориентированной тактики оперативного лечения, в выборе параметров имплантируемого операционного материала и/или устройства.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Цукерман Г.И., Малашенков А.И., Хассан А., Русанов Н.И., Мовсесян Р.А. Хирургия аневризм восходящей аорты: ретроспективная оценка. Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. 1996; 3: 68–72.
2. Разумова Е.Т., Люсова В.А., Кокорин В.А. Расслоение аорты. Российский кардиологический журнал. 2001; 5: 88–94.
3. Русанов Н.И., Дорофеев А.В., Мовсесян Р.А., Малашенков А.И., Кондратьев В.Г., Паджев М.А., Быкова В.А., Шаноян С.А., Занкина О.И., Яковлев С.Е. Неотложные операции при остром расслоении аневризмы аорты типа А. Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. 2003; 4: 35.
4. David TE, Maganti M, Armstrong S. Aortic root aneurysm: principles of repair and long-term follow-up. J Thorac Cardiovasc Surg. Dec 2010; 140, 6 Suppl: 14–19.
5. Kallenbach K, Pethig K, Schwarz M, Milz A, Haverich A, Harringer W. Valve sparing aortic root reconstruction versus composite replacement — perioperative course and early complications. Eur J Cardiothorac Surg. July 2001; 20 (1): 77–81.
6. David TE, Feindel CM. An aortic valve-sparing operation for patients with aortic incompetence and aneurysm of the ascending aorta. J Thorac Cardiovasc Surg. Apr 1992; 103 (4): 617–621.
7. David TE, Feindel CM, Webb GD, Colman JM, Armstrong S, Maganti M. Long-term results of aortic valve-sparing operations for aortic root aneurysm. J Thorac Cardiovasc Surg. Aug 2006; 132 (2): 347–354.
8. Чернявский А.М., Столяров М.С., Ломиворотов В.В., Кливер Е.Н., Попов И.Л., Ковляков В.А., Зайцев Г.С. Хирургическое лечение аневризмы восходящего отдела аорты и аортальной недостаточности путем выполнения реимплантации аортального клапана в синтетический протез (операция David I). Патология кровообращения и кардиохирургия. 2004; 4: 69–71.
9. Berdajs D, Mosbahi S, Forro Z, Gerber C, Ferrari E. Numerical analysis of the 3-dimensional aortic root morphology during the cardiac cycle. Eur J Cardiothorac Surg. 2016; 49: 1213–21.
10. Bierbach BO, Aicher D, Issa OA, Bomberg H, Graber S, Glombitza P. Aortic root and cusp configuration determine aortic valve function. Eur J Cardiothorac Surg. 2010; 38: 400–6.
11. Kuniyara T, Aicher D, Rodionychewa S, Groesdonk HV, Langer F, Sata F, et al. Preoperative aortic root geometry and postoperative cusp configuration primarily determine long-term outcome after valve-preserving aortic root repair. J Thorac Cardiovasc Surg. 2012; 143: 1389–95.
12. Marom G, Haj-Ali R, Rosenfeld M, Schafers HJ, Raanani E. Aortic root numeric model: annulus diameter prediction of effective height and coaptation in post-aortic valve repair. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013; 145: 9–11.
13. Hamdan A, Guetta V, Konen E, Goitein O, Segev A, Raanani E, et al. Deformation dynamics and mechanical properties of the aortic annulus by 4-dimensional computed tomography. J Am Coll Cardiol. 2012; 59: 119–27.
14. Dagum P, Green GR, Nistal FJ, Daughters GT, Timek TA, Foppiano LE, et al. Deformational dynamics of the aortic root: modes and physiologic determinants. Circulation. 1999; 100.
15. Kim DH, Handschumacher MD, Levine RA, Joo Sun B, Jang JY, Yang DH, et al. Aortic valve adaptation to aortic root dilatation insights into the mechanism of functional aortic regurgitation from 3-dimensional cardiac computed tomography. Circ Cardiovasc Imaging. 2014; 7: 828–35.
16. Lansac E, Lim H-S, Shomura Y, Hiang Lim K, Rice NT, Goetz WA, et al. Aortic root dynamics are asymmetric. J Heart Valve Dis. 2005; 14: 400–7.

17. Bax JJ, Delgado V. Advanced imaging in valvular heart disease. *Nat Rev Cardiol.* 2017; 14:209–23],

18. Schafers H-J, Bierbach B, Aicher D. A new approach to the assessment of aortic cusp geometry. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006; 132:436–8.

Информация об авторах:

Филиппов Алексей Александрович, младший научный сотрудник НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НЦМУ «Центр персонализированной медицины», младший научный сотрудник НИЛ заболеваний аорты и аортального клапана ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Успенский Владимир Евгеньевич, д.м.н., заведующий НИЛ заболеваний аорты и аортального клапана ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Грубенко Григорий Александрович, специалист по тестированию программ для ЭВМ, Компания «ООО Кошелек.ру»;

Толпыгин Дмитрий Сергеевич, к.м.н., врач сердечно-сосудистый хирург отделения сердечно-сосудистой хирургии № 3 ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Карев Егор Андреевич, младший научный сотрудник НИЛ заболеваний аорты и аортального клапана ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Квиндт Павел Александрович, младший научный сотрудник НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Ананьевская Полина Валерьевна, старший научный сотрудник НИЛ биостатистики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Колодяжная Алина Олеговна, клинический ординатор кафедры акушерства и гинекологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Малашичева Анна Борисовна, д.б.н., старший научный сотрудник НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гордеев Михаил Леонидович, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник НИО кардиоторакальной хирургии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Filippov Aleksei A., Researcher of the Research Laboratory of diseases with excessive calcification of the World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Uspenskiy Vladimir E., MD, PhD, Head of the Research Laboratory of the aorta and aortic valve diseases of the Almazov National Medical Research Centre;

Grubenko Grigorii A., Specialist for digital software testing, “Koshelek.ru” Company;

Tolpygin Dmitry S., PhD, Cardiothoracic surgeon of the Department of cardio-thoracic surgery of the Almazov National Medical Research Centre;

Karev Egor A., Researcher of the Research Laboratory of the aorta and aortic valve diseases of the Almazov National Medical Research Centre;

Kvindt Pavel A., Researcher of the Research Laboratory of diseases with excessive calcification of the World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Ananyevskaya Polina V., Senior researcher at Biostatistics laboratory of the Almazov National Medical Research Centre;

Kolodyazhnaya Alina O., Clinical Resident of the Department of Obstetrics and Gynecology of the Almazov National Research Medical Centre;

Malashicheva Anna B., PhD, Senior Researcher of the Research Laboratory of diseases with excessive calcification of the World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Gordeev Mikhail L., Head of the Research Unit of Cardiothoracic Surgerz of the Almazov National Medical Research Centre.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616.126.52-089

КАЛЬЦИФИЦИРУЮЩИЙ АОРТАЛЬНЫЙ СТЕНОЗ: МАРКЕРЫ ТЯЖЕСТИ И ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ПАЦИЕНТОВ РАЗНОГО ХИРУРГИЧЕСКОГО РИСКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Успенский В. Е.¹, Салаватов Б. К.¹, Пищугин А. С.¹,
Толпыгин Д. С.¹, Малашичева А. Б.¹, Зверев Д. А.²,
Моисеева О. М.¹, Гордеев М. Л.¹

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

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Калининград, Россия

Контактная информация:

Успенский Владимир Евгеньевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: vladimiruspenskiy@gmail.com

Статья поступила в редакцию 01.04.2022
и принята к печати 18.04.2022.

РЕЗЮМЕ

Кальцифицирующий аортальный стеноз представляет собой один из наиболее часто встречающихся клапанных пороков сердца, требующих хирургической коррекции. Независимо от этиологии, следствием этого заболевания являются концентрическая гипертрофия левого желудочка и прогрессирующий фиброз миокарда, независимо влияющие на отдаленную выживаемость пациентов после протезирования аортального клапана. «Открытое» хирургическое или транскатетерное протезирование является единственным эффективным способом лечения аортального стеноза. «Золотым стандартом» остается «открытое» хирургическое вмешательство, однако транскатетерные виды устранения аортального стеноза бурно развиваются и начинают широко применяться у пациентов умеренного и низкого риска периоперационных осложнений. Для сравнительной оценки эффективности и безопасности транскатетерных и «открытых» хирургических вмешательств у пациентов разных категорий риска были проведены исследования OBSERVANT, NOTION, PARTNER, PARTNER 2, PARTNER 3, но на их основании нельзя сделать однозначный вывод о преимуществе того или иного метода. «Промежуточным» вариантом хирургической коррекции аортального стеноза в условиях экстракорпорального кровообращения и кардиopleгии, возможно, сочетающим преимущества классического хирургического и транскатетерного методов, является протезирование аортального клапана с использованием мини-доступа и, в ряде

случаев, с применением бесшовных протезов аортального клапана. Таким образом, вопрос об оптимальном методе коррекции тяжелого аортального стеноза у пациентов умеренного и высокого хирургического риска остается открытым. В процессе ведения подобных больных важно учитывать индивидуальные особенности пациентов и стремиться к персонализации лечения.

Ключевые слова: аортальный клапан, аортальный стеноз, гипертрофия, протезирование клапана сердца, транскатетерное протезирование аортального клапана, фиброз.

Для цитирования: Успенский В.Е., Салаватов Б.К., Пищугин А.С., Толпыгин Д.С., Малашичева А.Б., Зверев Д.А., Моисеева О.М., Гордеев М.Л. Кальцифицирующий аортальный стеноз: маркеры тяжести и подходы к лечению пациентов разного хирургического риска (обзор литературы). Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(3):89-100. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-89-100

CALCIFIC AORTIC STENOSIS: MARKERS OF SEVERITY AND APPROACHES TO THE TREATMENT OF PATIENTS WITH DIFFERENT SURGICAL RISKS (LITERATURE REVIEW)

Uspenskiy V. E.¹, Salavatov B. K.¹, Pischugin A. S.¹, Tolpygin D. S.¹, Malashicheva A. B.¹, Zverev D. A.², Moiseeva O. M.¹, Gordeev M. L.¹

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Federal Center of High Medical Technologies of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kaliningrad, Russia

Corresponding author:

Uspenskiy Vladimir E.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: vladimiruspenskiy@gmail.com

Received 01 April 2022; accepted 18 April 2022.

ABSTRACT

Calcific aortic stenosis is one of the most common valvular heart diseases, which may require surgery. Regardless of the etiology, the consequence of this disease is concentric hypertrophy of the left ventricle and progressive myocardial fibrosis, independently affecting the long-term survival of patients after aortic valve replacement. “Open” surgical or transcatheter aortic valve replacement is the only effective way to treat aortic stenosis. “Open” surgical procedure remains the “gold standard”, however, transcatheter aortic valve replacement is characterized by rapid development and expansion to the population of moderate and low-risk patients. For a comparative assessment of the effectiveness and safety of transcatheter and “open” surgical procedures in patients of different risk categories, OBSERVANT, NOTION, PARTNER,

PARTNER 2, PARTNER 3 studies were conducted, but on their basis, it is impossible to draw an unambiguous conclusion about the advantage of one or another method. An “intermediate” option for surgical correction of aortic stenosis in conditions of extracorporeal circulation and cardioplegia, possibly combining the advantages of classical surgical and transcatheter methods, is the replacement of the aortic valve with mini-invasive access and, in some cases, using seamless aortic valve prostheses. Thus, the question of the optimal method of correction of severe aortic stenosis in patients with moderate and high surgical risk remains open. In the process of managing such patients, it is important to take into account the individual characteristics of patients and strive to personalize treatment.

Key words: aortic valve, aortic valve stenosis, fibrosis, heart valve prosthesis, hypertrophy, transcatheter aortic valve replacement.

For citation: Uspenskiy VE, Salavatov BK, Pischugin AS, Tolpygin DS, Malashicheva AB, Zverev DA, Moiseeva OM, Gordeev ML. Calcific aortic stenosis: markers of severity and approaches to the treatment of patients with different surgical risks (literature review). Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(3):89-100. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-89-100

Информация о соблюдении этических норм при проведении исследования:

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации.

Список сокращений: АК — аортальный клапан, АС — аортальный стеноз, ЛЖ — левый желудочек, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, СН — сердечная недостаточность, ФВ — фракция выброса, BNP — натрийуретический пептид В-типа, GLS — общая продольная деформация, SAVR — хирургическое протезирование аортального клапана, TAVR — транскатетерное протезирование аортального клапана.

ВВЕДЕНИЕ

Кальцифицирующий (дегенеративный) аортальный стеноз (АС) среди населения Европы и Северной Америки является самым частым поражением клапанного аппарата сердца, требующим хирургического вмешательства. В общей популяции встречаемость этой патологии составляет 0,4 %. В последние два десятилетия число случаев аортального стеноза и обусловленной им летальности растет, прежде всего, вследствие общего старения населения и роста средней продолжительности жизни [1]. Наиболее часто АС развивается вследствие кальцификации створок нормального трехстворчатого аортального клапана (АК).

Другими причинами АС могут быть врожденный двустворчатый или моностворчатый АК, сопряженный с ранними дегенеративными изменениями створок, а также ревматическое поражение АК. Возможными вариантами формирования тяжелого АС является дисфункция или структурная дегенерация ранее имплантированного протеза АК [2–4]. Распространенность первичного кальцифицирующего АС растет с возрастом, составляя 0,2 % в категории пациентов 50–59 лет, 1,7 % среди лиц старше 65 лет и увеличиваясь до 9,8 % в группе больных 80–89 лет. При медикаментозном лечении тяжелого аортального стеноза 5- и 10-летняя летальность составляет соответственно 50 % и 90 % [5]. Независимо от этиологии, следствиями АС являются концентрическая гипертрофия левого желудочка (ЛЖ) и прогрессирующий фиброз миокарда, приводящие к снижению податливости ЛЖ и диастолической дисфункции. Именно фиброз миокарда способствует прогрессированию диастолической дисфункции ЛЖ и в итоге приводит к появлению сердечной недостаточности (СН) [6, 7]. Согласно рекомендациям Американского колледжа кардиологов и Американской ассоциации сердца (ACC/AHA) 2014 года, а также Европейского общества кардиологов/Европейского общества кардиоторакальных хирургов (ESC/EACTS) 2017 года, критериями тяжелого АС являются средний градиент давления на АК > 40 мм рт. ст., площадь открытия клапана < 1,0 см², пиковая скорость кровотока на клапане > 4,0 м/с. Хирургическая коррекция АС показана в случае тяжелого симптомного сте-

ноза, а также при одномоментном вмешательстве на других клапанах сердца, коронарных артериях, восходящей аорте, при снижении сократительной способности ЛЖ, а также у лиц с положительным результатом нагрузочной пробы. Возможность вмешательства на АК должна обсуждаться при асимптомном экстремально тяжелом АС (ускорение кровотока на АК $> 5,0$ м/с), в случае прироста скорости кровотока на АК $> 0,3$ м/с, при низкоградиентном АС с дисфункцией ЛЖ и наличием резервов сократимости. Коррекция АС может рассматриваться у лиц без клинических проявлений порока с выраженной гипертрофией ЛЖ (> 15 мм) или с низкоградиентным АС с дисфункцией ЛЖ без резервов сократимости [8, 9]. При выборе метода лечения обязательной является оценка риска возможных осложнений и неблагоприятного исхода. Основными критериями, позволяющими отнести пациента с тяжелым АС к той или иной группе хирургического риска, являются пожилой возраст, женский пол, выраженность кальциноза створок АК, дисфункция ЛЖ (фракция выброса (ФВ) ЛЖ < 40 %), более высокий класс СН, наличие легочной гипертензии (систолическое давление в легочной артерии > 25 мм рт. ст.), сопутствующие заболевания (хроническая обструктивная болезнь легких, хроническая болезнь почек, сахарный диабет) [10].

АОРТАЛЬНЫЙ СТЕНОЗ И ЗАМЕСТИТЕЛЬНЫЙ ФИБРОЗ МИОКАРДА

Компонентом естественного течения АС является прогрессирующий фиброз миокарда. Выраженность фиброза ЛЖ отражает показатель общей продольной деформации (global longitudinal strain — GLS) ЛЖ — эхокардиографическая мера деформации миокарда, определяющая величину его продольного укорочения. GLS может отражать степень субклинической дисфункции ЛЖ, и ее изменения коррелируют с выраженностью фиброза миокарда и миокардиальной дисфункции у пациентов с сохранной ФВ ЛЖ [11, 12]. В своем исследовании S. Herrmann и соавторы (2018) выявили корреляцию между степенью фиброза миокарда и выживаемостью после коррекции АС: чем выше была степень фиброза, тем ниже оказывалась выживаемость [13]. Другая группа исследователей также проанализировала результаты протезирования АК по поводу тяжелого АС. У пациентов с исходно нормальными сократимостью и GLS ЛЖ в среднесрочном периоде после операции смертность оказалась существенно ниже по сравнению с лицами со сниженной ФВ ЛЖ ($p = 0,001$), и с

больными, имевшими снижение GLS в сочетании с нормальной ФВ ЛЖ ($p = 0,024$) (рис. 1). Значимые различия в выживаемости пациентов последних двух категорий (с нормальной ФВ ЛЖ в сочетании с «нарушенной» GLS и больными со сниженной ФВ ЛЖ) обнаружены не были ($p = 0,34$). Общая выживаемость пациентов с нормальными ФВ ЛЖ и GLS через 6 месяцев и 1 год составили 98,2 % (СО 1,8 %) и 92,3 % (СО 4,4 %), соответственно. Совокупная выживаемость больных с нормальной ФВ ЛЖ, но с «нарушенной» GLS через 6 месяцев и 1 год составила 84,7 % (СО 5,5 %) и 77,7 % (СО 8,5 %), соответственно. Наконец, совокупная выживаемость пациентов с тяжелой формой АС и сниженной ФВ ЛЖ через 6 месяцев и 1 год составили 83,2 % (СО 4,3 %) и 75,0 % (СО 6,0 %), соответственно [14].

БИОМАРКЕРЫ АОРТАЛЬНОГО СТЕНОЗА

Помимо жесткости миокарда ЛЖ, с прогнозом и риском хирургического лечения связаны уровни натрийуретического пептида В-типа (brain natriuretic peptide — BNP) и микро-РНК-21. Повышение уровня BNP выявляется даже при минимальных клинических проявлениях СН и положительно коррелирует с ее степенью. Рост концентрации BNP можно наблюдать при асимптомной левожелудочковой дисфункции, артериальной или легочной гипертензии, гипертрофии миокарда, патологии клапанов сердца, аритмиях и остром коронарном синдроме [15]. Говоря о BNP, нельзя не упомянуть микро-РНК-21 — биомаркере, ассоциированном с развитием фиброза миокарда вследствие перегрузки давлением [16]. Микро-РНК представляют собой небольшие некодирующие РНК, которые модулируют экспрессию генов-мишеней, вызывающих деградацию матричной РНК. Экспрессия микро-РНК ассоциирована с множественными патологическими процессами, которые влияют, среди прочих, на сердечно-сосудистую систему [17]. I. Fabiani и коллеги (2016) продемонстрировали значительные изменения уровня микро-РНК-21 у пациентов с тяжелым АС и фиброзом миокарда. Такая биогуморальная оценка позволяет лучше оценивать/представлять процесс ремоделирования, происходящий у лиц с тяжелым АС, возможно, дополнительно улучшая стратификацию риска пациентов [18]. В другом исследовании та же группа авторов обнаружила прямую зависимость между степенью фиброза миокарда и уровнем микро-РНК-21 [19]. Подытоживая изложенные факты, можно сделать вывод о существовании ряда признаков и состояний, неучтенных в общепринятых международных

и национальных рекомендациях и шкалах риска, однако способных значительно повышать риск периоперационных осложнений, таких как фиброз миокарда ЛЖ, «фарфоровая» аорта, гипертрофическая кардиомиопатия [20].

