

ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Денис Ребриков, д. б. н., профессор

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА Александр Эттингер, д. м. н., профессор

РЕДАКТОРЫ Валентина Гейдебрект, Лилия Егорова

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР Нина Тюрина

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова, Вячеслав Витюк

ДИЗАЙН И ВЕРСТКА Марина Доронина

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. И. Аверин, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)
Н. Н. Алипов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Р. Богомилский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. К. Божено, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)
Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)
Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)
Г. Е. Гендлин, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)
Л. Р. Горбачева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
И. Г. Гордеев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)
Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Т. В. Зарубина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Е. Каган, профессор (Питтсбург, США)
Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)
Б. А. Кобринский, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. В. Козлов, MD PhD (Вена, Австрия)
Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)
М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)
Н. Е. Мантурова, д. м. н. (Москва, Россия)
О. Ю. Милушкина, д. м. н., доцент (Москва, Россия)
З. Б. Митупов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)
А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)
Ю. П. Пивоваров, д. м. н., академик РАН, профессор (Москва, Россия)
А. Г. Платонова, д. м. н. (Киев, Украина)
Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. Ю. Разумовский, член-корр., профессор (Москва, Россия)
О. Ю. Реброва, д. м. н. (Москва, Россия)
А. С. Рудой, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)
А. К. Рылова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
Н. А. Скоблина, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. М. Смирнов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
А. Спаллоне, д. м. н., профессор (Рим, Италия)
В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)
С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Х. П. Тахчиди, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Л. Филипенко, к. б. н. (Новосибирск, Россия)
Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)
М. А. Чундокова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Л. Н. Шишкина, д. б. н. (Новосибирск, Россия)
Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ <http://vestnikrgmu.ru/login>

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@vestnikrgmu.ru

АДРЕС РЕДАКЦИИ ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2018: 0,16

Журнал включен в WoS. JCR 2018: 0,13

Индекс Хирша (h²) журнала по оценке Google Scholar: 3

Scopus®

WEB OF SCIENCE™

Google
scholar

Журнал включен в РИНЦ. IF 2017: 0,326

Журнал включен в Перечень 27.01.2016 (№ 1760)

Здесь находится открытый архив журнала

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2019-03

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Учредитель и издатель — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International www.creativecommons.org

© Фото кенгуру: Kiukyvsrquar



Подписано в печать 30.06.2019
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии PrintFormula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc, professor

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Alexander Oettinger, DSc, professor

EDITORS Valentina Geidebrekht, Liliya Egorova

TECHNICAL EDITOR Nina Tyurina

TRANSLATORS Ekaterina Tretiyakova, Vyacheslav Vityuk

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

Averin VI, DSc, professor (Minsk, Belarus)
Alipov NN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bogomilskiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)
Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)
Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)
Gendlin GYe, DSc, professor (Moscow, Russia)
Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)
Gorbacheva LR, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gordeev IG, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)
Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Zarubina TV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Kagan VE, professor (Pittsburgh, USA)
Kzyzhkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)
Kobriniskii BA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Kozlov AV, MD PhD, (Vienna, Austria)
Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)
Lebedev MA, PhD (Darem, USA)
Manturova NE, DSc (Moscow, Russia)
Milushkina OYu, DSc, professor (Moscow, Russia)
Mitupov ZB, DSc, professor (Moscow, Russia)
Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)
Pivovarov YuP, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Platonova AG, DSc (Kiev, Ukraine)
Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Razumovskii AYU, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Rebrova OYu, DSc (Moscow, Russia)
Rudoy AS, DSc, professor (Minsk, Belarus)
Rylova AK, DSc, professor (Moscow, Russia)
Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Skobolina NA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Smirnov VM, DSc, professor (Moscow, Russia)
Spallone A, DSc, professor (Rome, Italy)
Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)
Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Takhchidi KhP, corr. member of RAS, DSc (medicine), professor (Moscow, Russia)
Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)
Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)
Khazipov RN, DSc (Marsel, France)
Chundukova MA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Shimanovskii NL, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)
Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