АОРТАЛЬНЫЙ СТЕНОЗ И «ХРУПКОСТЬ» ПАЦИЕНТА

В последние годы из-за общего постарения населения и утяжеления характера патологии пациентов в клинической медицине все более актуальным становится понятие «дряхлости» или «хрупкости». «Дряхлость» (*англ.* frailty, происходит от французского слова *frêle* — хилый, хрупкий) является биологическим синдромом, отражающим состояние пониженного физиологического резерва и уязвимость по отношению к стресс-факторам. Оценка «дряхлости» может улучшить прогнозирование результатов лечения в дополнение к существующим моделям оценки риска, помогает выбрать оптимальный путь лечения пациента и разработать индивидуальный план лечения, что значительно улуч-

шает вероятность достижения хорошего результата [21]. Общепринятых стандартизованных критериев оценки «дряхлости» до настоящего времени не создано. Большинство инструментов для ее верификации базируются на ключевых фенотипических особенностях пожилого организма: низкая скорость ходьбы, слабость, пассивность, истощение и уменьшение массы тела. Для оценки выраженности «дряхлости» используют специальные тесты на физическую активность, способность к выполнению нагрузки, а также специальные опросники. Заслуженной популярностью среди прочих пользуется определение F-индекса («индекс дряхлости»). Для его расчета разработано свыше 20 инструментов, большинство из которых базируются на определении от 1 до 5 ключевых факторов, определяющих фенотип «дряхлости»: медлительность, слабость, низкая физическая активность, истощение, уменьшение массы тела. Медлительность характеризуется скоростью комфортной ходьбы, слабость — тестом на ручном динамометре, другие факторы оцениваются по опросникам или специализированными средствами [22].

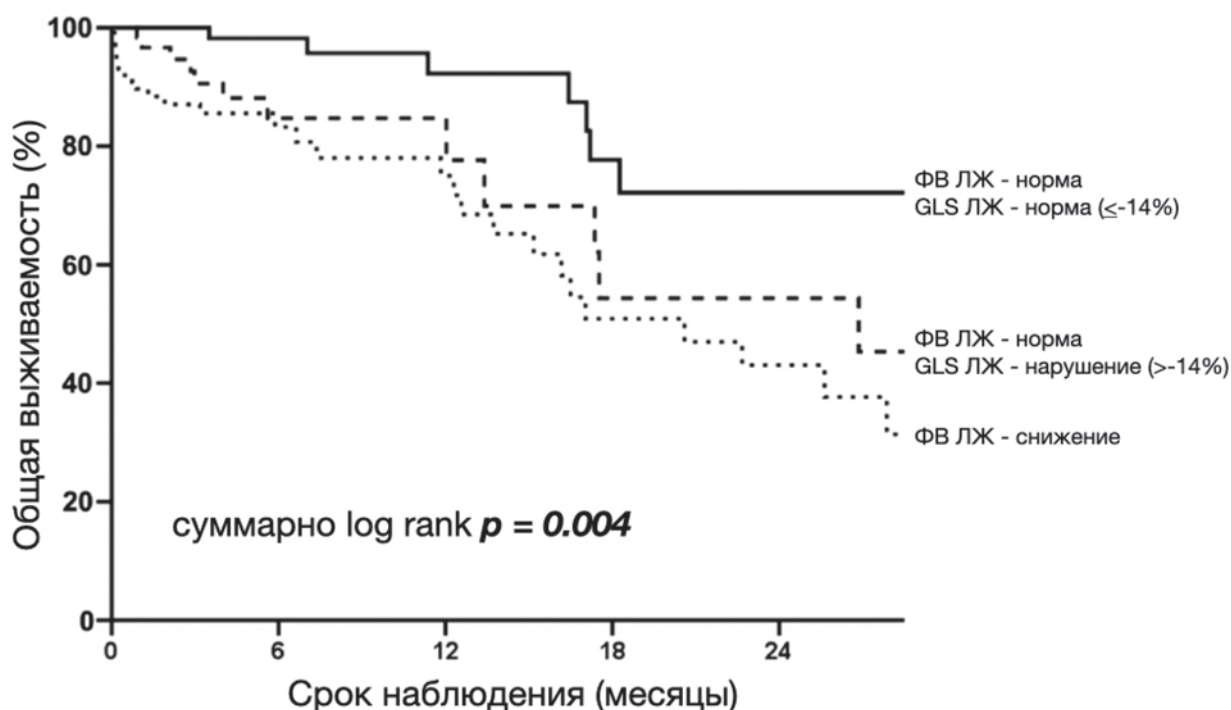


Рис. 1. Выживаемость после хирургической коррекции тяжелого аортального стеноза в сочетании со сниженной ФВ ЛЖ (.....), с нормальной ФВ ЛЖ, но с нарушением GLS ($> -14\%$) (-----), с нормальными ФВ ЛЖ и GLS ($\leq -14\%$) (—) (адаптировано из Ng ACT, et al., 2018) [40].

Примечания: ЛЖ — левый желудочек, ФВ — фракция выброса, GLS — общая продольная деформация

ОБЩИЕ ПОДХОДЫ К ХИРУРГИИ АОРТАЛЬНОГО СТЕНОЗА

Эффективной медикаментозной терапии для лечения дегенеративного АС на сегодняшний день не разработано, и единственным действенным способом коррекции является протезирование АК. «Открытое» хирургическое замещение АК (surgical aortic valve replacement — SAVR) механическим или биологическим протезом является «золотым стандартом» лечения тяжелого дегенеративного АС и в настоящий момент представляет собой достаточно рядовую операцию на «открытом» сердце. Каждый год в США проводится около 67 500 операций протезирования АК. Госпитальная летальность при изолированном протезировании АК колеблется от 2,9 % до 3,7 % [23]. В России в 2019 году было выполнено 7318 операций протезирования АК в условиях искусственного кровообращения, из них

6365 по поводу дегенеративных пороков (в 2018 г., соответственно, 6819 и 4940 вмешательств) [24].

Так как встречаемость АС растет с общим постарением населения, актуальным является изучение результатов лечения этой патологии у лиц старшей возрастной группы. И. И. Скопин и др. (2018 г.) провели ретроспективный анализ результатов SAVR у больных старше 65 лет, прооперированных в период с 2011 по 2015 годы. Среднее значение риска операции по EuroSCORE составило $6,09 \pm 4,45$ %. Общая госпитальная летальность составила 4,8 %, а при сопутствующем коронарном шунтировании выросла до 8,8 %. С высоким риском послеоперационной летальности статистически значимо были связаны срочность хирургического вмешательства, острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) в прошлом, ожирение, хроническая болезнь почек 3 стадии, хроническая обструктивная болезнь легких, высокая легочная гипертензия,

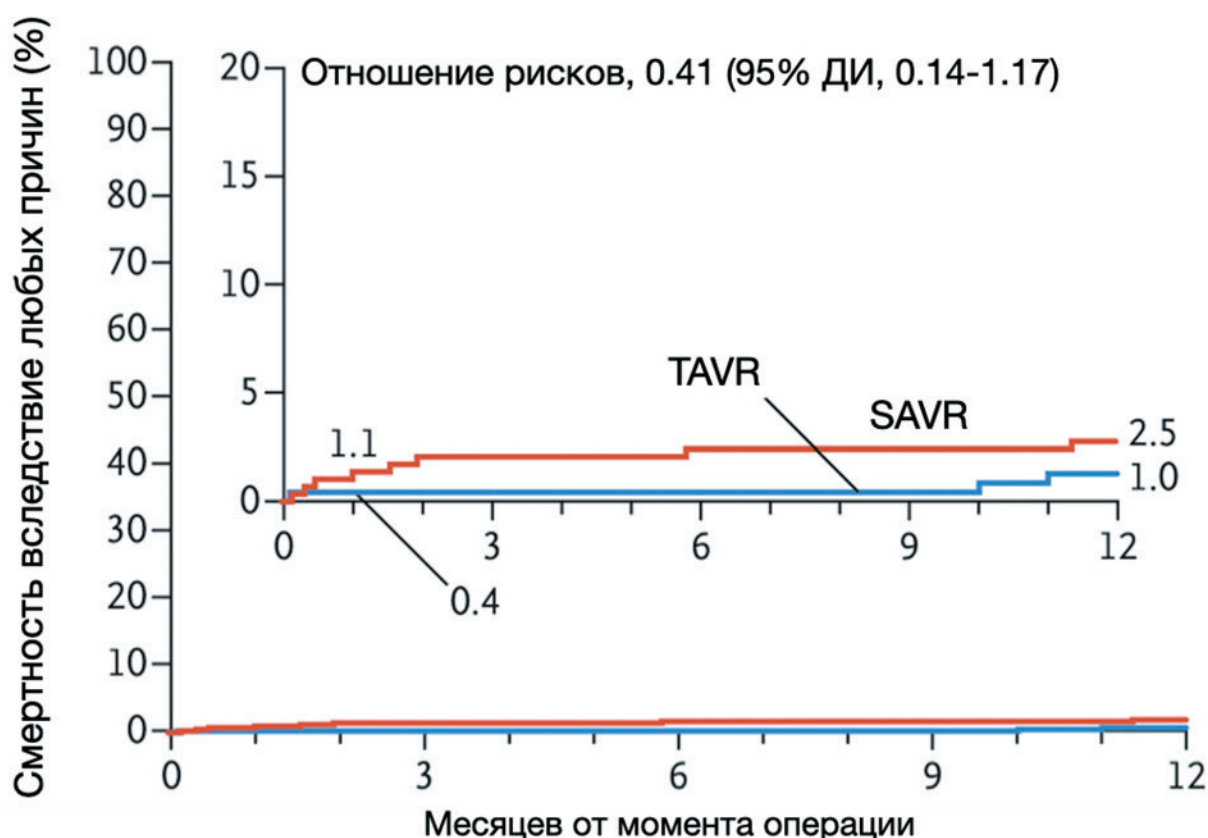


Рис. 2. Смертность вследствие любых причин в течение 12 месяцев у пациентов после транскатетерного (TAVR) и «открытого» хирургического (SAVR) протезирования аортального клапана (адаптировано из Mack MJ, et al., 2019) [34].

Примечания: ДИ — доверительный интервал, TAVR — транскатетерное протезирование аортального клапана, SAVR — хирургическое протезирование аортального клапана

злокачественные новообразования в анамнезе (в том числе с лучевой терапией), мультифокальный атеросклероз со стенозами более 50 %, постоянная форма фибрилляции предсердий, IV функциональный класс СН по New York Heart Association, расширение восходящей аорты, кальциноз 3 степени и узкое фиброзное кольцо АК, наличие трех и более заболеваний [25]. Следует еще раз заострить внимание на том, что далеко не все перечисленные факторы риска учитываются в шкалах, оценивающих риск осложнений планируемого хирургического вмешательства.

ТРАНСКАТЕТЕРНОЕ ПРОТЕЗИРОВАНИЕ АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА

В последние годы растет число случаев транскатетерного протезирования аортального клапана (transcatheter aortic valve replacement — TAVR). Эта методика впервые была предложена Alain Cribier в 2002 году для лечения пациентов с тяжелым декомпенсированным АС, которым было отказано в «открытом» хирургическом вмешательстве по причине крайне высокого риска осложнений и периоперационной летальности [26]. Транскатетерное протезирование АК заключается в доставке биологического стент-клапана в позицию нативного АК доступом через одну из крупных артерий (бедренную, подмышечную и др.), и его раскрытии самостоятельно или раздуваемым баллоном. Преимуществами этого метода коррекции являются малая травматичность, низкая частота послеоперационных кровотечений, минимизация времени пребывания в стационаре [27]. 290 000 пациентов пожилого возраста с тяжелым АС являются кандидатами на TAVR, и 27 000 пациентов во всем мире ежегодно его выполняют [28]. Несмотря на существенные улучшения устройств для TAVR, ряд специфических осложнений остается заслуживающим внимания: парапротезная регургитация, структурная деформация клапана, нарушения проводимости, требующие имплантации постоянного электрокардиостимулятора, а также тромбоз клапана и ОНМК [29]. С совершенствованием TAVR наблюдается постепенное расширение этой методики на когорту пациентов среднего и низкого риска. В 2019 году в клиниках нашей страны было выполнено 1178 операций транскатетерного протезирования АК (+28,5 % по сравнению с 2018 г.). Максимальное количество устройств TAVR при приобретенной патологии клапанов сердца в 2018 году установлено в НМИЦ кардиологии Москвы (338 случаев), далее с большим отрывом по количеству проведенных

вмешательств следуют ФЦССХ Пензы (94), НМИЦ им. Е. Н. Мешалкина (61), НМИЦ им. В. А. Алмазова (57) [24]. Паллиативная баллонная вальвулопластика АК может применяться как мост к SAVR или TAVR у гемодинамически нестабильных пациентов или у лиц с симптоматическим тяжелым АС, которым показана срочная некардиохирургическая операция. Кроме того, этот метод можно использовать в качестве диагностического у пациентов с тяжелым АС или другими потенциальными причинами симптомов (например, заболевания легких) и у лиц с тяжелой дисфункцией миокарда, преренальной недостаточностью или другой дисфункцией органа, которая может быть обратимой с помощью баллонной вальвулопластики АК [8]. В 2019 году в России эта процедура была выполнена у 71 пациента с госпитальной летальностью 4,23 % [24].

При выборе метода лечения АС учитываются кардиальные и некардиальные особенности пациента, индивидуальный хирургический риск, оцениваемый мультидисциплинарной командой специалистов (heart team) в дополнение к балльным оценкам шкал рисков, техническая выполнимость TAVR и SAVR, возможности, опыт и результаты конкретной клиники. SAVR рекомендуется выполнять пациентам с низким хирургическим риском (STS/EuroSCORE II < 4 % или логистический EuroSCORE I < 10 %). Пациентам с повышенным хирургическим риском (STS или EuroSCORE II > 4 % или логистический EuroSCORE I > 10 %) предпочтительнее выполнить TAVR, однако окончательный выбор в пользу TAVR или SAVR принимается после обсуждения heart team. При выборе метода коррекции учитывается возраст, наличие эндокардита, анамнез вмешательств на «открытом» сердце, анатомические аспекты, позволяющие выполнить TAVR, сопутствующая кардиальная патология, требующая хирургической реконструкции [8].

Для оценки результатов, оптимизации использования TAVR и сравнения с результатами SAVR было проведено несколько крупных рандомизированных исследований, и исторически первое из них называлось PARTNER (Placement of AoRtic TraNscathetER valve). В нем приняли участие 25 клиник: 2 из Канады, 1 из Германии и 23 из США. В исследование было включено 699 пациентов (средний возраст 83,6 ± 6,8 лет, 348 больным выполнено TAVR, 351 — SAVR) с уровнем EuroSCORE II > 8 %, что соответствует высокому хирургическому риску. Смертность вследствие любых причин в течение 1, 3 и 5 лет после операций была практически одинаковой в группах TAVR и SAVR [30]. В многоцентровом исследовании OBSERVANT (OBservational Study of Effectiveness of SAVR-TAVI pRocedures for seVere

Aortic steNosis Treatment) были проанализированы результаты лечения 1300 пациентов с тяжелым АС, разделенных методом propensity score на 2 равные группы, которым в период с 2010 по 2012 годы выполнялась «открытая» хирургическая (группа SAVR) или транскатетерная (группа TAVR) коррекция тяжелого АС. Средний уровень EuroSCORE II в группах SAVR и TAVR составил $5,1 \pm 6,2$ % и $4,9 \pm 5,1$ % соответственно ($p = 0,485$). В течение 5 лет смертность вследствие любых причин в группе TAVR составила 44,5 %, а в группе SAVR — 35,8 % (рис. 2). «Большие» неблагоприятные сердечно-сосудистые события в группе TAVR встречались в 54 % случаев, в группе SAVR — в 42,5 %, что свидетельствует о преждевременности широкого распространения транскатетерных технологий на контингент пациентов с умеренным и низким хирургическим риском, по крайней мере, при использовании транскатетерных биопротезов генерации 2010–2012 годов (рис. 3) [31]. В рамках исследования NOTION (Nordic Aortic Valve Intervention) с декабря 2009-го по апрель 2013 года 276 пациентов были рандомизированы в группы TAVR (142 больных) и SAVR (134 пациента). 82 % пациентов относились к группе низкого хирургического риска (средний балл по шкале STS составлял $2,9 \pm 1,6$ %), средний возраст — $79,2 \pm 4,9$ лет. Данное исследование не выявило статистически значимого различия между результатами SAVR и TAVR по уровню смертности от всех причин в течение 1 года после операции (4,9 % против 7,5 %, $p = 0,380$) [32]. Исследование PARTNER II (2016 г.) включало 2032 пациента умеренного риска (средний балл по шкале STS 5,8 %, средний возраст $81,5 \pm 6,7$ лет), из которых 1011 больным выполнено TAVR, 1021 — SAVR. Интересно, что по частоте смертности вследствие любых причин или инвалидизирующего ОНМК в течение двух лет статистически значимого различия между TAVR (18,7 %) и SAVR (21,0 %) выявлено не было, однако тот же показатель в подгруппе исследуемых, которым TAVR выполнялось трансфеморальным доступом (16,3 %), был значимо ниже, чем в группе SAVR (20,0 %) [33]. В одном из последних исследований, PARTNER III, проведенном в период с 25 марта 2016 года по 26 октября 2017 года, согласились принять участие 1520 пациентов из 71 учреждения (в США, Канаде, Японии, Австралии и Новой Зеландии), с тяжелым симптомным АС и низким хирургическим риском (средний балл по шкале STS $1,9 \pm 0,7$ %). Средний возраст больных составил $73,3 \pm 5,8$ лет. Для транскатетерной коррекции тяжелого АС в данном исследовании использовался баллон-расширяемый клапан нового поколения SAPIEN 3 (Edwards Lifesciences).

В силу различных причин из исследования были исключены 570 пациентов, и оставшиеся 950 были разделены на 2 группы: TAVR ($n = 496$) и SAVR ($n = 454$). В течение 12 месяцев после вмешательств не было обнаружено статистически значимых различий у пациентов обеих групп по показателям летальности вследствие любых причин (в группе TAVR — 1,0 %, в группе SAVR — 2,5 %, $p = 0,410$ (рис. 2)) и встречаемости ОНМК (1,2 % и 3,1 % в группах TAVR и SAVR соответственно, $p = 0,380$ (рис. 3)). Тем не менее, следует обратить внимание на весьма жесткие критерии невключения пациентов в данное исследование: широкое (> 28 мм) или узкое (< 18 мм) фиброзное кольцо АК, «дряхласть», двустворчатый АК, фракция выброса ЛЖ < 30 %, тяжелая аортальная, митральная, трикуспидальная регургитация, выраженный кальциноз клапанно-аортального комплекса, низкое расположение устьев коронарных артерий и/или их тяжелое атеросклеротическое поражение, включая стеноз ствола левой коронарной артерии, острый инфаркт миокарда в течение месяца до вмешательства, ОНМК или транзиторная ишемическая атака в течение 90 суток до вмешательства, ранее имплантированный любой протез клапана сердца, симптомное поражение каротидного и/или вертебрального бассейна, анемия/тромбоцитопения или высокий риск кровотечения, тяжелая легочная патология или тяжелая легочная гипертензия [34]. С. Сао и соавторы (2016) сравнили клинические результаты и экономическую эффективность, а также провели метаанализ TAVR и SAVR и получили неоднозначные результаты. Метаанализ не выявил существенных различий в отношении смертности, ОНМК, инфаркта миокарда или острой почечной недостаточности. У пациентов после «открытого» хирургического протезирования АК чаще возникали сосудистые осложнения или нарушения проводимости, требующие имплантации постоянного электрокардиостимулятора, в то время как у лиц, перенесших транскатетерные вмешательства, чаще встречались геморрагические осложнения. По уровню смертности или частоте ОНМК после транскатетерных или «открытых» операций существенных различий не наблюдалось, однако экономическую и долгосрочную эффективность TAVR авторы посчитали заслуживающей дальнейшего изучения [35].