SUBMISSION <http://vestnikrgmu.ru/login?lang=en>

CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

ADDRESS ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997

Indexed in Scopus. CiteScore 2018: 0.16

Scopus®

Indexed in WoS. JCR 2018: 0.13

WEB OF SCIENCE™

Five-year h-index is 3

Google
scholar

Indexed in RSCI. IF 2017: 0.326

НАУЧНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ
БИБЛИОТЕКА
LIBRARY.RU

Listed in HAC 27.01.2016 (no. 1760)



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Open access to archive

CYBERLENINKA

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2019-03

The mass media registration certificate no. 012769 issued on July 29, 1994

Founder and publisher is Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License www.creativecommons.org

© Photo kangaroo: Kiukyvsruar



Approved for print 30.06.2019
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОБЗОР	5
<hr/>	
Неинвазивный пренатальный молекулярный скрининг: особенности внедрения в клиническую практику Д. О. Коростин, Д. А. Плахина, В. А. Белова Noninvasive prenatal testing: the aspects of its introduction into clinical practice Korostin DO, Plakhina DA, Belova VA	
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ	16
<hr/>	
Детекция хромосомных перестроек в коротком плече 4-й и 12-й хромосом как пример полногеномного подхода при проведении неинвазивного ДНК-скрининга А. Ю. Гольцов, И. С. Мукосей, Т. О. Кочеткова, Е. Шубина, М. В. Кузнецова, О. К. Ступко, И. Ю. Барков, Д. В. Ребриков, Д. Ю. Трофимов Detection of chromosomal rearrangements in the short arms of chromosomes 4 and 12 as an example of a whole-genome approach to noninvasive prenatal testing Goltsov AYu, Mukosey IS, Kochetkova TO, Shubina J, Kuznetsova MV, Stupko OK, Barkov IYu, Rebrikov DV, Trofimov DYU	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	20
<hr/>	
Исследование токсичности ¹³ C-меченых линолевой и линоленовой кислот, предназначенных для проведения диагностических дыхательных тестов Я. Я. Тынью, Г. В. Морозова, Ю. К. Бирюкова, Е. В. Трубникова, М. В. Зылькова, Д. А. Сивохин, К. П. Иванов, Н. В. Позднякова, Е. А. Казакова, Е. С. Мутных, А. Б. Шевелев Toxicity of ¹³ C-labeled linoleic and linolenic acids for diagnostic breath tests Tynio YaYa, Morozova GV, Biryukova YuK, Trubnikova EV, Zylkova MV, Sivokhin DA, Ivanov KP, Pozdnyakova NV, Kazakova EA, Mutnykh ES, Shevelev AB	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	27
<hr/>	
Методы измерения концентрации ДНК: совпадение относительных величин и различия абсолютных О. П. Балановский, Ж. А. Карагезева, М. В. Олькова Methods for DNA quantification yield similar relative but different absolute values Balanovsky OP, Kagazheva ZhA, Olkova MV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	34
<hr/>	
Определение эмоционального состояния сверточной нейронной сетью по данным электроэнцефалографии В. Б. Савинов, С. А. Ботман, В. В. Сапунов, В. А. Петров, И. Г. Самусев, Н. Н. Шушарина Electroencephalogram-based emotion recognition using a convolutional neural network Savinov VB, Botman SA, Sapunov VV, Petrov VA, Samusev IG, Shusharina NN	
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ	39
<hr/>	
Случай применения комплексного способа лечения декубитальной язвы у пациента в хроническом критическом состоянии А. В. Яковлева, А. А. Яковлев, М. В. Петрова, К. Ю. Крылов Complex decubitus ulcer therapy in a patient in chronic critical condition: a case report Yakovleva AV, Yakovlev AA, Petrova MV, Krylov KYu	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	44
<hr/>	
Актуальные вопросы организации медицинской реабилитации пациентов, перенесших транзиторную ишемическую атаку Е. В. Костенко, М. А. Эннеева, В. Г. Кравченко Problems of medical rehabilitation in patients after a transient ischemic attack Kostenko EV, Eneeva MA, Kravchenko VG	

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

50

Динамика секреторного IgA у больных хроническим генерализованным пародонтитом средней тяжести

Т. И. Сашкина, Г. С. Рунова, А. И. Абдуллаева, А. Ю. Божedomов, И. В. Салдусова, О. В. Зайченко, Д. К. Фасхутдинов, С. И. Соколова

Dynamics of secretory IgA in patients with generalized chronic periodontitis

Sashkina TI, Runova GS, Abdullaeva AI, Bozhedomov AY, Saldusova IV, Zaychenko OV, Faskhutdinov DK, Sokolova SI

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

54

Гипогравитация как фактор риска повышения уровня внутриглазного давления

М. А. Валях, Д. В. Кац, Н. Г. Глазко, М. В. Баранов

Hypogravity as a risk factor for increased intraocular pressure

Valyakh MA, Kats DV, Glazko NG, Baranov MV

МЕТОД

58

Бионический глаз: возможности эпиретинальной протезной системы Argus II в зрительной и социальной реабилитации слепых пациентов с терминальной стадией пигментного ретинита

Х. П. Тахчиди, Г. Ф. Качалина, Н. Х. Тахчиди, Р. А. Маноян, П. В. Глизница

A bionic eye: performance of the Argus II retinal prosthesis in low-vision and social rehabilitation of patients with end-stage retinitis pigmentosa

Takhchidi KhP, Kachalina GF, Takhchidi NK, Manoyan RA, Gliznitsa PV

НЕИНВАЗИВНЫЙ ПРЕНАТАЛЬНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СКРИНИНГ: ОСОБЕННОСТИ ВНЕДРЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ

Д. О. Коростин^{1,2} ✉, Д. А. Плахина², В. А. Белова^{1,2}

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² ООО «Генотек», Москва, Россия

Развитие пренатального молекулярного скрининга анеуплоидий плода, основанного на анализе внеклеточной ДНК, циркулирующей в крови беременной, происходит бурно, особенно в последние 2–3 года. В обзоре представлены возможности и ограничения использования этой методики в клинической практике, а также причины ложноположительных и ложноотрицательных результатов скрининга. Описаны принципы, лежащие в основе технологий как получения, так и анализа данных. Рассмотрены мнения профессиональных сообществ, а также особенности законодательного регулирования применения неинвазивного пренатального скрининга (НИПС) в клинической практике в странах, где уровень использования НИПС существенно превышает отечественный.

Ключевые слова: NIPT, НИПС, пренатальный скрининг, анеуплоидии плода, внеклеточная ДНК

Благодарности: авторы очень признательны сотруднице ФГБУ «НМИЦ АГП имени В. И. Кулакова» Екатерине Шубиной за ценные замечания и рекомендации, которые она давала в ходе подготовки обзора.

Информация о вкладе авторов: Д. О. Коростин — идея и план публикации, общее руководство подготовкой публикации; Д. А. Плахина — подготовка разделов о вндНК и о законодательстве, редактирование рукописи; В. А. Белова — подготовка разделов о НИПС с помощью MPS, подготовка раздела о законодательстве, редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Олегович Коростин
Наставнический переулок, д. 17, к. 1, г. Москва, 105120; d.korostin@gmail.com

Статья получена: 05.10.2018 **Статья принята к печати:** 10.05.2019 **Опубликована онлайн:** 22.05.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.036

NONINVASIVE PRENATAL TESTING: THE ASPECTS OF ITS INTRODUCTION INTO CLINICAL PRACTICE

Korostin DO^{1,2} ✉, Plakhina DA², Belova VA^{1,2}

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Genotek Ltd., Moscow, Russia

The last couple of years have witnessed the rapid development of prenatal molecular-based screening for fetal aneuploidies that utilizes the analysis of cell-free DNA circulating in the bloodstream of a pregnant woman. The present review looks at the potential and limitations of such testing and the possible causes of false-positive and false-negative results. The review also describes the underlying principles of data acquisition and analysis the testing involves. In addition, we talk about the opinions held by the expert community and some aspects of legislation on the use of noninvasive prenatal testing (NIPT) in clinical practice in the countries where NIPT is much more widespread than in Russia.