БЕСШОВНЫЕ ПРОТЕЗЫ АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА

Нельзя не упомянуть о существовании модификации «открытого» хирургического лечения тяжелого АС — бесшовных протезах АК. Данная

технология обеспечивает быструю имплантацию протеза клапана сердца с использованием минимального числа (1–3) «наводящих» швов или без них. Впервые концепция бесшовных протезов клапанов сердца была апробирована в начале 60-х годов XX века. Основной идеей было упрощение имплантации, уменьшение времени ишемии миокарда и длительности искусственного кровообращения [36]. С улучшением перфузионных технологий и способов защиты миокарда данная методика отошла на второй план из-за большого количества осложнений — формирования парапротезных фистул и связанных с клапаном тромбоэмболических осложнений. В последнее время с прогрессом в области разработки клапанов интерес к бесшовным клапанам возрос. Несколькими ведущими производителями разработан и сертифицирован для клинического применения ряд моделей бесшовных протезов клапанов сердца: Perceval (LivaNova), INTUITY

Elite valve system (Edwards), 3f Enable (Medtronic), и получены весьма обнадеживающие результаты их использования. Укорочение времени имплантации АК может снизить частоту осложнений и периоперационную летальность, особенно в случае многоклапанного протезирования, сопутствующего коронарного шунтирования, а также при хирургической коррекции аортального порока с применением мини-доступа [37–39].

Проанализировав рандомизированные, нерандомизированные исследования и метаанализы, полагаем ошибочным делать однозначный выбор в пользу транскатетерного или «открытого» хирургического способа коррекции тяжелого АС, основываясь исключительно на уровне хирургического риска по шкалам EuroSCORE II или STS. При определении метода лечения больных данной категории важно принимать во внимание индивидуальные особенности каждого пациента и факторы, не учтенные

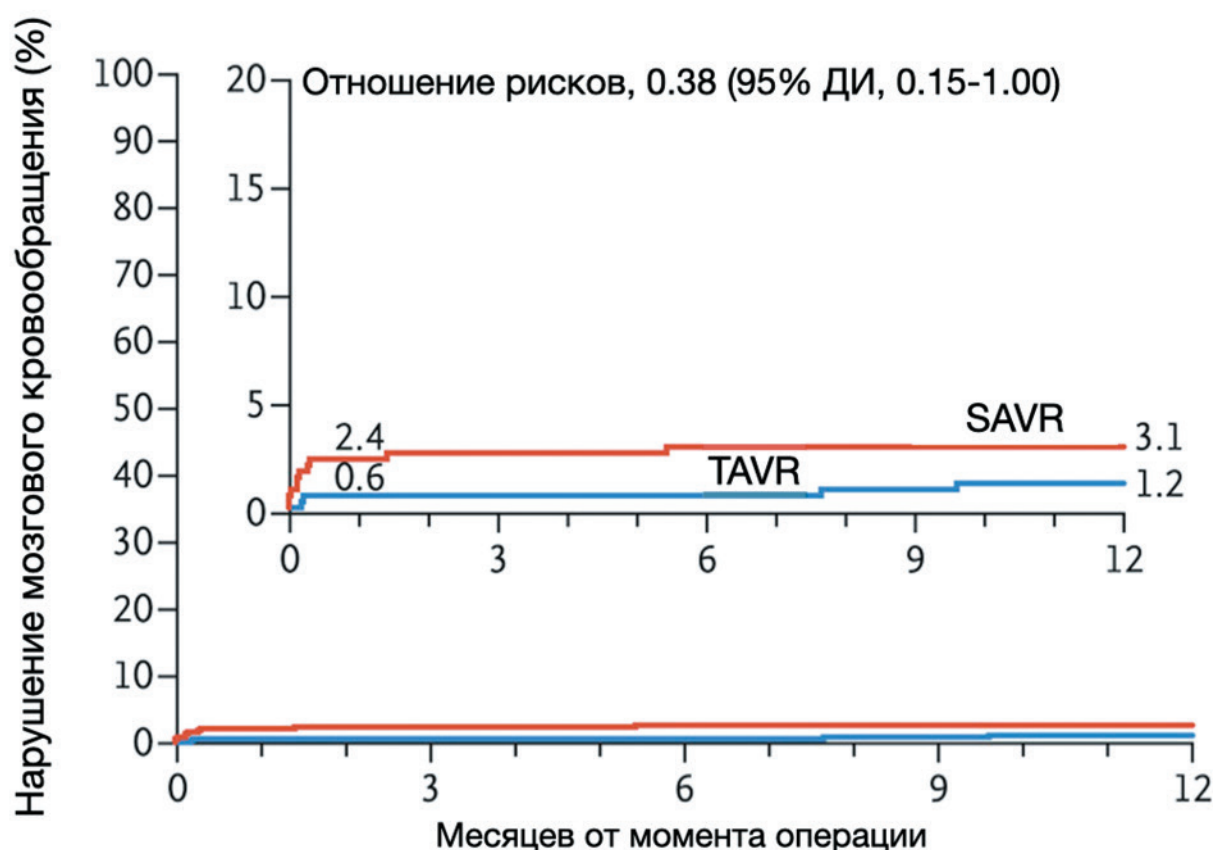


Рис. 3. Встречаемость нарушений мозгового кровообращения в течение 12 месяцев после транскатетерного (TAVR) и «открытого» хирургического (SAVR) протезирования аортального клапана (адаптировано из Mask MJ, et al., 2019) [34].

Примечания: ДИ — доверительный интервал, TAVR — транскатетерное протезирование аортального клапана, SAVR — хирургическое протезирование аортального клапана

в общепринятых шкалах риска («фарфоровая» аорта, гипертрофическая кардиомиопатия, «дряхлость»), и стремиться к персонализации лечения. Немаловажным является установление степени фиброза миокарда у лиц как со сниженной, так и с сохранной сократительной способностью ЛЖ, а также лабораторных предикторов осложненного течения заболевания (плазменные уровни BNP и микро-РНК-21). Несмотря на прогресс в развитии транскатетерных технологий и общемировую тенденцию к расширению применения этой методики у категорий больных умеренного и низкого риска, лидирующая позиция пока остается за «открытым» хирургическим протезированием АК. Целесообразной является разработка многофакторной системы прогнозирования осложнений и летальности при разных способах коррекции тяжелого АС у пациентов низкого, умеренного и высокого хирургического риска с учетом дополнительных факторов, влияющих на периоперационные осложнения и отдаленный прогноз.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Coffey S, Roberts-Thomson R, Brown A, Carapetis J, Chen M, Enriquez-Sarano M, et al. Global epidemiology of valvular heart disease. *Nature Reviews Cardiology*. 2021.
2. Kanwar A, Thaden JJ, Nkomo VT. Management of patients with aortic valve stenosis. *Mayo Clinic proceedings*. 2018;93(4):488–508.
3. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Iung B, Lancellotti P, Otto CM, et al. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16006.
4. Thaden JJ, Nkomo VT, Enriquez-Sarano M. The global burden of aortic stenosis. *Progress in cardiovascular diseases*. 2014;56(6):565–71.
5. Eveborn GW, Schirmer H, Heggelund G, Lunde P, Rasmussen K. The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. the Tromsø study. *Heart (British Cardiac Society)*. 2013;99(6):396–400.
6. Bing R, Cavalcante JL, Everett RJ, Clavel MA, Newby DE, Dweck MR. Imaging and impact of myocardial fibrosis in aortic stenosis. *JACC Cardiovascular imaging*. 2019;12(2):283–96.
7. Badhwar V, Rankin JS, Ad N, Grau-Sepulveda M, Damiano RJ, Gillinov AM, et al. Surgical ablation of atrial fibrillation in the United States: trends and propensity-matched outcomes. *The Annals of thoracic surgery*. 2017;104(2):493–500.
8. Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, De Bonis M, Hamm C, Holm PJ, et al. 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *European heart journal*. 2017;38(36):2739–91.
9. Hiratzka LF, Creager MA, Isselbacher EM, Svensson LG, Nishimura RA, Bonow RO, et al. Surgery for aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valves: A statement of clarification from the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2016;151(4):959–66.
10. Harris AW, Pibarot P, Otto CM. Aortic stenosis: guidelines and evidence gaps. *Cardiology clinics*. 2020;38(1):55–63.
11. Katbeh A, Ondrus T, Barbato E, Galderisi M, Trimarco B, Van Camp G, et al. Imaging of myocardial fibrosis and its functional correlates in aortic stenosis: a review and clinical potential. *Cardiology*. 2018;141(3):141–9.
12. Calin A, Mateescu AD, Popescu AC, Bing R, Dweck MR, Popescu BA. Role of advanced left ventricular imaging in adults with aortic stenosis. *Heart (British Cardiac Society)*. 2020;106(13):962–9.
13. Herrmann S, Fries B, Salinger T, Liu D, Hu K, Gensler D, et al. Myocardial fibrosis predicts 10-year survival in patients undergoing aortic valve replacement. *Circulation Cardiovascular imaging*. 2018;11(8):e007131.
14. Aboyans V, Ricco JB, Bartelink MEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T, et al. 2017 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral arterial diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the diagnosis and treatment of peripheral arterial diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *European heart journal*. 2018;39(9):763–816.
15. Gallo G, Presta V, Volpe M, Rubattu S. Molecular and clinical implications of natriuretic peptides in aortic valve stenosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2019;129:266–71.
16. Villar AV, García R, Merino D, Llano M, Cobo M, Montalvo C, et al. Myocardial and circulating levels of microRNA-21 reflect left ventricular fibrosis in aortic stenosis patients. *International journal of cardiology*. 2013;167(6):2875–81.
17. Wojciechowska A, Braniewska A, Kozar-Kamińska K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Adv Clin Exp Med*. 2017;26(5):865–74.
18. Fabiani I, Scatena C, Mazzanti CM, Conte L, Pugliese NR, Franceschi S, et al. Micro-RNA-21

(biomarker) and global longitudinal strain (functional marker) in detection of myocardial fibrotic burden in severe aortic valve stenosis: a pilot study. *J Transl Med*. 2016;14(1):248.

19. Fabiani I, Pugliese NR, Calogero E, Conte L, Mazzanti MC, Scatena C, et al. MicroRNAs distribution in different phenotypes of Aortic Stenosis. *Scientific reports*. 2018;8(1):9953.

20. Bakaeen FG, Rosengart TK, Carabello BA. Aortic stenosis. *Annals of internal medicine*. 2017;166(1):l1c1-1c16.

21. Koh LY, Hwang NC. Frailty in cardiac surgery. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*. 2019;33(2):521–31.

22. Afilalo J, Alexander KP, Mack MJ, Maurer MS, Green P, Allen LA, et al. Frailty assessment in the cardiovascular care of older adults. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(8):747–62.

23. Clark MA, Duhay FG, Thompson AK, Keyes MJ, Svensson LG, Bonow RO, et al. Clinical and economic outcomes after surgical aortic valve replacement in Medicare patients. *Risk Manag Healthc Policy*. 2012;5:117–26.

24. Bokeria LA (editor). *Cardiovascular surgery*. 2019. М.: Bakoulev NMRCCVS; 2020. 294 p. (In Russ.) [Бокерия Л.А. Сердечно-сосудистая хирургия. 2019. М.: НМИЦССХ им. А. Н. Бакулева Минздрава России. 2020. 294 с.]

25. Skopin II, Otarov AM, Kakhktsyan PV, Asatryan TV, Kurbanov ShM, Paronyan KhV. Aortic valve replacement in elderly and senile patients: analysis of preoperative risk factors. *Complex problems of cardiovascular diseases*. 2018;7(4S):24–35. (In Russ.) [Скопин И.И., Отаров А.М., Кахкцян П.В., Асатрян Т.В., Курбанов Ш.М., Паронян Х.В. Протезирование аортального клапана у больных пожилого и старческого возраста: анализ предоперационных факторов риска. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2018;7(4S):24–35.]

26. Arora S, Misenheimer JA, Ramaraj R. Transcatheter aortic valve replacement: comprehensive review and present status. *Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital*. 2017;44(1):29–38.

27. Jones BM, Krishnaswamy A, Tuzcu EM, Mick S, Jaber WA, Svensson LG, et al. Matching patients with the ever-expanding range of TAVI devices. *Nature reviews Cardiology*. 2017;14(10):615–26.

28. Osnabrugge RL, Mylotte D, Head SJ, Van Mieghem NM, Nkomo VT, LeReun CM, et al. Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(11):1002–12.

29. Dasi LP, Hatoum H, Kheradvar A, Zareian R, Alavi SH, Sun W, et al. On the mechanics of transcatheter aortic valve replacement. *Annals of biomedical engineering*. 2017;45(2):310–31.

30. Abramowitz Y, Jilaihawi H, Chakravarty T, Mack MJ, Makkar RR. Porcelain aorta: a comprehensive review. *Circulation*. 2015;131(9):827–36.

31. Barbanti M, Tamburino C, D'Errigo P, Biancari F, Ranucci M, Rosato S, et al. Five-year outcomes of transfemoral transcatheter aortic valve replacement or surgical aortic valve replacement in a real world population. *Circ Cardiovasc Interv*. 2019;12(7):e007825.

32. Thyregod HG, Steinbrüchel DA, Ihlemann N, Nissen H, Kjeldsen BJ, Petursson P, et al. Transcatheter versus surgical aortic valve replacement in patients with severe aortic valve stenosis: 1-year results from the all-comers NOTION randomized clinical trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;65(20):2184–94.

33. Leon MB, Smith CR, Mack MJ, Makkar RR, Svensson LG, Kodali SK, et al. Transcatheter or surgical aortic-valve replacement in intermediate-risk patients. *The New England journal of medicine*. 2016;374(17):1609–20.

34. Mack MJ, Leon MB, Thourani VH, Makkar R, Kodali SK, Russo M, et al. Transcatheter aortic-valve replacement with a balloon-expandable valve in low-risk patients. *The New England journal of medicine*. 2019;380(18):1695–705.

35. Cao C, Liou KP, Pathan FK, Virk S, McMonnies R, Wolfenden H, et al. Transcatheter aortic valve implantation versus surgical aortic valve replacement: meta-analysis of clinical outcomes and cost-effectiveness. *Curr Pharm Des*. 2016;22(13):1965–77.

36. Magovern GJ, Cromie HW. Sutureless prosthetic heart valves. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1963;46:726–36.

37. Pfeiffer S, Fischlein T, Santarpino G. Sutureless Sorin Perceval aortic valve implantation. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery*. 2017;29(1):1–7.

38. Gotzmann M, Wilbring M, Charitos E, Treede H, Silaschi M. Hemodynamic comparison of sutureless and rapid-deployment valves with conventional bioprostheses. *The Thoracic and cardiovascular surgeon*. 2020;68(7):584–94.

39. Vola M, Fuzellier JF, Anselmi A, Campisi S, Haber B, Isaaz K, et al. Sutureless 3F Enable valve replacement for pure aortic regurgitation. *J Card Surg*. 2015;30(11):796–800.

40. Ng ACT, Prihadi EA, Antoni ML, Bertini M, Ewe SH, Ajmone Marsan N, et al. Left ventricular global longitudinal strain is predictive of all-cause mortality independent of aortic stenosis severity and ejection fraction. *European heart journal cardiovascular Imaging*. 2018;19(8):859–67.

Информация об авторах:

Успенский Владимир Евгеньевич, д.м.н., заведующий НИЛ заболеваний аорты и аортального клапана Института сердца и сосудов ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Салаватов Булат Курбанович, очный аспирант кафедры сердечно-сосудистой хирургии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Пищугин Александр Сергеевич, очный аспирант кафедры сердечно-сосудистой хирургии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Толпыгин Дмитрий Сергеевич, к.м.н., врач сердечно-сосудистый хирург отделения сердечно-сосудистой хирургии № 3 ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Малашичева Анна Борисовна, д.б.н., заведующий НИЛ кардиологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Зверев Дмитрий Анатольевич, к.м.н., заведующий отделением рентгенхирургических методов диагностики и лечения ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Минздрава России (Калининград);

Моисеева Ольга Михайловна, д.м.н., директор Института сердца и сосудов ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гордеев Михаил Леонидович, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник НИО кардиоторакальной хирургии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Zverev Dmitry A., MD, Candidate of Medical Sciences, Head of Department of X-ray Surgical Methods of Diagnosis and Treatment, Federal Center for Cardiovascular Surgery, Ministry of Health of Russia (Kaliningrad);

Moiseeva Olga M., MD, PhD, Director of the Institute of Heart and Vascular Surgery, Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of Russia;

Gordeev Mikhail L., MD, PhD, Professor, Chief Scientific Associate, Research Institute of Cardiothoracic Surgery, Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of Russia.

Author information:

Uspenskiy Vladimir E., MD, PhD, Head of the Research Laboratory for Aorta and Aortic Valve Diseases, Institute of Heart and Vascular Diseases, Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of Russia;

Salavatov Bulat K., full-time postgraduate student of the Department of Cardiovascular Surgery, Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of Russia;

Pishchugin Aleksandr S., full-time postgraduate student of the Department of Cardiovascular Surgery at the Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of Russia;

Tolpygin Dmitry S., MD, Candidate of Medical Sciences, Cardiovascular Surgeon, Department of Cardiovascular Surgery №3, Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of Russia;

Malashicheva Anna B., MD, PhD, Head of Research Laboratory of Cardiology and Genetics, Almazov National Medical Research Center, Ministry of Healthcare of Russia;

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 576:001.891.53

МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЕДИНИЧНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ РАЗЛИЧНОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Вельмискина А. А.¹, Калинина О. В.¹, Петрова Т. А.¹, Никитин Ю. В.²,
Головкин А. С.¹

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

² Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Вельмискина Анастасия
Александровна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: velmiskina96@mail.ru

Статья поступила в редакцию
04.04.2022 и принята к печати
19.04.2022.

РЕЗЮМЕ

Внеклеточные везикулы — это гетерогенная группа частиц, окруженных фосфолипидным бислоем и имеющих диаметр от 30 нм до 5 мкм. В последние годы активно изучается участие внеклеточных везикул в патогенезе многих заболеваний, а также возможности их применения в диагностике и терапии. Известно, что везикулы могут переносить нуклеиновые кислоты, в частности микро-РНК, мРНК и т.д., чем зачастую обусловлено их участие в регуляции многих патологических и физиологических процессов в организме, а также в межклеточной кооперации. Репертуар переносимых везикулами микро-РНК может значительно меняться в зависимости от их клеточного происхождения и функционального состояния клеток. Для изучения роли переносимых внеклеточными везикулами микро-РНК необходимы разработка и валидация новых подходов по целевому получению этих объектов с последующим изучением переносимого ими груза. Целью данного исследования являлось определение возможности использования метода высокочувствительного флуоресцентно-активированного сортирования для получения единичных внеклеточных везикул с заданным фенотипом из образцов плазмы крови. Из образцов плазмы крови здоровых доноров методом высокочувствительного флуоресцентно-активированного сортирования получали стандартное количество везикул тромбоцитарного и эритроцитарного происхождения с фенотипом CD41+CD235a- и CD41-CD235a+, соответственно, с ранжированием от 1 до 15 625 шт. в пробе. Методом количественной ПЦР оценивали уровень miR-451a, miR-199a-3p, miR-21-5p во всех

образцах отсортированных везикул. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для определения уровня микро-РНК во внеклеточных везикулах, независимо от их клеточного происхождения, количество частиц в образце должно быть более 3125. При этом, учитывая высокую вариабельность количества конкретных микро-РНК в зависимости от клеточного происхождения везикул, целесообразно уточнять целевой порог внеклеточных везикул при проведении каждого отдельного эксперимента.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, высокочувствительный флуоресцентно-активированный сортинг, микро-РНК, количественная ПЦР.

Для цитирования: Вельмискина А.А., Калинина О.В., Петрова Т.А., Никитин Ю.В., Головкин А.С. Методология исследования единичных внеклеточных везикул различного клеточного происхождения. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(3):101-110. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-101-110

METHODOLOGY TO STUDY SINGLE EXTRACELLULAR VESICLES OF VARIOUS CELLULAR ORIGIN

Velmiskina A. A.¹, Kalinina O. V.¹, Petrova T. A.¹, Nikitin Yu. V.², Golovkin A. S.¹

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Military Medical Academy named after S. M. Kirov, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Velmiskina Anastasia A.,
Almazov National Medical Research
Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: velmiskina96@mail.ru

Received 04 April 2022; accepted
19 April 2022.