Keywords: NIPT, NIPS, prenatal screening, fetal aneuploidy, cell-free DNA

Acknowledgment: the authors are grateful for Ekaterina Shubina of Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology for her valuable feedback.

Author contribution: Korostin DO conceived the review and supervised manuscript preparation; Plakhina DA wrote the sections about cell-free DNA and the regulatory legislation and helped to revise the manuscript; Belova VA wrote the sections about MPS-aided NIPT and the regulatory legislation and helped to revise the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry O. Korostin
Nastavnichesky per. 17, str. 1, Moscow, 105120; d.korostin@gmail.com

Received: 05.10.2018 **Accepted:** 10.05.2019 **Published online:** 22.05.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.036

Анеуплоидии хромосом генома плода являются одной из основных (35%) причин спонтанных выкидышей [1] и возникают с частотой до 0,3% всех случаев рождения детей [2, 3]. Наиболее часто у новорожденных встречаются трисомии по 13-й, 18-й, 21-й X-хромосомам и кариотип XXУ.

Среди анеуплоидий плода наиболее распространен синдром Дауна (СД), он встречается с частотой 1 случай на 800 рождений [4]. Известно, что риск анеуплоидии коррелирует с возрастом матери, причем с 34 лет кривая риска приобретает экспоненциальный характер, приближаясь к частоте 1 случай на 35 родов у женщин старше 40 лет [5].

До 1980-х гг. возраст матери был единственным надежным критерием оценки риска наличия анеуплоидии, поэтому всем беременным старше 35 лет рекомендовали пройти инвазивные диагностические тесты, достоверно

определяющие кариотип плода. Показанием для проведения инвазивной диагностики у более молодых беременных была лишь семейная история [6].

Сегодня наиболее совершенным скринингом считают комбинированный тест или скрининг 1-го триместра, представленный в 1997 г. [7]. Его чувствительность достигает 90% для СД с 5% ложноположительных результатов [8].

Для диагностирования наследственных патологий плода применяют только подходы, основанные на прямом анализе клеток плода, полученных из ворсин хориона или амниотической жидкости — инвазивная диагностика (ИД). Полученный биоматериал анализируют с помощью ряда методов: QF-PCR, MLPA, G-banding, FISH, молекулярного кариотипирования [9].

Происхождение внеклеточной фетальной ДНК

Внеклеточная фетальная ДНК (фДНК) преодолевает плацентарный барьер и циркулирует в кровотоке матери [10]. Современными методами фДНК может быть обнаружена в плазме крови матери, начиная с 4-й недели беременности; ее содержание возрастает на протяжении всего гестационного периода, достигая максимального пика в последние 8 недель, и резко снижается почти до нуля в первые часы после родоразрешения [11–15]. В кровь фДНК попадает в результате апоптоза клеток трофобласта плаценты [16]. Подтверждением этому служит обнаружение фДНК в случаях анэмбрионической беременности, при которой отсутствует плод и присутствует только плацентарная ткань [17], а также в случаях мейотического плацентарного мозаицизма (ПМ).

Явление ПМ (различие кариотипа плода и плаценты) наблюдается у 0,6–1% пациентов, прошедших ИД [18]. По происхождению ПМ делят на митотический и мейотический типы. В первом случае у диплоидной зиготы в одном из делений клеток плаценты происходит нарушение расхождения хромосом, что приводит к возникновению анеуплоидной клеточной линии и явлению ограниченного ПМ. Ограниченный ПМ, как правило, локализован в определенном регионе плаценты и цитогенетически может быть определен как «мозаицизм низкого уровня». Мейотический ПМ происходит из изначально трисомной зиготы, в которой осуществляется «спасение» хромосомы за счет потери одной из ее копий на ранних этапах развития плода. Таким образом, плод может иметь нормальный кариотип при частично или абсолютно анеуплоидной плаценте и наоборот.

Характеристики фДНК

В крови матери вкДНК находится в виде фрагментов. Фрагменты материнской вкДНК преимущественно имеют длину 166 п.о., а фрагменты фДНК — 143 п.о. [19]. Такое распределение связано с неслучайной нарезкой ДНК [20]. Деградация ДНК происходит под воздействием различных ферментов и зависит от доступности участков молекулы ДНК для них. Нуклеосомы, формирующие первичный уровень компактизации ДНК в виде ее намотки на «шайбы» из гистонов, расположены на расстоянии в среднем 20 п.о. друг от друга. Наиболее доступным для нуклеаз оказывается как раз этот связывающий нуклеосомы линкерный участок. Тогда фрагменты фДНК размером 143 п.о. соответствуют длине витка ДНК вокруг нуклеосомы без линкеров с двух сторон, а фрагменты материнской вкДНК размером 166 п.о. соответствуют длине витка ДНК с «необрезанным» линкером. Неслучайная нарезка может быть связана с наличием разных форм гистона H1 в нуклеосомах разного происхождения — плацентарного и гематопоэтического. Основная функция гистона H1 — связывание с линкером; такого связывания, видимо, не происходит в случае с фДНК, и линкер обрезается [19, 21].

«Пилообразный» профиль распределения фрагментов меньшей длины, где каждый пик отстает от другого на ~10 п.о., по-видимому, свидетельствует о том, что вкДНК подвергается дальнейшему нуклеазному расщеплению в апоптотических тельцах в районе каждого 10-го нуклеотида, непосредственно прикрепленного к гистонам [19, 22]. При анализе длин коротких прочтений, картированных на митохондриальный геном, который не связан с гистонами, подобного распределения длин фрагментов не наблюдается.

Установлено, что участки генома плода (и плаценты) могут быть гипо- или гиперметилированы отлично от материнских ввиду эпигенетических межтканевых различий [23, 24]. Есть гипотеза [25], что более доступными для разрезания оказываются неметилированные участки ДНК. Материнская вкДНК гиперметилирована, что приводит к более плотной намотке ДНК на гистоны, к повышению компактности и стабильности нуклеосом и увеличению средней длины фрагментов вкДНК в отличие от фДНК.

НИПС с помощью MPS

Потенциальными мишенями для проведения исследований генома плода в крови матери могут быть фетальные клетки, внеклеточная фетальная РНК (вкРНК) и фДНК. Благодаря ряду преимуществ, на анализе фДНК сегодня основаны методы неинвазивного пренатального молекулярного скрининга (НИПС).

Доля фДНК составляет в среднем 10% всей вкДНК в актуальный для анализа период гестации, что превышает долю фетальных клеток в крови матери на 3–4 порядка.

Влияние материнского микрохимеризма, как правило, несущественно по сравнению с долей фетальной ДНК; вкДНК стабильна по сравнению с вкРНК, а методы ее анализа демонстрируют более высокую воспроизводимость в разных лабораториях.

НИПС представляет собой статистическое исследование, основная цель которого — оценить долю представленности каждой из хромосом в исследуемом образце. В норме на каждую из хромосом генома небеременной женщины будет приходиться пропорциональное ее длине количество коротких прочтений (ридов). Если женщина беременна ребенком с нормальным кариотипом, картина не изменится. Но если у ребенка имеется трисомия, например по 21-й хромосоме, то ее доля по отношению к другим хромосомам вырастет. Длина 21-й хромосомы составляет примерно 1,5% генома. Если доля фДНК у образца 10%, то дополнительная фетальная 21-я хромосома повысит представленность примерно на 0,08%. Чтобы оценить достоверность полученных результатов, используют различные статистические методики оценки. Наиболее распространена методика Z-критерия Фишера. С помощью Z-теста проверяют, не является ли увеличение покрытия хромосомы случайным, для чего сравнивают ее значение с математическим ожиданием покрытия с учетом его стандартной ошибки. Расчет Z проводят по следующей формуле:

$$Z = (x - \mu) / \delta,$$

где для некоторой хромосомы A x — это число ридов, картированных на нее в анализируемом образце; μ — среднее значение числа ридов, относящихся к A, полученных от анализа референсных образцов (нормальный контроль); δ — стандартное отклонение. Результирующее значение Z-теста > 3 считают признаком трисомии, значение < -3 указывает на моносомию, а значения в диапазоне от -3 до 3 — на нормальный кариотип [26].