ABSTRACT

Extracellular vesicles are a heterogeneous group of particles surrounded by a phospholipid bilayer and having a diameter from 30 nm to 5 microns. In recent years, the involvement of extracellular vesicles in the pathogenesis of many diseases, as well as the possibility of their use in diagnosis and therapy, has been actively studied. It is known that vesicles can carry nucleic acids, in particular micro-RNA, mRNA, etc., what often leads to their participation in the regulation of many pathological and physiological processes in the body, as well as in intercellular cooperation. The repertoire of micro-RNAs carried by vesicles can vary significantly depending on their cellular origin and the functional state of the cells. To study the role of micro-RNAs carried by extracellular vesicles, it is necessary to develop and validate new approaches for the targeted production of these objects, followed by the study of the cargo

carried by them. The purpose of this study was to determine the possibilities of using the method of highly sensitive fluorescence-activated sorting to obtain single extracellular vesicles with a given phenotype from blood plasma samples. A standard number of platelet and erythrocyte vesicles with the phenotype CD41+CD235a- and CD41-CD235a+, respectively, with a ranking from 1 to 15,625 pieces per sample were obtained from blood plasma samples of healthy donors by highly sensitive fluorescence-activated sorting. The level of miR-451a, miR-199a-3p, miR-21-5p in all samples of sorted vesicles was assessed by quantitative PCR. The obtained results indicate that to determine the level of micro-RNA in extracellular vesicles, regardless of their cellular origin, the number of particles in the sample should be more than 3125. At the same time, given the high variability of the number of specific micro-RNAs depending on the cellular origin of the vesicles, it is advisable to specify the target threshold of extracellular vesicles during each individual experiment.

Key words: extracellular vesicles, highly sensitive fluorescence-activated sorting, micro-RNA, quantitative PCR.

For citation: Velmiskina AA, Kalinina OV, Petrova TA, Nikitin YuV, Golovkin AS. Methodology to study single extracellular vesicles of various cellular origin. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(3):101-110. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-101-110

Список сокращений: ВВ — внеклеточные везикулы, ПЭГ — полиэтиленгликоль, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) — раствор Дальбекко.

ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы — это гетерогенная группа частиц, окруженных фосфолипидным бислоем и имеющих диаметр от 30 нм до 5 мкм [1]. Данные объекты, обнаруженные во всех биологических жидкостях организма, различаются между собой по размерам, происхождению и молекулярному содержанию [2]. Традиционно выделяют три основных типа внеклеточных везикул: экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца [3, 4]. Экзосомы — это частицы диаметром 30–100 нм, образованные инвагинацией эндосомальной мембраны внутрь и слиянием мультивезикулярного тельца с плазматической мембраной. Микровезикулы имеют размер 50–1000 нм и образуются путем отпочковывания непосредственно от плазматической мембраны здоровых клеток. Апоптотические тельца представляют собой фрагменты погибших клеток, образующиеся в результате их разборки на заключительной стадии апоптоза и имеющие диаметр 1–5 мкм. Помимо указанных терминов для обозначения типов внеклеточных ве-

зикул в литературе используются такие понятия, как микрочастицы, эктосомы, онкосомы и др. Внеклеточные везикулы несут различные биомолекулы, включая кодирующие и некодирующие РНК, ДНК, белки, липиды, метаболиты [3, 5–7].

В последнее время интерес к изучению внеклеточных везикул повышается в связи с расширением знаний об их функциях и участии в физиологических и патологических процессах [8]. Установлено, что внеклеточным везикулам принадлежит ведущая роль в межклеточной коммуникации [9]. Сигнальную функцию они осуществляют двумя путями: первый связан с передачей информации клеткам-реципиентам путем прямого контакта через поверхностные лиганды, второй — с переносом биологически активных молекул в клетки-мишени [3]. Примерами процессов, в которых задействованы эти механизмы, являются эмбриональное развитие, дифференцировка клеток, поддержание гомеостаза, репарация, иммунный ответ, старение, канцерогенез, развитие сердечно-сосудистых нарушений и т. д. [10]. Таким образом, изучение внеклеточных везикул позволяет получить новые знания о звеньях патогенеза различных заболеваний. Кроме того, все больше исследований раскрывают диагностический и терапевтический потенциал внеклеточных везикул [6].

Особое внимание уделяется роли внеклеточных везикул в патогенезе, диагностике и лечении он-

кологических заболеваний. Установлено, что везикулы поддерживают микроокружение опухоли и способствуют ее прогрессированию посредством участия в ангиогенезе, повышении сосудистой проницаемости, формировании предметастатических ниш, подавлении иммунного ответа, развитии лекарственной устойчивости, эпителиально-мезенхимальном переходе и др. [11]. Анализ маркеров, которые несут внеклеточные везикулы, может быть использован для ранней диагностики и определения прогноза онкологических заболеваний. Например, возможна идентификация характерных для неоплазий различной локализации мутаций в ДНК, содержащихся в везикулах, полученных из материала жидкостной биопсии [11]. Так, в ДНК, содержащихся в экзосомах, циркулирующих в периферической крови пациентов с раком поджелудочной железы, определяются мутации в генах KRAS и TP53, являющихся протоонкогеном и онкосупрессором соответственно [12]. Также показана возможность терапевтического применения внеклеточных везикул для доставки химиотерапевтических препаратов и опухолесупрессорных микро-РНК [11].

Изучается роль внеклеточных везикул при нейродегенеративных заболеваниях. Предполагается, что внеклеточные везикулы являются носителями и распространителями ассоциированных с заболеваниями неправильно свернутых белков [13]. На трансгенных мышах, моделирующих болезнь Альцгеймера, было показано, что распространение гиперфосфорилированного тау-белка, образующего нейрофибриллярные клубки, которые разрушают внутриклеточную архитектуру лимбических и корковых нейронов, происходит за счет высвобождения экзосом, а подавление высвобождения внеклеточных везикул препятствует увеличению уровня этого белка как в клеточной культуре, так и на мышинной модели [14]. Эти знания не только раскрывают дополнительные звенья патогенеза нейродегенеративных заболеваний, но и дают новые возможности для диагностики [13]. Кроме того, активно ведутся разработки терапевтических подходов с применением внеклеточных везикул за счет их способности преодолевать гематоэнцефалический барьер [6, 15].

В ряде исследований показана роль внеклеточных везикул в развитии метаболических и сердечно-сосудистых заболеваний [16–19]. Обнаружено, что они переносят метаболиты и облегчают межклеточную коммуникацию путем обмена микро-РНК между β -клетками поджелудочной железы, жировой тканью, скелетными мышцами и печенью [16]. Продемонстрировано участие эк-

зосом в возникновении и прогрессировании таких заболеваний, как атеросклероз, сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, кардиомиопатии, клапанная болезнь сердца, легочная гипертензия [17, 18]. Например, установлено, что внеклеточные везикулы, образованные из атеросклеротической бляшки, переносят молекулы адгезии (ICAM-1) к эндотелиальным клеткам, что ведет к прогрессированию атеросклеротического поражения артерий за счет рекрутирования моноцитов [19]. Существуют также потенциальные терапевтические подходы, основанные на применении везикул при заболеваниях сердца. Появляется все больше данных, свидетельствующих о защитных и репаративных свойствах экзосом, полученных из стволовых клеток, что указывает на возможность их использования для лечения различных сердечно-сосудистых заболеваний [20].

Возросшая потребность в исследовании внеклеточных везикул привела к разработке различных методов их выделения. Наиболее широко используемым подходом является дифференциальное центрифугирование, основанное на разной скорости оседания частиц, отличающихся по размеру, в процессе которого возрастает на каждом последующем этапе скорость и длительность центрифугирования. Для разделения различных внеклеточных везикул по размеру и плотности применяется метод ультрацентрифугирования в градиенте плотности, при котором на первом этапе проводят центрифугирование при скорости 10 000 g, на втором этапе — в градиенте плотности какого-либо вещества, например йодиксанола, при скорости более 100 000 g. Методика выделения с использованием ПЭГ заключается в смешивании образца с ПЭГ-содержащим раствором и последующем центрифугировании при 10 000 g. Другим подходом является эксклюзионная хроматография, направленная на разделение частиц в зависимости от их гидродинамического диаметра. Образец пропускают через колонку, содержащую пористую неподвижную фазу, в которой более мелкие частицы (например, липополисахариды высокой плотности) замедляются, а более крупные частицы (например, внеклеточные везикулы) свободно проходят. Существуют другие методы получения внеклеточных везикул (фильтрация, проточное фракционирование в поперечном поле, ионообменные методы, электрофорез, микрофлюидные технологии, аффинная хроматография и иммуноаффинный захват на магнитных шариках), однако большинство из них основаны на физических и физико-химических свойствах частиц и не учитывают их фенотип и клеточное происхождение [21, 22]. В настоящее время золотым стандартом при

выделении ВВ является дифференциальное центрифугирование и ультрацентрифугирование.

Для наиболее информативного анализа состава внеклеточных везикул необходимо их разделение на субпопуляции, в том числе в зависимости от их клеточного происхождения [22]. Самым перспективным методом для этих целей является высокочувствительный флуоресцентно-активированный сортинг, основанный на проточной цитометрии с использованием флуоресцентно-меченых антител против поверхностных маркеров везикул [23]. Данный подход применялся в нескольких исследованиях для выделения субпопуляций внеклеточных везикул из кондиционированной клеточной среды, спинномозговой жидкости, слез и плазмы крови [24–27]. В одном из этих исследований с помощью данного подхода удалось получить везикулы, несущие на своей поверхности маркер CD9+ и изоформы рецептора эпидермального фактора роста [24]. Основным преимуществом высокочувствительного флуоресцентно-активированного сортирования является возможность выделения внеклеточных везикул с заданным фенотипом, в том числе несущих более одного поверхностного маркера, и клеточным происхождением [26]. Кроме того, данный метод позволяет собрать заданное количество частиц, что делает возможным исследование даже единичных внеклеточных везикул.

Большой интерес представляет изучение спектра нуклеиновых кислот, содержащихся во внеклеточных везикулах. Это связано со значительным разнообразием профилей нуклеиновых кислот во внеклеточных везикулах как в зависимости от их клеточного происхождения, так и от активности и состояния определенных клеток [28, 29]. Особое значение имеет исследование репертуара микро-РНК, одного из основных классов малых некодирующих РНК, широко представленного в везикулах. Данные молекулы считаются ключевыми функциональными элементами межклеточной коммуникации, опосредованной внеклеточными везикулами. Они могут напрямую взаимодействовать с матричной РНК (мРНК), регулируя уровень экспрессии генов-мишеней, а также могут выступать в качестве лигандов Toll-like-рецепторов, активируя иммунные клетки, что показано на перитонеальных макрофагах мышей и мононуклеарных клетках периферической крови человека [30, 31]. Установлено их участие не только в физиологических процессах, но и в патогенезе различных заболеваний. Так, повышенный уровень циркулирующей экзосомальной микро-РНК miR-21 ассоциирован с глиобластомой, раком поджелудочной железы, пищевода, толстой кишки, печени, молоч-

ной железы и яичников [6]. Исследование профилей микро-РНК в везикулах при различных состояниях открывает потенциал для их применения в качестве диагностических биомаркеров и терапевтических агентов [32]. Специфичность репертуаров микро-РНК в зависимости от источника везикул и от наличия того или иного заболевания подтверждается во множестве исследований, на основе полученных результатов создаются базы данных профилей микро-РНК, содержащихся во внеклеточных везикулах. Например, база данных EVmiRNA создана на основе 462 образцов секвенирования микро-РНК везикул, полученных из 17 различных источников и при разных патологиях. Она предоставляет пользователю возможность ознакомиться с профилями экспрессии микро-РНК в образцах везикул различного происхождения (кровь, кишечник и т.д.) и различного типа внеклеточных везикул (экзосомы, микровезикулы), а также содержит информацию о каждой микро-РНК, включая уровни экспрессии, функции, регуляторные пути, и связанные публикации [33, 34].

Таким образом, значимость и перспективность дальнейшего изучения внеклеточных везикул для разработки алгоритмов диагностики и терапевтических подходов не вызывает сомнений. В связи с этим в последнее время особое внимание уделяется разработкам и апробациям методик исследований единичных внеклеточных везикул различного клеточного происхождения и фенотипа. Целью данного исследования было определение возможности использования метода высокочувствительного флуоресцентно-активированного сортирования для получения единичных внеклеточных везикул с заданным фенотипом из образцов плазмы крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы плазмы крови

Образцы периферической крови собирали натощак из локтевых вен условно здоровых добровольцев (11 мужчин и 11 женщин в возрасте 18–55 лет) в вакуумные пробирки, содержащие K₃ЭДТА (Vacutest KIMA, Италия). Все исследования были проведены в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и одобрены Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Получение фракции плазмы, содержащей внеклеточные везикулы

Фракцию плазмы крови, содержащую внеклеточные везикулы, получали из цельной крови методом трехкратного последовательного центрифуги-

рования на первых двух этапах при 1500 g в течение 10 мин, на третьем, заключительном, этапе при 3000 g в течение 10 мин. Полученный супернатант пропускали через фильтр (Millex-AA, Merck Millipore, Ирландия) с размером пор 0,8 мкм для удаления возможных клеточных остатков, после чего образцы пулировали и аликвотировали для проведения дальнейшего анализа внеклеточных везикул.

Высококчувствительный флуоресцентно-активированный сортинг

Иммунофлуоресцентное окрашивание внеклеточных везикул проводили с использованием анти-тел анти-CD235a (гликофорин A RPE, R7078, Dako (Agilent), США) и анти-CD41-FITC (тромбоцитарный гликопротеин IIb, F7088, Dako (Agilent), США) в качестве маркеров, специфичных для эритроцитов и тромбоцитов соответственно. 100 мкл полученной фракции плазмы окрашивали с 1 мкл соответствующего антитела с концентрацией 1 нг/мкл в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Непосредственно перед проведением сортировки внеклеточных везикул окрашенную плазму разбавляли в 10 раз раствором Дальбекко (DPBS) без Ca и Mg («БиолоТ», Россия).

Высококчувствительный флуоресцентно-активированный сортинг везикул осуществляли на клеточном сортире MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter, США), оснащенном лазерами 405 нм (55 мВт), 488 нм (200 мВт) и 645 нм (100 мВт), а также стандартным набором фильтров, оптимизированных для каждого лазера. Настройка и дальнейшая сортировка выполнялись с использованием насадки Jet-in-air размером 70 мкм, давления 59,7–60 фунтов на кв. дюйм для проточной жидкости IsoFlow (Beckman Coulter, США) и 60,9–61,1 фунтов на кв. дюйм для подачи образца. Гейты для сортировки строили с учетом контрольных экспериментов, проведенных ранее [35].

Для настройки порогового значения FSC использовали наборы эталонных полистироловых шариков, меченных FITC, Megamix-Plus FSC (100, 300, 500 и 900 нм) (Ref.7802, BioCytex, Франция) и Megamix-Plus SSC (160, 200, 240 и 500 нм) (Ref.7803, BioCytex, Франция). Минимальный детектируемый размер шариков составил 200 нм. Сортировку каждой субпопуляции внеклеточных везикул производили, линейно увеличивая их концентрацию от минимума (1 событие) до максимума (15 625 событий). Для каждой клеточной популяции внеклеточных везикул было отсортировано семь различных количеств событий (1, 5, 25, 125, 625, 3125 и 15 625 событий) в четырехкратных технических повторях. После сортиров-

ки объемы полученных образцов доводили DPBS до 100 мкл и замораживали при -80 °C для выделения РНК.

Идентификация микро-РНК методом количественной RT-PCR в реальном времени

Тотальную РНК выделяли с использованием реагента Trizol LS (ThermoFisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Дополнительно в качестве универсального внутреннего контроля на первом этапе выделения РНК в лизирующий буфер добавляли РНК-олигонуклеотид synth-cel-miR-39-3p (5'-ucaccggguguaaaucaagcuug-3', 5 фмоль/мл, «Синтол», Россия). Осадок тотальной РНК растворяли в 20 мкл деионизированной воды, обработанной диэтилпирикарбонатом (D5758, Sigma Aldrich, США).

Реакцию обратной транскрипции выполняли с использованием набора TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies; каталожный номер 4366596) в термоциклере Veriti (Applied Biosystems, США) при 42 °C в течение 30 мин. В качестве праймеров в реакционную смесь добавляли микро-РНК-специфические петлевые праймеры из набора TaqMan MicroRNA Assay (Life Technologies, США) к следующим целевым микро-РНК: miR-39-3p (ID зонда: 000200), miR-451a (ID зонда: 001141), miR-199a-3p (ID зонда: 002304), miR-21-5p (ID зонда: 000397).

Количественную ПЦР проводили с использованием реагента TaqMan Universal Master Mix II (Life Technologies, США; каталожный номер 4440040), прямого и обратного праймера и гидролизного зонда из набора TaqMan MicroRNA Assay (Life Technologies, США), согласно инструкции производителя, на приборе 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, США).

Данные по Cq (quantification cycle), полученные для каждого образца, были нормализованы по данным Cq РНК-олигонуклеотида synth-miR-39-3p. Каждое нормализованное значение Cq рассчитывали по формуле:

$$Cq \text{ miR_norm} = Cq \text{ miR} - (Cq \text{ miR-39} - Cq \text{ miR-39_median}),$$

где Cq miR — это Cq целевой микро-РНК в этом образце, Cq miR-39 — Cq miR-39-3p в этом образце, а Cq miR-39_median — медианное значение Cq miR-39-3p по всем образцам. Относительные уровни целевой микро-РНК рассчитывали по формуле: $2^{-(Cq \text{ no_template} - Cq \text{ sample})}$, где Cq no_template — это Cq в реакции без добавления образца, а Cq sample — это Cq в реакции с соответствующим образцом.

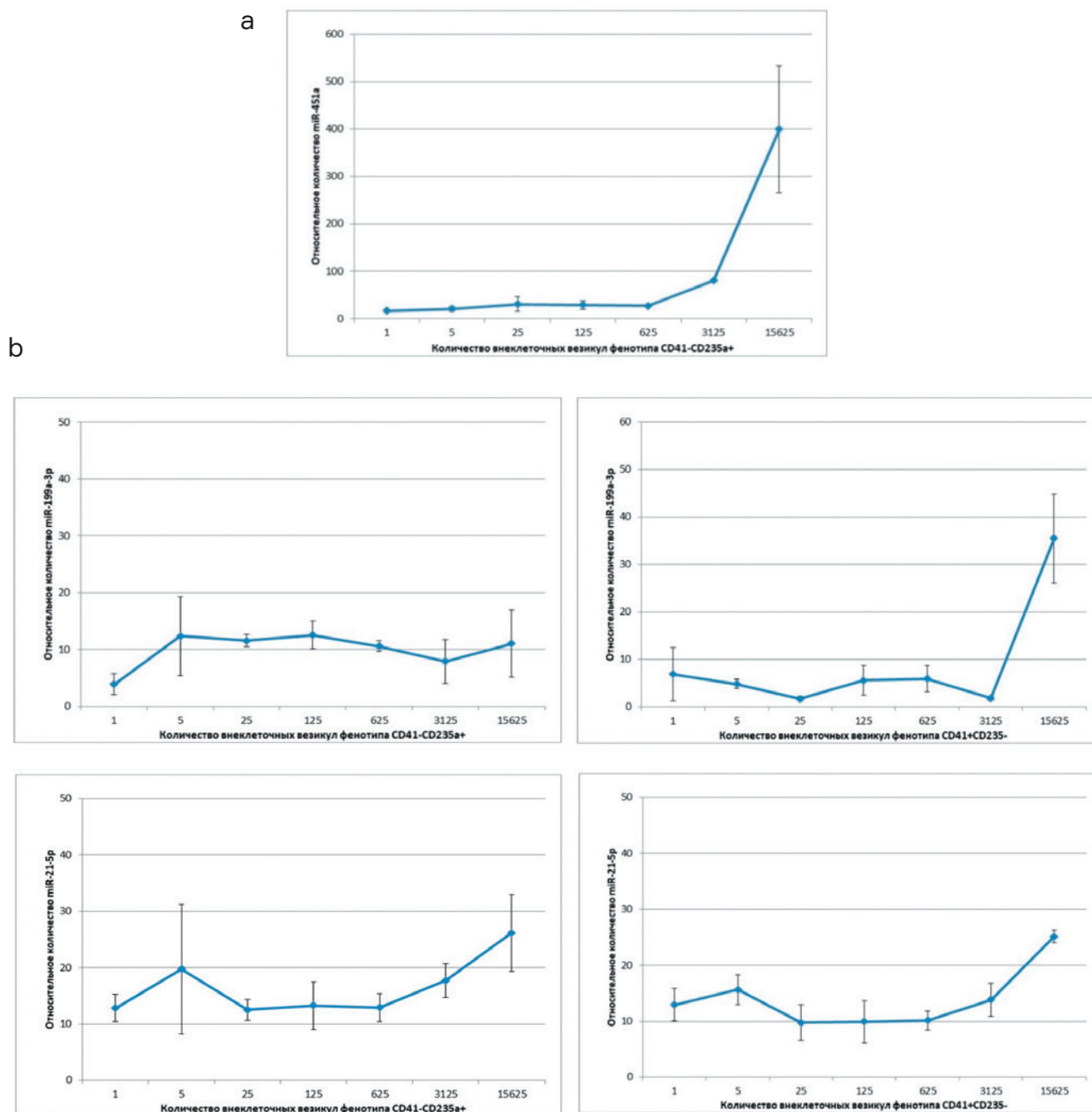


Рис. 1. Относительное количество микро-РНК miR-451a, miR-199a-3p, miR-21 в о внеклеточных везикулах различного фенотипа:

- а) CD41-CD235+ эритроцитарного;
б) CD41+CD235- тромбоцитарного происхождения

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США). Результаты представлены в виде среднего, рассчитанного на основании не менее трех технических повторов, и стандартной ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нашей группой было проведено изучение спектра нуклеиновых кислот отдельных субпопуляций внеклеточных везикул плазмы крови, полученных методом высокочувствительного флуоресцент-

но-активированного сортирования на основании 40 000 событий, каждое из которых соответствовало одному из фенотипов CD41+CD235a- или CD41-CD235a+ [35]. В результате была выявлена гетерогенность состава нуклеиновых кислот во ВВ, имеющих разное клеточное происхождение. Субпопуляция ВВ CD41+CD235- тромбоцитарного происхождения по сравнению с таковой CD41-CD235a+ эритроцитарного происхождения содержала значительно большее количество miR-21-5p (в 4 раза, $p = 0,004$), miR-223-3p (в 38 раз, $p = 0,004$) и miR-199a-3p (в 187 раз, $p = 0,004$), митохондриальной ДНК, но меньшее количество miR-451a [35].

Такое значительное количество событий, используемое для получения фенотип-специфических субпопуляций ВВ, не всегда может быть достигнуто в каждом изучаемом образце, что обуславливает ограничения при изучении малых количеств некодирующих РНК в определенных субпопуляциях ВВ, имеющих низкую презентацию в циркуляции.

В данном исследовании серия проб с линейно возрастающим количеством событий, используемых для выделения ВВ, дала возможность определить количество событий при сортировке ВВ плазмы крови, позволяющее детектировать наличие микро-РНК в образце. Исходя из ранее полученных результатов по количеству разных микро-РНК в субпопуляциях ВВ CD41+CD235- и CD41-CD235a+ тромбоцитарного и эритроцитарного происхождения, соответственно [35], для анализа динамики изменения относительного количества микро-РНК в отсортированных ВВ были выбраны три микро-РНК: miR-451a, miR-199a-3p, miR-21-5p. Как видно из рисунка 1, относительное количество miR-451a в обеих субпопуляциях ВВ как CD41-CD235a+ эритроцитарного, так и CD41+CD235a- тромбоцитарного происхождения в образцах, содержащих от 1 до 625 частиц (событий), изменяется незначительно и нелинейно, однако заметно возрастает в образце, содержащем 3125 частиц, и имеет значительный подъем в образце, содержащем 15 625 событий. Динамика изменения относительного количества miR-199a-3p в субпопуляции CD41+CD235a- тромбоцитарного происхождения в образцах, содержащих от 1 до 625 частиц, аналогична динамике miR-451a; тогда как значительное увеличение наблюдается только в образце, содержащем 15 626 частиц. При этом в субпопуляции CD41-CD235a+ эритроцитарного происхождения не наблюдалось динамики изменений относительного уровня miR-21 в зависимости от количества частиц в исследуемом образце. В свою очередь, динамика изменений относительного количества miR-21 в обеих субпопуляциях ВВ была сопоставима во

всех образцах. Значительное увеличение, как и в случае с miR-451a, регистрировалось только в образце, содержащем 15 625 частиц.

Расхождение по уровню микро-РНК в зависимости от количества ВВ и клеточного происхождения, вероятно, связано с тем, что частицы, имеющие одинаковое клеточное происхождение и, соответственно, определенный фенотип, могут нести разные биомаркеры, количество которых может варьировать в зависимости от процессов, протекающих как внутри клетки, так и на организменном уровне. Индивидуальный профиль везикул различается не только в зависимости от клеточного происхождения, но и от состояния клеток [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высококчувствительный флуоресцентно-активированный сортирование является перспективным методом выделения единичных внеклеточных везикул с заданным фенотипом. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для определения уровня микро-РНК во внеклеточных везикулах, независимо от их клеточного происхождения, количество частиц в образце должно быть более 3125. При этом, учитывая высокую вариабельность количества конкретных микро-РНК в зависимости от клеточного происхождения везикул, целесообразно уточнять целевой порог внеклеточных везикул при проведении каждого отдельного эксперимента.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Harrison P, Gardiner C, Sargent IL. Extracellular vesicles.
- Willms E, Johansson HJ, Mäger I, et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep*; 6. Epub ahead of print 2 March 2016. DOI: 10.1038/SREP22519.
- Teng F, Fussenegger M. Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Adv Sci* 2021; 8: 2003505.
- Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell vesicles*; 7. Epub ahead of print 1 January 2018. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.

5. Gurunathan S, Kang MH, Qasim M, et al. Biogenesis, Membrane Trafficking, Functions, and Next Generation Nanotherapeutics Medicine of Extracellular Vesicles. *Int J Nanomedicine* 2021; 16: 3357.
6. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*; 367. Epub ahead of print 7 February 2020. DOI: 10.1126/SCIENCE.AAU6977.
7. Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology (Basel)*; 9. Epub ahead of print 1 January 2020. DOI: 10.3390/BIOLOGY9010021.
8. Niel G Van, Angelo GD, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Publ Gr*. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1038/nrm.2017.125.
9. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavie G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol* 2019; 21: 9–17.
10. Simeone P, Bologna G, Lanuti P, et al. Extracellular Vesicles as Signaling Mediators and Disease Biomarkers across Biological Barriers. *Int J Mol Sci*; 21. Epub ahead of print 1 April 2020. DOI: 10.3390/IJMS21072514.
11. Abhang K, Makler A, Wen Y, et al. Small extracellular vesicles in cancer. *Bioact Mater* 2021; 6: 3705.
12. Yang S, Che SPY, Kurywachak P, et al. Detection of mutant KRAS and TP53 DNA in circulating exosomes from healthy individuals and patients with pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2017; 18: 158.
13. Hill AF. Extracellular Vesicles and Neurodegenerative Diseases. *J Neurosci* 2019; 39: 9269.
14. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, et al. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* 2015; 18: 1584.
15. Cooper JM, Wiklander PBO, Nordin JZ, et al. Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. *Mov Disord* 2014; 29: 1476.
16. Guay C, Regazzi R. Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk. *Diabetes Obes Metab* 2017; 19 Suppl 1: 137–146.
17. Zhang Y, Hu YW, Zheng L, et al. Characteristics and Roles of Exosomes in Cardiovascular Disease. <https://home.liebertpub.com/dna> 2017; 36: 202–211.
18. Jadli AS, Parasor A, Gomes KP, et al. Exosomes in Cardiovascular Diseases: Pathological Potential of Nano-Messenger. *Front Cardiovasc Med* 2021; 0: 1483.
19. Rautou PE, Leroyer AS, Ramkhelawon B, et al. Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circ Res* 2011; 108: 335–343.
20. Yuan Y, Du W, Liu J, et al. Stem Cell-Derived Exosome in Cardiovascular Diseases: Macro Roles of Micro Particles. *Front Pharmacol* 2018; 9: 547.
21. Johnsen KB, Gudbergsson JM, Andresen TL, et al. What is the blood concentration of extracellular vesicles? Implications for the use of extracellular vesicles as blood-borne biomarkers of cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 2019; 1871: 109–116.
22. Liangsupree T, Multia E, Riekkola ML. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *J Chromatogr A* 2021; 1636: 461773.
23. Kormelink TG, Arkesteijn GJA, Nauwelaers FA, et al. Prerequisites for the analysis and sorting of extracellular vesicle subpopulations by high-resolution flow cytometry. *Cytometry A* 2016; 89: 135–147.
24. Higginbotham JN, Zhang Q, Jeppesen DK, et al. Identification and characterization of EGF receptor in individual exosomes by fluorescence-activated vesicle sorting. *J Extracell Vesicles*; 5. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.3402/jev.v5.29254.
25. Cao Z, Li C, Higginbotham JN, et al. Use of Fluorescence-activated Vesicle Sorting for Isolation of Naked2-associated, Basolaterally Targeted Exocytic Vesicles for Proteomics Analysis. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 1651.
26. Atkin-Smith GK, Paone S, Zanker DJ, et al. Isolation of cell type-specific apoptotic bodies by fluorescence-activated cell sorting. *Sci Reports* 2017 71 2017; 7: 1–7.
27. Pieragostino D, Lanuti P, Cicalini I, et al. Proteomics characterization of extracellular vesicles sorted by flow cytometry reveals a disease-specific molecular cross-talk from cerebrospinal fluid and tears in multiple sclerosis. *J Proteomics*; 204. Epub ahead of print 30 July 2019. DOI: 10.1016/J.JPROT.2019.103403.
28. Tkach M, Kowal J, Théry C. Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 373. Epub ahead of print 5 January 2018. DOI: 10.1098/RSTB.2016.0479.
29. Ferguson SW, Nguyen J. Exosomes as therapeutics: The implications of molecular composition and exosomal heterogeneity. *J Control Release* 2016; 228: 179–190.
30. Zhang J, Li S, Li L, et al. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2015; 13: 17.
31. Fabbri M, Paone A, Calore F, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: E2110.
32. Veziroglu EM, Mias GI. Characterizing Extracellular Vesicles and Their Diverse RNA Contents. *Front Genet*; 11. Epub ahead of print 17 July 2020. DOI: 10.3389/FGENE.2020.00700.
33. Murillo OD, Thistlethwaite W, Rozowsky J, et al. ExRNA Atlas Analysis Reveals Distinct Extracellular

RNA Cargo Types and Their Carriers Present Across Human Biofluids. *Cell* 2019; 177: 463.

34. Liu T, Zhang Q, Zhang J, et al. EVmiRNA: a database of miRNA profiling in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res* 2019; 47: D89.

35. Kondratov K, Nikitin Y, Fedorov A, et al. Heterogeneity of the nucleic acid repertoire of plasma extracellular vesicles demonstrated using high-sensitivity fluorescence-activated sorting. *J Extracell Vesicles*; 9. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1080/20013078.2020.1743139.

Golovkin Aleksey S., Doctor of Medical Sciences, Head of the Genetic Cell Engineering Group of the Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre.

Информация об авторах:

Вельмискина Анастасия Александровна, лаборант-исследователь Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Калинина Ольга Викторовна, д.б.н., профессор кафедры лабораторной медицины и генетики Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Петрова Татьяна Александровна, к.б.н., старший научный сотрудник Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Никитин Юрий Владимирович, ассистент кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Минобороны России;

Головкин Алексей Сергеевич, д.м.н., руководитель группы генно-клеточной инженерии Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Velmiskina Anastasia A., Research Assistant, Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Kalinina Olga V., Doctor of Biological Sciences, Professor, Department of Laboratory Medicine and Genetics, Medical Education Institute, Almazov National Medical Research Centre Leading Researcher of the Research Laboratory of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Petrova Tatyana A., Ph.D., Senior Researcher, Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Nikitin Yury V., assistant of the Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Military Medical Academy named after S. M. Kirov;

ISSN 2782-3806

ISSN 2782-3814 (Online)

УДК 616.71-003.84:[616.12 +611.16]

ОСОБЕННОСТИ СБОРА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ КАЛЬЦИФИКАЦИИ СЕРДЦА И СОСУДОВ

Боярская Н. В., Шишкова А. А., Сапранков В. Л., Успенский В. Е., Малашичева А. Б.

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

Контактная информация:

Боярская Надежда Владимировна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: boyarskaya_nv@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 12.04.2022
и принята к печати 25.04.2022.

РЕЗЮМЕ

Кальцификация сердца и сосудов — распространенное патологическое состояние, приводящее к многочисленным осложнениям. Одна из ее самых частых форм — кальцификация аортального клапана. На сегодня не существует лекарственной терапии, способной остановить прогрессирование кальцификации, поэтому единственным радикальным методом лечения остается хирургическое вмешательство. Для поиска антикальцифицирующей терапии необходимы фундаментальные молекулярно-биологические исследования и, соответственно, релевантная модель *in vitro*. В статье мы представляем организацию деятельности трансляционной группы из врачей-терапевтов, хирургов и молекулярных биологов, работающей с клеточными моделями кальцификации. В качестве клеточных моделей приводится описание получения линий интерстициальных и эндотелиальных клеток аортального клапана, а также гладкомышечных и эндотелиальных клеток аорты. Описаны подготовительные клинические и хирургические этапы получения биоматериала, лабораторный этап работы с материалом.

Ключевые слова: аортальный клапан, кальцификация, клеточные модели.

Для цитирования: Боярская Н.В., Шишкова А.А., Сапранков В.Л., Успенский В.Е., Малашичева А.Б. Особенности сбора биологического материала при изучении патологической кальцификации сердца и сосудов. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(3):111-118. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-111-118

FEATURES OF COLLECTING BIOLOGICAL MATERIAL IN THE STUDY OF PATHOLOGICAL CALCIFICATION OF THE HEART AND BLOOD VESSELS

**Boyarskaya N. V., Shishkova A. A., Saprankov V. L., Uspensky V. E.,
Malashicheva A. B.**

Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized
Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Boyarskaya Nadezhda V.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: boyarskaya_nv@almazovcentre.ru

Received 12 April 2022; accepted 25 April
2022.

ABSTRACT

Calcification of the heart and blood vessels is a common pathological condition, leading to numerous complications. One of the most common forms of calcification is aortic valve calcification. To date, there is no drug therapy that can stop the progression of calcification, so the only radical method of treatment remains surgery. Fundamental molecular biological studies and, accordingly, a relevant in vitro model are necessary to search for an anticalcifying therapy. In the article, we present the organization of the work of a translational group, consisting of clinicians, surgeons, and molecular biologists, working with cellular models of calcification. As cell models, a description is given of obtaining cell lines of interstitial and endothelial cells of the aortic valve, as well as smooth muscle and endothelial cells of the aorta. The preparatory clinical and surgical stages of obtaining a biomaterial, and the laboratory stage of working with the material are described.

Key words: aortic valve, calcification, cell models.

For citation: Boyarskaya NV, Shishkova AA, Saprankov VL, Uspensky VE, Malashicheva AB. Features of collecting biological material in the study of pathological calcification of the heart and blood vessels. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(3):111-118. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-111-118

Список сокращений: АК — аортальный клапан, БАК — бicuspidальный аортальный клапан, ВА — восходящая аорта, ГАГ — гликозамингликаны, ОХС — общий холестерин, ТАК — трехстворчатый аортальный клапан, ТГ — триглицериды, ХС-ЛПВП — холестерин липопротеинов высокой плотности, ХС-ЛПНП — холестерин липопротеинов низкой плотности, НАЕС (human aortic endothelial cells) — эндотелиальные клетки аорты, SMC (smooth muscle cells) — гладкомышечные клетки аорты, VEC (valves endothelial cells) — эндотелиальные клетки клапана, VIC (valves interstitial cells) — интерстициальные клетки клапана.

Кальцификация сердца и сосудов — распространенное патологическое состояние, приводящее к многочисленным осложнениям. Одна из ее самых частых форм — кальцификация аортального клапана. На сегодня не существует лекарственной терапии, способной остановить прогрессирование кальцификации, поэтому единственным радикальным методом лечения остается хирургическое вмешательство. Для поиска антикальцифицирующей терапии необходимы фундаментальные молекулярно-биологические исследования и, соответственно, релевантная модель *in vitro*. В статье мы представляем организацию деятельности трансляционной группы из врачей-терапевтов, хирургов и молекулярных биологов, работающей с клеточными моделями кальцификации. В качестве клеточных моделей приводится описание получения линий интерстициальных и эндотелиальных клеток аортального клапана, а также гладкомышечных и эндотелиальных клеток аорты. Ниже приведено описание подготовительных клинических и хирургических этапов получения биоматериала, лабораторный этап работы с материалом.

Аортальный клапан является частью корня аорты. Створки аортального клапана называются в зависимости от их расположения: левая полулунная (коронарная) створка, правая полулунная (коронарная) створка и задняя (некоронарная) створка аортального клапана [1, 4]. Створки представляют собой тонкие (< 1 мм), гибкие, аваскулярные структуры, состоящие из трех слоев: желудочкового (*ventricularis*), аортального (*fibrosa*) и спонгиозного (*spongiosa*) [3]. С аортальной и желудочковой сторон створки покрыты монослоем эндотелиальных клеток. В некоторых источниках указывается 5 слоев соединительной ткани, расположенных между аортальной и желудочковой поверхностью, а именно: *lamina ventricularis*, *lamina radialis*, *lamina spongiosa*, *lamina fibrosa*, *lamina arterialis*, но все-таки общепринятым является выделение трех слоев в струк-

туре клапана [4]. Спонгиозный слой (*spongiosa*) содержит большое количество гликозамингликанов (ГАГ) и протеогликанов. Между всеми внеклеточными компонентами в трех слоях находятся интерстициальные клетки клапана.

Весь операционный материал получают в Национальном медицинском исследовательском центре им. В. А. Алмазова в ходе операции по протезированию аортального клапана. Забор операционного материала осуществляется после подписания пациентами информированного согласия.

Забор операционного материала осуществляется от больных с умеренным или тяжелым склеродегенеративным аортальным стенозом в возрасте от 50 до 70 лет. Такие возрастные ограничения связаны с тем, что операционный материал от пациентов старше 70 лет достаточно неудобен для клеточной работы. При госпитализации пациента в НМИЦ им. В. А. Алмазова для планового хирургического лечения (протезирования АК) в рамках предоперационной подготовки проводится сбор жалоб, оценка анамнеза и объективный осмотр пациента, эхокардиография по стандартному протоколу, стандартное лабораторное обследование. Материал от пациентов с инфекционным эндокардитом клапана, хронической ревматической болезнью сердца, системными заболеваниями соединительной ткани, онкологическими заболеваниями не включается в работу. Тяжесть аортального стеноза оценивается по стандартному протоколу трансторакального эхокардиографического исследования (максимальной скорости на аортальном клапане (*V max*), среднему градиенту давления на аортальном клапане (*dP mean*), площади аортального клапана (*AVA*) на аппарате Vivid 7 (GE, США), согласно Европейским и Американским рекомендациям по эхокардиографии. У ряда пациентов удается установить наличие бicuspidального аортального клапана (БАК) на дооперационном этапе. В зависимости от анатомических особенностей аортального клапана все пациенты разделяются на 2 подгруппы: первая подгруппа — пациенты с ТАК (трехстворчатым аортальным клапаном), вторая подгруппа — пациенты с БАК (бicuspidальным аортальным клапаном). При клинической характеристике пациентов важна сопутствующая кардиальная патология (ИБС, ГБ, поражение других клапанов сердца), семейный анамнез. В рамках предоперационного лабораторного обследования всем пациентам выполняется общий клинический и биохимический анализ крови, но особое внимание для последующего анализа уделяется содержанию общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП), холестерина липо-

протеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), уровню глюкозы, СРБ.

Анестезиологическое пособие при хирургических вмешательствах на восходящей аорте (ВА) и/или аортальном клапане (АК) во всех случаях представляет собой общую комбинированную анестезию с использованием севофлурана и фентанила.

В качестве хирургического доступа чаще всего используют полную срединную стернотомию.

После пережатия аорты и проведения кардиopleгии выполняется аортотомия, ревизия восходящего отдела аорты и АК, оценивается возможность выполнения клапаносберегающей реконструкции корня аорты.

При наличии изолированного гемодинамически значимого порока аортального клапана выполняется изолированное протезирование АК. Выполняется косопоперечная аортотомия, оценивается состояние аортального клапана (АК), аорты в области синусов Вальсальвы, СТС и, насколько возможно, в ее восходящем отделе. В случае принятия решения о замещении аортального клапана протезом створки АК иссекаются, при необходимости выполняется декальцинация ФК, АК и прилежащих структур. Створки аортального клапана непосредственно после иссечения разделяются на 2 части, первая из которых консервируется 10 % раствором формалина для последующего патогистологического исследования, вторая часть помещается в среду для последующего молекулярно-биологического исследования.

Молекулярно-биологическое исследование операционного материала. Подготовительный этап

Для получения операционного материала (рис. 1) к началу операции необходимо предоставить маркированную пробирку с «консервирующей средой».

В работе используются стерильные пробирки Falcon 50 мл (Corning, США), среда для сохранения ткани («консервирующая среда») готовится из стерильного PBS — фосфатно-солевого буфера (Biolot, Россия) с добавлением 1 % антибиотика пенициллина/стрептомицина (Invitrogene, США). Используется 30–40 мл среды на одну пробирку для одного забора материала. Пробирка передается в предоперационную операционным медсестрам до начала операции, по ее окончании медсестры приносят пробирку с фрагментом или фрагментами ткани в предоперационную. Далее материал забирается в стерильный бокс для выделения первичных культур — оптимально, либо помещается в холодильник на +4 °C до суток, не более (рис. 2).

Выделение первичных культур. VIC (valves interstitial cells) и VEC (valves endothelial cells)

Выделение первичных культур производится в ламинаре, в культуральном боксе — это специальное помещение, имеющее повышенные требования к стерильности. Ламинар (лабораторный прибор для работы с биологическими объектами в стерильных условиях) предварительно готовится для выделения клеток: проводится кварцевание 10–15 минут, обработка поверхностей 70 % этиловым спиртом.

Из тканей аортального клапана выделяют два типа клеток: VIC — интерстициальные клетки клапана и VEC — эндотелиальные клетки клапана. Для ослабления и разрушения межклеточных связей в полученной ткани используется коллагеназа II типа — протеолитический фермент, специфически разрушающий пептидные связи в природном коллагене. Для работы готовится раствор коллагеназы в концентрации 2 мкг на 10 мл культуральной среды для VIC, которая состоит из 83 % DMEM — Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, США), 15 % FBS — fetal bovin serum (Gibco, США), 1 % пенициллина/стрептомицина (Invitrogene, США), 1 % L-глутамин (Invitrogene, США). Кроме того, для выделения клеток будут нужны стерильные пробирки 15 мл, фласки 25 и 75 мл, чашки Петри — 10 см (Corning, США), водяная баня, центрифуга, вортекс, культуральная среда для VIC (описание выше) и ECM — культуральная среда для VEC — готовая среда с ростовыми факторами (ScienCell, США), 0,2 % раствор желатина стерильный.

Вся работа с тканями и клетками производится в ламинаре. После подготовки ламинара и необходимых растворов, пробирку из холодильника переносят в ламинар. Фрагменты ткани переносят в стерильную чашку Петри, промывают створку/створки клапана раствором PBS. Переносят створки в пробирку-фалькон 15 мл с раствором коллагеназы и инкубируют в водяной бане при температуре 37 °C в течение 15 минут в растворе среды для культивирования VIC с коллагеназой. После инкубации отделяют эндотелиальные клетки от ткани с помощью интенсивного минутного встряхивания пробирки с клапаном на Vortex. Раствор с эндотелиальными клетками переносят в новый стерильный 15 мл фалькон, который помещают в центрифугу и откручивают 5 минут при 300g и комнатной температуре (18–22 °C). После откручивания супернатант переносят в пробирку с клапаном, а осажденные эндотелиальные клетки промывают фосфатно-солевым буфером и повторяют откручивание. Отмытые и открученные, с удаленным супернатантом, эндотелиальные

клетки переносят на флак 25 мл, который предварительно покрывают 0,2 % желатином. Помещают флак с клетками в инкубатор при 37 °С при 5 % CO₂. Смену среды производят 2–3 раза в неделю и по достижении клеток 70–80 % конфлюэнтности,

при необходимости, сортируют, затем пересеивают и банкируют либо используют в эксперименте.

Чтобы получить интерстициальные клетки аортального клапана, створки клапана с отделенными эндотелиальными клетками, после водяной

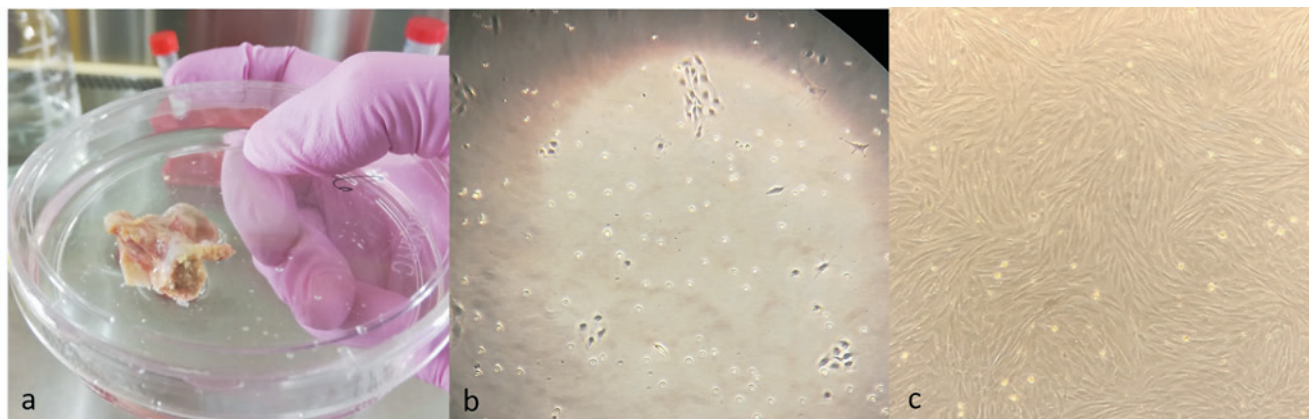


Рис. 1. Операционный материал: а — кальцинированная створка аортального клапана; b, с — клетки, получаемые из ткани створки: b — эндотелиальные клетки, с — интерстициальные клетки

Подготовительный этап

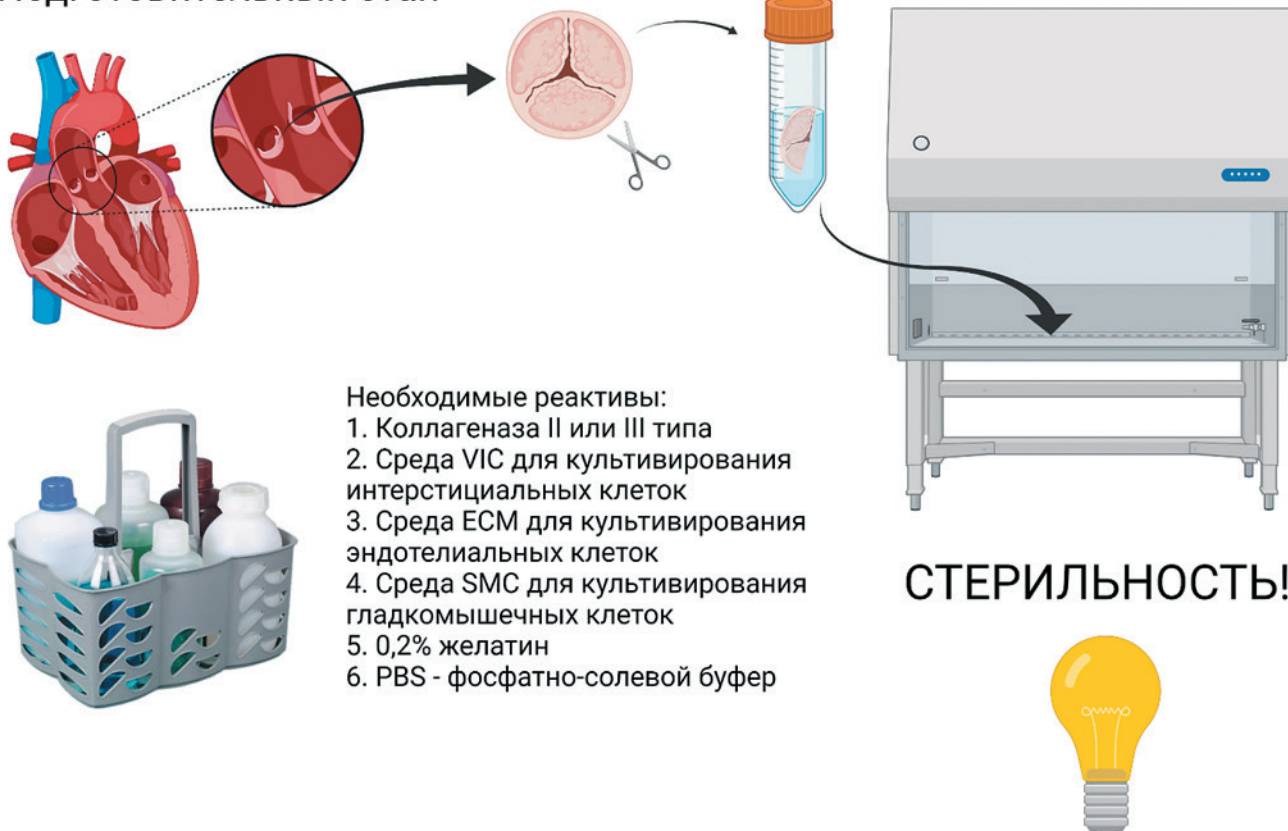


Рис. 2. Шаги подготовительного этапа для молекулярно-биологического исследования операционного материала

бани, инкубируют в растворе коллагеназы 24 часа в инкубаторе при 37 °C при 5 % CO₂. По прошествии 24 часов пробирку с растворенными створками клапана подвергают встряхиванию на Vortex в течение 1 минуты и центрифугированию в течение 5 минут на 300g при комнатной температуре, отбирают надосадочную жидкость, добавляют фосфатно-солевой буфер и процедуру повторяют. Далее удаляют супернатант, к осадку добавляют среду для культивирования, осадок ресуспендируют и переносят на фласк или чашку Петри и помещают в инкубатор при 37 °C при 5 % CO₂. Смену среды производят 2–3 раза в неделю. Пересев клеток производят по достижении клетками 90–95 % конфлюэнтности. Для пересева клетки промывают стерильным PBS, добавляют 5 % раствор трипсина, инкубируют 5 минут при 37 °C, после чего добавляют культуральную среду для ингибирования работы фермента и смывают клетки с чашки Петри. Суспензию клеток центрифугируют 5 минут при 300g. Затем отбирают надосадочную жидкость, добавляют среду для культивирования

и переносят в равных долях на 2–3 чашки Петри, покрытые 0,2 % раствором желатина. После 2–3 пассажей клетки используют для экспериментов и/или замораживают для банкирования (рис. 3).

Выделение первичных культур. SMC (smooth muscle cells) и HAEC (human aortic endothelial cells)

Из тканей аорты выделяют гладкомышечные клетки аорты (SMC) и эндотелиальные клетки аорты (HAEC) [патент RU2529947C2 «Способ получения культуры гладкомышечных клеток». Малашичева А.Б., Костарева А.А., Зверев Д.А., Костина Д.А., Успенский В.Е., Гордеев М.Л., Урусова М.Е., 2014 г.]. Для работы используют стерильный пластик и приборы, описанные выше, ECM среду для HAEC, среду для SMC (78 % DMEM — Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, США), 20 % FBS — fetal bovin serum (Gibco, США), 1 % пенициллин/стрептомицин (Invitrogene, США), 1 % L-глутамин (Invitrogene, США)). Для разрушения межклеточных взаимодействий используют

Выделение VIC и VEC

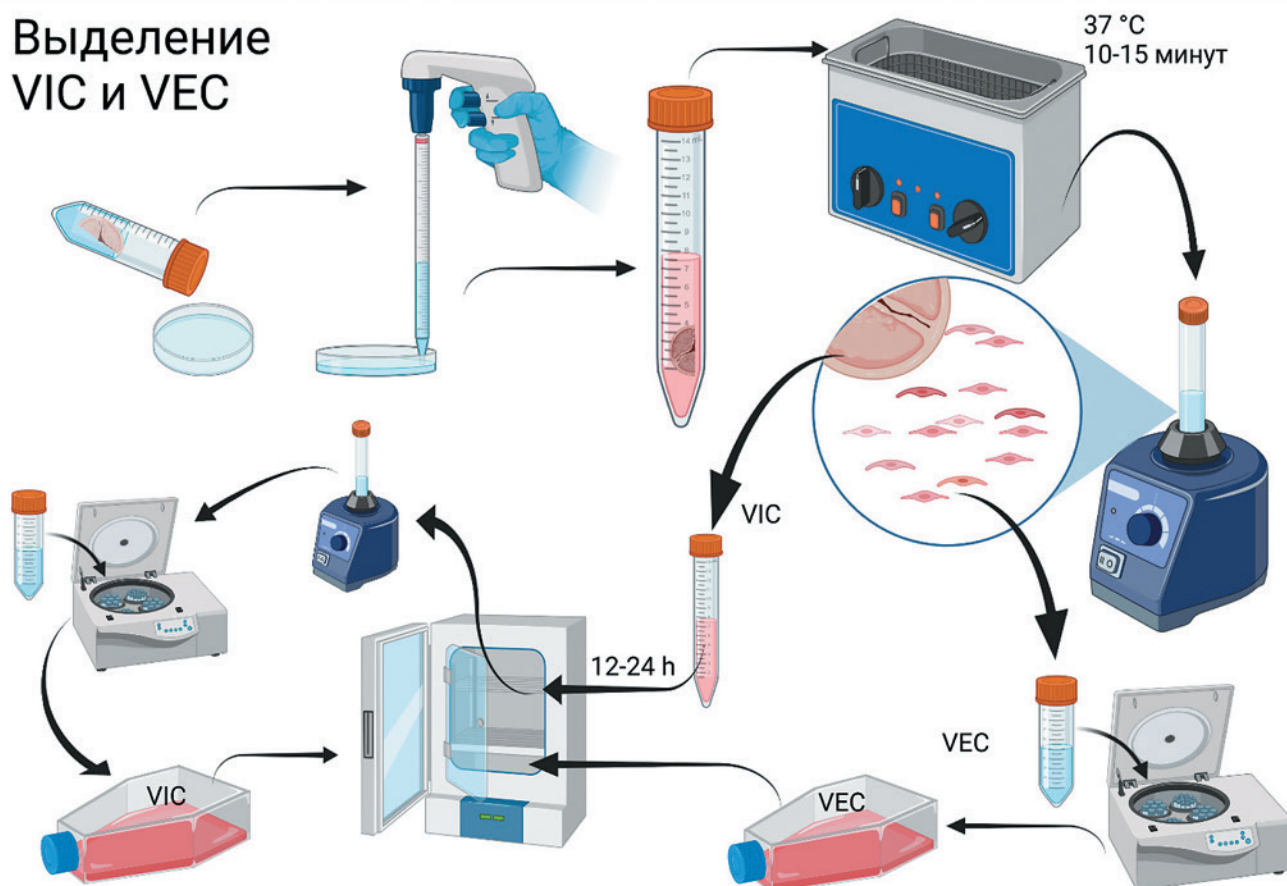


Рис. 3. Этапы выделения интерстициальных и эндотелиальных клеток аортального клапана (схематично)

раствор 1 мкг коллагеназы III в 10 мл среды для VIC (см. выше).

В стерильных условиях переносят ткань аорты на чашку Петри, промывают аорту PBS, снимают адвентицию и очищенную аорту переносят в 15 мл фалькон в раствор коллагеназы, инкубируют в водяной бане при температуре 37 °C в течение 30 минут. После инкубации переносят все содержимое фалькона в новую чашку Петри, аккуратно стерильным скальпелем счищают НАЕС с внутренней гладкой поверхности аорты, смывают оставшиеся клетки с ткани и переносят жидкость в свежий фалькон, который центрифугируют и промывают дважды на тех же условиях, что и VEC. Промытые и открученные клетки, после переноса супернатанта к аорте, ресуспензируются в среде ЕСМ и переносятся на флак 25мл, который помещают в инкубатор при 37 °C при 5 % CO₂. На следующий день клетки на флак аккучатно промываются PBS и далее культивируются в ЕСМ до достижения 70–90 % конфлюэнтности, после чего пересееваются и используются в экспериментах или банкируются.

Для получения гладкомышечных клеток аорты, очищенную от эндотелиальных клеток, помещают в раствор коллагеназы и снова инкубируют в водяной бане при температуре 37 °C в течение 30 минут. Готовят 2 флак 25 мл, наносят на дно флакв царапины стерильным инструментом. Ткань аорты после инкубации отмывают от раствора коллагеназы с помощью PBS, разрезают на небольшие куски (~ 2 мм) и переносят на царапины флакв. Аккучатно вносят во флак среду для SMC и помещают флак в инкубатор при 37 °C при 5 % CO₂ на 1 месяц, меняют среду 2–3 раза в неделю, по достижении 60–80 % конфлюэнтности пересеевают на чашки Петри и после 2–3 пассажей клетки используют для экспериментов и/или замораживают для банкирования.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Орловский П.И., Гриценко В.В., Юхнев А.Д., Евдокимов С.В., Гавриленков В.И. Искусственные клапаны сердца / Под ред. Ю. Л. Шевченко. — СПб: ЗАО «ОЛМА Медиа Групп». — 2007. — С. 9–21.
2. Малашичева А.Б., Костарева А.А., Зверев Д.А., Костина Д.А., Успенский В.Е., Гордеев М.Л., Урсова М.Е. Патент RU2529947C2 «Способ получения культуры гладкомышечных клеток». 2014.

3. Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2011. — № 63. — P. 242–268. DOI: 10.1016/j.addr.2011.01.008.

4. Misfeld M, Sievers H-H. Heart valve macro — and microstructure // *Philosophical transactions of the royal society*. — 2007. — № 362. — P. 1421–1436. DOI: 10.1098/rstb.2007.2125.

Информация об авторах:

Боярская Надежда Владимировна, младший научный сотрудник НИГ молекулярных механизмов кальцификации НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», младший научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины Института цитологии РАН;

Шишкова Анастасия Алексеевна, врач-кардиолог КДО КДЦ ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, младший научный сотрудник НИГ молекулярных механизмов кальцификации НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Сапранков Валерий Леонидович, аспирант по специальности «сердечно-сосудистая хирургия» ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Успенский Владимир Евгеньевич, д.м.н., заведующий НИЛ заболеваний аорты и аортального клапана, врач сердечно-сосудистый хирург отделения сердечно-сосудистой хирургии № 1 ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Малашичева Анна Борисовна, д.б.н., старший научный сотрудник НИГ молекулярных механизмов кальцификации НИЛ заболеваний с избыточной кальцификацией НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», заведующий лабораторией регенеративной биомедицины Института цитологии РАН.

Author information:

Boyarskaya Nadezhda V., Junior Researcher, Research Institute of Molecular Mechanisms of Calcification, Research Institute of Diseases with Excessive Calcification, Research Center for Unknown, Rare, and Genetically Caused Diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Junior Researcher, Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences;

Shishkova Anastasia A., cardiologist, CDO CDC, Almazov National Medical Research Centre, Junior Researcher, Research Institute of Molecular Mechanisms of Calcification, Research Institute of Diseases with

Excessive Calcification, Research Center for Unknown, Rare, and Genetically Caused Diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Saprankov Valery L., post-graduate student in the specialty "cardiovascular surgery" Almazov National Medical Research Centre;

Uspensky Vladimir E., Doctor of Medical Sciences, Head of the Research Laboratory for Aortic and Aortic Valve Diseases, Cardiovascular Surgeon, Department of Cardiovascular Surgery No. 1, Almazov National Medical Research Centre;

Malashicheva Anna B., Doctor of Biological Sciences, Senior Researcher, Research Institute of Molecular Mechanisms of Calcification of the Research Institute of Diseases with Excessive Calcification, Research Center for Unknown, Rare and Genetically Caused Diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Head of the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences.

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 616-005.1-08:612.115.12

ТЕСТ ГЕНЕРАЦИИ ТРОМБИНА КАК ИНТЕГРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА: ТЕХНИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ В КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ

**Мельничникова О. С., Жиленкова Ю. И., Золотова Е. А.,
Пищулов К. А., Сироткина О. В., Симакова М. А., Вавилова Т. В.**

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

Контактная информация:

Мельничникова Ольга Сергеевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: olga4403@gmail.com

Статья поступила в редакцию 04.04.2022
и принята к печати 08.05.2022.

РЕЗЮМЕ

Данный обзор литературы посвящен одному из интегральных тестов оценки системы гемостаза — тесту генерации тромбина (ТГТ), его техническим характеристикам, проблемам в стандартизации и возможному клиническому использованию. Оценка генерации тромбина (ГТ) более чувствительна к изменениям, происходящим в системе гемостаза, поскольку учитывает действие как прокоагулянтных, так и антикоагулянтных факторов в процессе образования тромбина. Важно отметить, что существуют варианты постановки ТГТ в богатой тромбоцитами плазме или в цельной крови, что приближает исследователя к условиям *in vivo*. Однако, несмотря на явные преимущества этого анализа при сравнении со скрининговыми тестами оценки системы гемостаза, существует ряд ограничений, в том числе отсутствие стандартизации, что не позволяет на данный момент внедрить ТГТ в клиническую практику. В данном обзоре обсуждаются технические характеристики ТГТ и варианты наборов реагентов в зависимости от поставленной клинической задачи, а также приводятся результаты последних исследований в области клинического применения ТГТ, демонстрирующие перспективность анализа ГТ для оценки риска как геморрагических осложнений, так и тромботических событий.

Ключевые слова: кровотечение, тест генерации тромбина, тромбиновый потенциал, тромбоз.

Для цитирования: Мельничникова О.С., Жиленкова Ю.И., Золотова Е.А., Пищулов К.А., Сироткина О.В., Симакова М.А., Вавилова Т.В. Тест генерации тромбина как интегральный анализ системы гемостаза: технические возможности и применение в клинико-лабораторной практике. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(3):119-128. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-119-128

THROMBIN GENERATION TEST AS AN INTEGRAL ANALYSIS OF THE HEMOSTASIS SYSTEM: TECHNICAL CAPABILITIES AND APPLICATION IN LABORATORY PRACTICE

**Melnichnikova O. S., Zhilenkova Yu. I., Zolotova E. A.,
Pishchulov K. A., Sirotkina O. V., Simakova M. A., Vavilova T. V.**

Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Melnichnikova Olga S.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg,
Russia, 197341.
E-mail: olga4403@gmail.com

Received 04 April 2022; accepted 08 May 2022..

ABSTRACT

This review is devoted to one of the integral tests for assessing the hemostasis system — the thrombin generation test (TGT), its technical characteristics, problems in standardization and possible clinical use. Evaluation of thrombin generation (TG) is more sensitive to changes occurring in the hemostasis system, since it takes into account the effect of both procoagulant and anticoagulant factors in the process of TG. It is important to note that there are options for setting TGT in platelet-rich plasma or in whole blood, which brings the researcher closer to in vivo conditions. However, despite the obvious advantages of this analysis when compared with routine screening tests for assessing the hemostasis system, there are number of limitations, including the lack of standardization, which does not currently allow the introduction of TGT into clinical practice. This review discusses the technical characteristics of TGT and variants of reagent kits depending on the clinical task, and provides the results of recent studies in the field of clinical use of TGT, demonstrating the prospects of GT analysis for assessing the risk of both hemorrhagic complications and thrombotic events.

Key words: bleeding, thrombin generation test, thrombin potential, thrombosis.

For citation: Melnichnikova OS, Zhilenkova YuI, Zolotova EA, Pishchulov KA, Sirotkina OV, Simakova MA, Vavilova TV. Thrombin generation test as an integral analysis of the hemostasis system: technical capabilities and application in laboratory practice. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(3):119-128. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-119-128

Список сокращений: АФС — антифосфолипидный синдром, АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время, ГТ — генерация тромбина, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ЛАГ — легочная артериальная гипертензия, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, ПС — протеин С, роТЭМ — ротационная тромбоэластометрия, ТГТ — тест генерации тромбина, ТМ — тромбомодулин, ТФ — тканевой фактор, ТЭГ — тромбоэластография, ЧКВ — чрескожные коронарные вмешательства, ЕТР (от англ. endogenous thrombin potential) — эндогенный тромбиновый потенциал, LT (от англ. Lag time) — время инициации свертывания, LTA (от англ. light transmission aggregometry) — оптическая индуцированная агрегатометрия, Peakthr. (от англ. peak thrombin) — высота пика образования тромбина, ttPeak (от англ. time to peak) — время достижения пика тромбина, VI (от англ. velocity index) — индекс скорости образования тромбина.

ВВЕДЕНИЕ

Арсенал методов лабораторной оценки системы гемостаза велик, но, к сожалению, сохраняет фрагментарность представлений о процессах, происходящих *in vivo*, кроме того, большинство скрининговых тестов обладают низкой чувствительностью к состоянию гиперкоагуляции. Такие стандартные показатели коагулограммы, как активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ) и тромбиновое время, чаще всего остаются неизменными даже при наступлении тромбоза. Регистрация времени образования сгустка при определении клоттинговых тестов коагулограммы происходит на начальной фазе образования тромбина, когда образовалось всего лишь около 5 % от его общего количества [1]. Это означает, что 95 % генерируемого тромбина не измеряется при определении ПВ и АЧТВ. Результаты измерения этих тестов могут ответить нам, есть ли дефицит свертывания одного или нескольких прокоагулянтных факторов, но является ли этот недостаток скомпенсированным антикоагулянтной системой, а также гиперкоагуляцию эти тесты оценить не могут. Таким образом, определение времени образования сгустка в пробирке не может дать клиницисту полной информации о процессах свертывания, происходящих *in vivo*. Более подробную информацию о процессах в системе гемостаза дают интегральные тесты, к которым относятся вязкоупругие тесты (тромбоэластография — ТЭГ и ротационная тромбоэластометрия — роТЭМ), тест тромбодинамики и ТГТ.

Тромбоэластография/метрия (ТЭГ или роТЭМ) — метод графической регистрации процессов свертывания крови и фибринолиза, получивший наибольшее распространение сегодня в хирургии и анестезиологии. Эти методы базируются на измерении физической прочности сгустка. Несомненным достоинством методов является использование цельной крови в качестве материала, что приближает оценку к условиям *in vivo* и позволяет не тратить время на подготовку плазмы, а также возможность применять все разнообразие активаторов свертывания и фибринолиза, что позволяет изучать и диагностировать нарушения разных элементов системы свертывания. На сегодняшний день ТЭГ и роТЭМ применяются в основном для оценки риска кровотечений, а также для динамического контроля гемостатической или антитромботической терапии. Однако использование этих технологий для анализа протромботических изменений остается дискуссионным. Кроме того, важным недостатком является сложность массовых параллельных анализов с учетом технической реализации метода.

Относительно новым интегральным анализом оценки системы гемостаза является тест тромбодинамики, который предназначен для исследования *in vitro* пространственно-временной динамики свертывания крови, инициированной локализованным активатором свертывания. При этом тест тромбодинамики оценивает только конечный результат коагуляционного каскада — образование фибринового сгустка, что является ограничением метода. Проведенные исследования подтверждают, что этот тест информативен в отношении оценки риска развития тромбозов и кровотечений, показана информативность в оценке эффективности проводимой антикоагулянтной терапии. Однако на сегодня недостаточно данных для внедрения теста тромбодинамики в клиническую практику, протестировано ограниченное количество пациентов (до 100 человек) и оцениваемых событий в виде тромбозов и кровотечений [2].

Одним из широко обсуждаемых и изучаемых интегральных тестов является ТГТ. Методика определения ГТ была предложена еще в 1953 году R. Macfarlane и R. Biggs. Однако она была полностью ручной, трудоемкой, и результаты исследования сильно варьировали. [3]. В последующем группа исследователей из Маастрихтского университета под руководством Н. Hemker видоизменила технологию и разработала автоматизированный метод исследования ГТ одновременно в нескольких образцах плазмы крови, что стандартизовало и упростило оценку результатов [4]. ГТ *in vitro* демонстри-

рует эндогенную способность системы гемостаза и может свидетельствовать о тромботическом или геморрагическом риске, поскольку, в отличие от рутинных скрининговых тестов, она отражает вклад прокоагулянтных и антикоагулянтных факторов, включая двойственную функцию тромбина.

1. БИОХИМИЯ ГЕНЕРАЦИИ ТРОМБИНА

Тромбин — ключевой фермент каскада свертывания крови и имеет решающее значение в поддержании гемостатического баланса. Следовые количества тромбина образуются на стадии инициации коагуляции *in vivo* через фактор Ха, продуцируемый комплексом TF/фактор VIIa. Реакция коагуляции достигает всплеска образования тромбина во время фазы амплификации, когда еще действие ингибиторов не наступило и тромбин дополнительно способен иницировать полимеризацию и стабилизацию фибрина, делая формирующийся сгусток гемостатически стабильным. Тромбин часто называют белком с лицом Януса, потому что он принимает противоположные прокоагулянтные и антикоагулянтные функции в течение того времени, когда формируется кровяной сгусток. Тромбин активирует путем прямого ограниченного протеолиза другие белки свертывания с образованием активных ферментов, таких как факторы X, V, VIII,

XI, а также активирует тромбоциты, проявляя тем самым прокоагулянтные свойства. Посредством взаимодействия с клеточным рецептором — тромбомодулином (ТМ) активируется антикоагулянтная система протеина С (ПС). В гемостазе ПС обеспечивает ферментативный лизис факторов Va и VIIIa. Комплекс тромбин/ТМ не только многократно усиливает активацию ПС, но также блокирует тромбин-опосредованное превращение фибриногена в фибрин и обеспечивает связывание тромбина с клеточными рецепторами тромбоцитов, лейкоцитов, макрофагов. Также чрезмерная активация тромбина контролируется антитромбином III и ингибитором пути тканевого фактора (TFPI — tissue factor pathway inhibitor, англ.) [5].

Таким образом, ГТ — это многоступенчатый, сложный биохимический процесс, регистрация которого требует специализированного теста, такого как ГТТ. Анализ ГТ измеряет протеолитическое расщепление тромбином синтетического субстрата, высвобождающего хромоген или флуорофор, выходной сигнал которого постоянно измеряется и пропорционален количеству образовавшегося тромбина. Затем специальное компьютерное программное обеспечение вычисляет активность тромбина по сравнению со стандартом тромбина, отслеживает кривую ГТ и вычисляет ее соответствующие параметры, описывающие тромбограм-

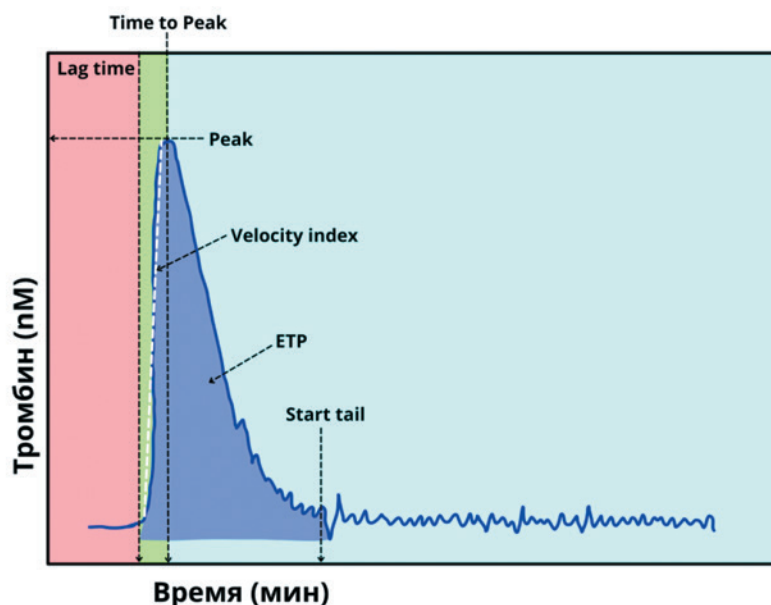


Рис. 1. Фазы генерации тромбина и измеряемые параметры.

Lag time — время инициации свертывания, мин; Peakthr — пиковая концентрация тромбина, нМоль; Time to peak — время достижения пиковой концентрации тромбина, мин; ETP — эндогенный тромбиновый потенциал, нМоль/мин; розовым цветом обозначена фаза инициации, зеленым — фаза амплификации, голубым — фаза разрешения

му (рис. 1) [6]. Кинетика реакции состоит из трех фаз: инициации, амплификации и разрешения (рис. 1). Фаза инициации соответствует времени начального образования фибрина или времени свертывания рутинных тестов, таких как ПВ или АЧТВ, которые требуют только следовых количеств тромбина (т.е. $\approx 5\%$ от общего количества образовавшегося тромбина). В фазу амплификации преобразование протромбина происходит быстрее, чем ингибирование тромбина. При фазе разрешения наступает интенсивное действие различных ингибиторов, присутствующих в образце плазмы, таких как активированный ПС, антитромбин (АТ) и альфа-2-макроглобулин.

2. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Технология измерения генерации тромбина методом калибровочной автоматизированной тромбограммы (КАТ) в сравнении с рутинными коагулологическими тестами обладает следующими преимуществами: прямая регистрация и оценка нескольких фаз ГТ, высокая чувствительность; комплексный подход к анализу тромбинемии; модификации теста с использованием тромбомодулина для оценки антикоагулянтной системы ПС; возможность модуляции триггерных реагентов в зависимости от клинической задачи. Кроме того, возможность измерения в бедной и богатой тромбоцитами плазме [7], в замороженно-размороженной плазме [8], а также в цельной крови. [9]. При анализе ТГТ в богатой тромбоцитами плазме оценивается вклад тромбоцитов в ГТ, а в случае использования цельной крови анализируются также и лейкоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия.

Несмотря на преимущества ТГТ, открытым остается вопрос стандартизации. На сегодняшний день не существует единых рекомендаций по преаналитическим условиям. Хотя достигнуты определенные успехи и выполнены несколько исследований, позволяющих сформулировать рекомендации. Так, Loeffen и коллеги провели обширное исследование, сравнивающее различные процедуры взятия крови, и выпустили преаналитические рекомендации [10]. Также Международное общество тромбоза и гемостаза (ISTH) совместно с Научным комитетом по стандартизации (SSC) предложило стандартизированные преаналитические и аналитические условия для измерения ГТ для конкретного заболевания — гемофилии [11].

Вторым важным аспектом остается отсутствие единой рекомендации по концентрации и условиям происхождения триггерных реагентов, а именно ТФ и фосфолипидов. Сегодня производители реак-

тивов рекомендуют для диагностики склонности к кровотечению использовать низкие концентрации ТФ (диапазоне от 0,4 до 2 пМ) и очень низкие концентрации фосфолипидов (0,4 до 4 мкМ). Такая комбинация реагентов подходит для выявления гипокоагуляции, вызванной дефицитом факторов VIII или IX, а также для мониторинга гемостатической терапии у пациентов с гемофилией [12, 13]. Другие нарушения свертываемости крови могут требовать иных условий. Так, при дефиците фактора XI корреляция между ТГТ с клиническим риском кровотечения наблюдалась только тогда, когда коагуляция инициировалась в образцах без ингибитора контактной активации с очень низкими уровнями ТФ в присутствии тромбоцитов [11, 14]. Для тромбоцитарных состояний предлагается использовать высокие или средние концентрации ТФ (от 5 до 40 пМ) и низкие концентрации фосфолипидов. Именно такое сочетание триггерного реактива показало информативность в оценке риска рецидивирующего тромбоза глубоких вен и рак-ассоциированного тромбоза, а также при наследственных формах тромбофилии и тромбозах, вызванных экзогенными факторами риска [1]. Реагенты с высокими концентрациями ТФ (от 20 до 50 пМ) и фосфолипидов (около 4 мкМ) рекомендованы для мониторинга антикоагулянтной терапии.

В дополнение к точным концентрациям компонентов триггерных реактивов, на ТГТ влияет их способ приготовления, размер везикул, тип и источник фосфолипидов, а также интеграция и ориентация ТФ. Таким образом, очень важно определить соответствующий триггер для соответствующего анализа, так как при использовании неправильного реагента у пациента с гемофилией не будет наблюдаться снижение образования тромбина, а у пациента, принимающего антикоагулянты, вообще не будет образования тромбина [1].

Существует несколько модификаций предложенных прототипных триггерных реагентов. Так, для определения активности системы ПС используют реагенты с добавлением ТМ. Поскольку в ТГТ, активированном только ТФ и фосфолипидами, образуется только ограниченное количество активированного ПС, возможность исследования его функции отсутствует. Чтобы восполнить этот пробел, добавление ТМ к реагенту может способствовать изучению функции ПС. Совсем недавно было показано, что активатор контактного пути, содержащий триггерные реагенты, а точнее фактора XIa или эллаговую кислоту, подходит для изучения ГТ в присутствии нефактор-заместительной терапии [15]. Для изучения прокоагулянтной активности микрочастиц используют реагент без добавления

ТФ, реакция коагуляции инициируется за счет наличия на микрочастицах собственного ТФ.

В настоящий момент существует несколько производителей тест-системы и приборной базы для ТГТ: КАТ (Thrombinoscope BV, Maastricht, Нидерланды) с использованием отдельного флуориметра Fluoroscanner (Thermo Scientific, Финляндия); автоматический коагулологический анализатор Ceveron с модулем для ТГТ (Technoclone, Vienna, Austria); оценка ЕТР на автоматическом коагулологическом анализаторе компании Siemens (США); полностью автоматизированный ТГТ на отдельном приборе ST Genesia (Stago, Франция). Все описанные выше технологии определения ГТ используют флуорогенный субстрат, который с течением времени показал большую чувствительность по сравнению с хромогенным.

Таким образом, для создания стандартизированного ТГТ необходимы специальный анализатор с жестким контролем температуры и интенсивности света, утвержденные схемы пипетирования для соответствующего реагента, включая оптимизированное время измерения, хорошо контролируемый субстрат, стандарты флуоресценции, наличие специальных средств контроля качества, охватывающих диапазон аналитических измерений, а также стандартизированных реагентов или триггеров.

3. КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Кровотечение и тромбоз являются критическими состояниями, и оценка гемостатического баланса пациента имеет решающее значение в терапии. Рутинные и специализированные параметры коагуляции помогают диагностировать изменения коагуляции, но могут не выявить пациентов с риском кровотечения или тромбоза. Тогда как интегральные тесты, в том числе ТГТ, являются потенциальными технологиями для диагностики, прогнозирования, профилактики и лечения наследственных и приобретенных коагулопатий [16]. Наличие автоматизированных систем, предложение по стандартизации, применение в дополнение к основным клиническо-лабораторным анализам может проложить путь к внедрению ТГТ в рутинную клиническую практику.

3.1. Оценка риска кровотечения и мониторинг терапии

Проблема диагностики гемофилии заключается в том, что фенотип кровотечения может различаться у пациентов с гемофилией с одинаковым уровнем фактора. ТГТ может лучше разделять больных с тяжелой формой гемофилии с идентичными уровнями факторов, но с различными фенотипами

кровотечений в соответствии с их гемостатической способностью [17].

ТГТ можно использовать для мониторинга эффективности терапии, например, рекомбинантных факторов [18], а также с его помощью персонализировать лечение пациентов с гемофилией. Информативность ТГТ для оценки эффективности фактор-специфической заместительной терапии и для нефактор-заместительной терапии (агенты обходного действия) или их комбинации изучалась у хирургических и нехирургических пациентов [19]. Как и в других исследованиях, авторы подчеркивают, что уровень фактора VIII не точно отражает способность к коагуляции у больных гемофилией [20]. Напротив, ТГТ подтвердил свою способность прогнозировать серьезные кровотечения. При таком персонализированном подходе, учитывающем общий эффект про- и антикоагулянтного статуса, ТГТ может представлять собой полезный инструмент для выявления пациентов с тяжелой тенденцией к кровотечениям, которым требуется ранняя профилактика дефицита фактора VIII, а также для оптимизации и мониторинга эффективности лечения. По этой же причине именно ТГТ был предложен также как дополнительный инструмент для оценки риска кровотечения при болезни Виллебранда [21]. Напротив, вязкоупругие тесты (ТЭГ и роТЭМ) считались недостаточно стандартизированными для оценки пациентов с гемофилией [19].

3.2. Оценка риска тромбоэмболических событий

Достаточно много исследований посвящено оценке риска венозных тромбоэмболических (ВТЭ) осложнений с помощью ТГТ. Повышенный уровень D-димера и повышенная ГТ были связаны с повышенным риском первого события (отношение шансов: 1,8–3,4) [22]. У пациентов с наследственным дефицитом протеина S (n = 242) продемонстрированы повышенный ЕТР и сокращение времени инициации (LT). Повышенная ГТ была обнаружена и у пациентов с дефектом антитромбина, дефицитом ПС, мутацией гена протромбина и Лейдена с резистентностью к активированному ПС [23, 24].

В результате идиопатической венозной тромбоэмболии пациенты подвержены риску рецидива. Однако предрасполагающие факторы, включая наследственную тромбофилию, слабо связаны с повторными событиями, что затрудняет оценку рецидива тромбоза. В то же время коррекция антикоагулянтной терапии может подвергнуть пациентов чрезмерному риску кровотечения или тромбоза. ТГТ был предложен в качестве надежного инструмента для оценки риска рецидива тромбоза [22, 25, 26, 27].

Одним из серьезных заболеваний, имеющих высокий риск тромбоза, является антифосфолипидный синдром (АФС). К сожалению, лабораторная диагностика АФС остается затруднительной, так как на сегодня нет стандартизации тестов на волчаночный антикоагулянт и присутствует гетерогенность определяемых антител к фосфолипидам. В ряде исследований были показаны повышенный уровень ГТ при АФС и связь с приобретенной резистентностью к активированному ПС [28, 29]. Сочетание ТГТ с используемыми в настоящее время тестами на антифосфолипидные антитела может обеспечить более чувствительную и информативную начальную диагностику. Также ТГТ можно использовать для оценки эффективности антикоагулянтной терапии у пациентов с АФС [30, 31, 32].

Еще одно направление для клинического применения ТГТ — это оценка риска тромботических событий при атеротромбозе. Как известно, ишемическая болезнь сердца (ИБС) является одной из ведущих причин смерти в большинстве развитых стран. В предыдущих наших исследованиях было показано, что уровень ЕТР возрастает с увеличением тяжести атеросклеротического повреждения и вовлечением в процесс нескольких сосудистых бассейнов и может быть использован в качестве дополнительного и неинвазивного метода диагностики распространенности атеросклеротического поражения сосудистого русла [33]. Кроме того, у больных ИБС, перенесших инфаркт миокарда, применение ТГТ выявляет увеличение количества и скорости образования тромбина, что определяет перспективность применения теста для оценки тромботического риска и для персонализации терапии [34].

Тромбоз коронарного стента — редкое, но серьезное осложнение чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ), проявляющееся инфарктом миокарда с частыми смертельными исходами. В исследовании типа «случай–контроль» у пациентов с тромбозом стента наблюдалось гиперкоагуляционное состояние при выполнении ТГТ, что связано с усиленной контактной активацией и ослаблением антикоагулянтной активности по пути ПС [35]. В нашем предыдущем исследовании показано, что повышение показателей ТГТ у пациентов, перенесших ЧКВ, отражает риск повторной реваскуляризации и может использоваться как дополнительный критерий прогнозирования риска неблагоприятных исходов ЧКВ и прогрессирования атеросклероза [36].

Также в недавнем исследовании ТГТ у пациентов с легочной гипертензией (ЛАГ) было показано, что у лиц с длительным течением идиопатической ЛАГ наблюдалось достоверное снижение ГТ, что объяснялось эффектом потребления факторов свер-

тывания на фоне тромбоза *in situ*. В то время как у пациентов с ЛАГ, ассоциированной с системной склеродермией, отмечалась гиперкоагуляция, ассоциированная с тяжестью течения заболевания [37].

Значительная связь между увеличением ГТ и возникновением острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) по ишемическому типу была обнаружена в важном проспективном исследовании, включавшем более 9000 пациентов в возрасте старше 65 лет с 4-летним периодом наблюдения. Таким образом, профилактика ОНМК должна быть направлена на снижение риска тромбоэмболии, потенциально отражаемого ТГТ [38].

В венском исследовании рака и тромбоза пациентов с впервые диагностированным раком или прогрессированием заболевания после ремиссии ($n = 1033$) оценивалось прогнозирование венозной тромбоэмболии путем измерения образования тромбина. Пациенты с повышенным пиковым уровнем тромбина (определяемым как значения тромбина ≥ 611 нМ, представляющие 75-й перцентиль от общей исследуемой популяции) имели повышенный риск ВТЭ с отношением рисков 2,1 (95 % ДИ, от 1,3 до 3,3, $p = 0,002$). Кумулятивная вероятность развития ВТЭ через 6 месяцев была значительно выше у пациентов с повышенным пиком тромбина, чем у лиц с более низким Peakthr [39].

3.3. Исследования коагулопатии при COVID-19

Тяжелая инфекция COVID-19 была связана с коагулопатией, обусловленной воспалением, возникающим в результате цитокинового шторма. Как показано, генерируется избыточное количество тромбина с последующим состоянием гиперкоагуляции, что приводит к высокому риску тромбоза и летальному исходу. В нескольких статьях сообщалось об использовании ТГТ для оценки профилей гемостаза у пациентов с тяжелой формой COVID-19. Поскольку наиболее тяжелые пациенты получают гепарин в различных дозах, будь то стандартная или усиленная профилактическая доза, доступны только результаты ТГТ на фоне приема гепарина. Результаты ТГТ подтверждают избыточную ГТ, ЕТР в пределах нормы даже в присутствии гепарина. Эти лабораторные данные согласуются со сниженной частотой тромбозов у пациентов, получающих профилактику высокими дозами гепарина, без увеличения частоты кровотечений [40]. ТГТ был оптимизирован и валидирован для тестирования образцов плазмы, содержащих гепарин, и показал дозозависимое снижение Peak и ЕТР [41]. В другом исследовании у 127 госпитализированных пациентов с подтвержденным COVID-19 параметры ЕТР и LT коррелирова-

ли с провоспалительными маркерами и маркерами лизиса клеток, а соотношение D-димер/ЕТР применялось для оценки риска серьезных осложнений во время инфекции [42]. Аналогичным образом, в проспективном исследовании было обнаружено, что Peakthг связан с повышенным риском смертности у пациентов с COVID-19 [43]. В недавнем исследовании показано, что у пациентов с COVID-19 был повышен ЕТР, несмотря на профилактическую антикоагулянтную терапию. Обнаружена связь удлинения времени LT с увеличением тяжести заболевания при COVID-19 [44]. Однако предположение о том, что ТГТ отражает состояние гиперкоагуляции у пациентов с COVID-19, является предметом дискуссий в литературе, и сообщается о вариабельности результатов исследований в зависимости от экспериментальных условий [45]. Все же ТГТ стал ценным инструментом для оценки общего коагуляционного статуса пациентов с COVID-19 за относительно короткое время [46, 47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое внедрение ТГТ в клиническую практику в настоящее время ограничено из-за отсутствия единых рекомендаций по стандартизации данной технологии. При этом в последние годы производители предприняли значительные усилия, чтобы предложить стандартизированные реагенты и эталонный контрольный материал для нормализации результатов, что помогло получить сопоставимые результаты в различных лабораториях. Это привело к значительному снижению межлабораторной изменчивости. Многие исследования, как показано в этом обзоре, доказали потенциальную роль ТГТ в диагностике кровотечений и тромботических событий, но большинство из них были проведены на небольших группах пациентов с использованием различных систем и реагентов. В то же время сочетание точности, чувствительности и универсальности современных методов ТГТ предлагает широкий спектр клинического и научного применения. Показана эффективность использования ТГТ в оценке риска кровотечения и тромбообразования, включая диагностику и прогнозирование наследственных и приобретенных нарушений свертывания крови, а также мониторинг связанного с ними лечения. Кроме того, недавняя пандемия COVID-19 доказала связь высокой частоты тромботических проявлений с инфекционными заболеваниями и необходимость антитромботической профилактики в ряде клинических ситуаций. Таким образом, ТГТ представляется перспективным лабораторным методом интегральной оценки системы гемостаза с целью

персонализированного подхода в выборе антитромботической терапии.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Depasse F, Binder NB, Mueller J, et al. Thrombin generation assays are versatile tools in blood coagulation analysis: A review of technical features, and applications from research to laboratory routine. *J Thromb Haemost.* 2021; 19: 2907–2917.
- Баландина А.Н., Кольцова Е.М., Шибeko А.М. Тромбодинамика: новый подход к диагностике нарушений системы гемостаза. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2018; 17: 114–116.
- Macfarlane RG, Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J Clin Pathol.* 1953; 6: 3–8.
- Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003; 33: 4–15.
- Ten Cate H. Thrombin generation in clinical conditions. *Thromb Res.* 2012; 129: 367–370.
- Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem.* 2016; 62: 699–707.
- Panova-Noeva M, van der Meijden PEJ, ten Cate H. Clinical Applications, Pitfalls, and Uncertainties of Thrombin Generation in the Presence of Platelets. *J Clin Med.* 2019; 9: 92.
- Regnault V, Béguin S, Lecompte T. Calibrated Automated Thrombin Generation in Frozen-Thawed Platelet-Rich Plasma to Detect Hypercoagulability. *PHT.* 2003; 33: 23–29.
- Prior SM, Mann KG, Freeman K, et al. Continuous thrombin generation in whole blood: new applications for assessing activators and inhibitors of coagulation. *Anal Biochem.* 2018; 551: 19–25.
- Loeffen R, Kleinegris M-CF, Loubele STBG, et al. Preanalytic variables of thrombin generation: towards a standard procedure and validation of the method. *J Thromb Haemost.* 2012; 10: 2544–2554.
- Dargaud Y, Wolberg AS, Gray E, et al. Proposal for standardized preanalytical and analytical conditions for measuring thrombin generation in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2017; 15: 1704–1707.
- Salvagno GL, Astermark J, Ekman M, et al. Impact of different inhibitor reactivities with commercial

factor VIII concentrates on thrombin generation. *Haemophilia*. 2007; 13: 51–56.

13. Váradi K, Turecek PL, Schwarz HP. Thrombin generation assay and other universal tests for monitoring haemophilia therapy. *Haemophilia*. 2004; 10 Suppl 2: 17–21.

14. Pike GN, Cumming AM, Hay CRM, et al. Sample conditions determine the ability of thrombin generation parameters to identify bleeding phenotype in FXI deficiency. *Blood*. 2015; 126: 397–405.

15. Ogiwara K, Nogami K, Matsumoto N, et al. A modified thrombin generation assay to evaluate the plasma coagulation potential in the presence of emicizumab, the bispecific antibody to factors IXa/X. *Int J Hematol*. 2020; 112: 621–630.

16. Binder NB, Depasse F, Mueller J, et al. Clinical use of thrombin generation assays. *J Thromb Haemost*. 2021; 19: 2918–2929.

17. Teichman J, Chaudhry HR, Sholzberg M. Novel assays in the coagulation laboratory: a clinical and laboratory perspective. *Transfus Apher Sci*. 2018; 57: 480–484.

18. Váradi K, Negrier C, Berntorp E, et al. Monitoring the bioavailability of FEIBA with a thrombin generation assay. *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 2374–2380.

19. Dargaud Y, Lienhart A, Janbain M, et al. Use of thrombin generation assay to personalize treatment of breakthrough bleeds in a patient with hemophilia and inhibitors receiving prophylaxis with emicizumab. *Haematologica*. 2018; 103: e181–e183.

20. Valke LLFG, Bukkems LH, Barteling W, et al. Pharmacodynamic monitoring of factor VIII replacement therapy in hemophilia A: Combining thrombin and plasmin generation. *J Thromb Haemost*. 2020; 18: 3222–3231.

21. Rugeri L, Beguin S, Hemker C, et al. Thrombin-generating capacity in patients with von Willebrand's disease. *Haematologica*. 2007; 92: 1639–1646.

22. van Hylckama Vlieg A, Baglin CA, Luddington R, et al. The risk of a first and a recurrent venous thrombosis associated with an elevated D-dimer level and an elevated thrombin potential: results of the THE-VTE study. *J Thromb Haemost*. 2015; 13: 1642–1652.

23. Simioni P, Castoldi E, Lunghi B, et al. An underestimated combination of opposites resulting in enhanced thrombotic tendency. *Blood*. 2005; 106: 2363–2365.

24. Alhenc-Gelas M, Canonico M, Picard V. Influence of natural SERPINC1 mutations on ex vivo thrombin generation. *J Thromb Haemost*. 2010; 8: 845–848.

25. Chaireti R, Jennersjö C, Lindahl TL. Is thrombin generation at the time of an acute thromboembolic episode a predictor of recurrence? The Linköping Study on Thrombosis (LIST)--a 7-year follow-up. *Thromb Res*. 2013; 131: 135–139.

26. Lim HY, O'Malley C, Donnan G, et al. A review of global coagulation assays — Is there a role in thrombosis risk prediction? *Thromb Res*. 2019; 179: 45–55.

27. Tripodi A, Martinelli I, Chantarangkul V, et al. The endogenous thrombin potential and the risk of venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2007; 121: 353–359.

28. Zuily S, Ait Aissa K, Membre A, et al. Thrombin generation in antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2012; 21: 758–760.

29. Liestøl S, Sandset PM, Mowinckel M-C, et al. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test is associated with thrombotic events in patients with lupus anticoagulants. *J Thromb Haemost*. 2007; 5: 2204–2210.

30. Efthymiou M, Lawrie AS, Mackie I, et al. Thrombin generation and factor X assays for the assessment of warfarin anticoagulation in thrombotic antiphospholipid syndrome. *Thromb Res*. 2015; 135: 1191–1197.

31. Cohen H, Hunt BJ, Efthymiou M, et al. Rivaroxaban versus warfarin to treat patients with thrombotic antiphospholipid syndrome, with or without systemic lupus erythematosus (RAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 2/3, non-inferiority trial. *Lancet Haematol*. 2016; 3: e426–436.

32. Bergstrom CP, Zia A, Sarode R, et al. Thrombin Generation in a patient with Triple Positive Antiphospholipid Syndrome Treated with Three Different Anticoagulants. *Transfus Apher Sci*. 2020; 59: 102815.

33. Мельничникова О.С., Лапин С.В., Тишков А.В. и др. Тест генерации тромбина в диагностике гиперкоагуляции у пациентов с атеросклерозом. *Медицинский Алфавит*. 2016; 4: 29–33.

34. Мельничникова О.С., Семенов А.П., Панов А.В. и др. Исследование генерации тромбина у больных со стабильной ишемической болезнью с предшествующим инфарктом миокарда. *Трансляционная медицина*. 2019; 6: 37–45.

35. Loeffen R, Godschalk TC, van Oerle R, et al. The hypercoagulable profile of patients with stent thrombosis. *Heart*. 2015; 101: 1126–1132.

36. Напалкова О.С., Эмануэль В.Л., Карпенко М.А. и др. Оценка риска повторной операции реваскуляризации миокарда с помощью теста генерации тромбина. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2016. С. 65–71.

37. Melnichnikova O, Simakova M, Moiseeva O, et al. The dynamics of thrombin formation in patients with pulmonary arterial hypertension. *Thromb Res*. 2021; 208: 230–232.

38. Carcaillon L, Alhenc-Gelas M, Bejot Y, et al. Increased thrombin generation is associated with acute ischemic stroke but not with coronary heart disease in the elderly: the Three-City cohort study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31: 1445–1451.

39. Ay C, Dunkler D, Simanek R, et al. Prediction of venous thromboembolism in patients with cancer by measuring thrombin generation: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 2099–2103.

40. Chistolini A, Ruberto F, Alessandri F, et al. Effect of low or high doses of low-molecular-weight heparin on thrombin generation and other haemostasis parameters in critically ill patients with COVID-19. *Br J Haematol*. 2020; 190: e214–e218.

41. van de Berg TW, Hulshof A-MM, Nagy M, et al. Suggestions for global coagulation assays for the assessment of COVID-19 associated hypercoagulability. *Thromb Res*. 2021; 201: 84–89.

42. de la Morena-Barrio ME, Bravo-Pérez C, Miñano A, et al. Prognostic value of thrombin generation parameters in hospitalized COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2021; 11: 7792.

43. Billoir P, Alexandre K, Duflo T, et al. Investigation of Coagulation Biomarkers to Assess Clinical Deterioration in SARS-CoV-2 Infection. *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8: 670694.

44. Bouck EG, Denorme F, Holle LA, et al. COVID-19 and Sepsis Are Associated With Different Abnormalities in Plasma Procoagulant and Fibrinolytic Activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021; 41: 401–414.

45. Hardy M, Lecompte T, Douxfils J, et al. Management of the thrombotic risk associated with COVID-19: guidance for the hemostasis laboratory. *Thrombosis Journal*. 2020; 18: 17.

46. Benati M, Salvagno GL, Nitto SD, et al. Thrombin Generation in Patients with Coronavirus Disease 2019. *Semin Thromb Hemost*. 2021; 47: 447–450.

47. von Meijenfeldt FA, Havervall S, Adelmeijer J, et al. Prothrombotic changes in patients with COVID-19 are associated with disease severity and mortality. *Res Pract Thromb Haemost*. 2021; 5: 132–141.

Информация об авторах:

Мельничникова Ольга Сергеевна, к.м.н., старший научный сотрудник НИГ кардиоонкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Жиленкова Юлия Исмаиловна, к.м.н., доцент кафедры лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Золотова Екатерина Алексеевна, младший научный сотрудник НИГ кардиоонкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Пищулов Константин Анатольевич, младший научный сотрудник НИГ кардиоонкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Сироткина Ольга Васильевна, д.б.н., главный научный сотрудник НИГ кардиоонкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины», профес-

сор кафедры лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Симакова Мария Александровна, к.м.н., старший научный сотрудник НИГ кардиоонкологии НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

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

Author information:

Melnichnikova Olga S., PhD, Senior Researcher, Research Group of Cardio-Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Zhilenkova Yulia I., PhD., Assistant Professor, Laboratory Medicine and Genetics Department, Almazov National Medical Research Centre;

Zolotova Ekaterina A., Junior Researcher, Research Group of Cardio-Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Pishchulov Konstantin A., Junior Researcher, Research Group of Cardio-Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Sirotkina Olga V., D.Sc., Chief Researcher, Research Group of Cardio-oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, professor of Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Simakova Maria A., PhD., Head, Senior Researcher, Research Group of Cardio-Oncology, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Vavilova Tatiana V., MD, D.Sc., Head, Laboratory Medicine and Genetics Department, Almazov National Medical Research Centre.