Математическое ожидание вычисляют с помощью проведенного заранее анализа выборки образцов вкДНК с известным диагнозом у ребенка.

Отметим еще раз, что физически вкДНК матери не отделяют от вкДНК плода, а исследуют совокупную вкДНК. Поэтому в случае многоплодной беременности НИПС может определить наличие анеуплоидии у одного из близнецов, но не укажет на ребенка с патологией.

Важным критерием, влияющим на НИПС, является доля фетальной вкДНК. Чем она больше, тем большее значение Z покажет анализ в случае анеуплоидии. Необходимый минимум содержания фетальной фракции для проведения НИПС оценивают в 4% [27–29].

Существует множество способов оценки доли фДНК. Их объединяет принцип поиска значимых отличий фетальной фракции вкДНК от материнской. Наиболее очевидна оценка по доле Y-хромосомы, значение которой составляет половину значения фДНК. Этот подход применим только в случае вынашивания мальчика.

Универсальна и широко употребляема оценка по SNP. Идея проста: необходимо найти такие полиморфизмы, по которым мать и ребенок будут иметь разные генотипы (мать — гомозигота, а ребенок — гетерозигота за счет отцовского аллеля). Регионы с полиморфизмами необходимо многократно прочитать, а затем оценить количество ридов, пришедшее на отцовский аллель [30–32]. Умножив на 2 долю ридов, получим долю фДНК. Подбор SNP осуществляют по следующим критериям:

- имеют частоту минорного аллеля (minor allele frequency, MAF), близкую к 50%;
- входят в разные группы сцепления;
- не подвергаются отбору.

В пределе, увеличивая количество анализируемых SNP, можно определять анеуплоидии, сравнивая долю покрытия фетальных и материнских хромосом по соотношению ридов соответствующих SNP. Подобным образом поступила компания *Natera*, НИПС у которой основан на анализе почти 20 000 SNP [33].

Было показано, что оценка доли участков с дифференциальным уровнем метилирования среди результатов анализа внеклеточного метилома позволяет надежно оценивать долю фДНК [34].

Так как распределение длин плодных и материнских молекул вкДНК неодинаково, определять долю фетальной вкДНК можно, базирясь на соотношении между количеством фрагментов в диапазоне от 100 до 150 п.о. и от 163 до 169 п.о., соответствующих фетальной фракции и материнской [35]. Технически такой подход эффективен при использовании pair-end чтений в процессе секвенирования [36].

Еще один метод оценки доли фетальной ДНК по «нуклеосомному треку» находится в разработке. Идея метода поддерживается тем фактом, что фетальная ДНК фрагментирована не случайным образом, а в соответствии с упаковкой нуклеосом, как было указано выше [37].

Для оценки доли фетальной ДНК стали активно привлекать нейронные сети. Имея достаточно большие обучающие выборки (тысячи образцов с известной долей фДНК), можно добиться достоверной оценки доли по определенной совокупности параметров секвенирования [38].

Возможности НИПС

В большинстве случаев НИПС используют для поиска анеуплоидий хромосом, однако технически возможности MPS позволяют определять и другие нарушения в геноме.

Секвенирование генома с низким и сверхнизким (менее $\times 1,0$) покрытием не позволяет обнаруживать точечные мутации, однако вполне применимо для поиска делеций и дупликаций [39]. Именно таким образом проводят пренатальный генетический скрининг методами высокопроизводительного секвенирования [40]. Разрешающая способность данных НИПС в большинстве

случаев недостаточна для поиска среднего размера делеций и дупликаций (до 5 млн п.о.), что можно решить увеличением количества получаемых данных на каждый образец [41–44]. Этот подход ведет к существенному увеличению себестоимости НИПС. Несколько менее эффективными оказываются более сложные способы биоинформатической обработки данных секвенирования [45, 46]. Однако благодаря ряду технологий обогащения библиотек геномной ДНК можно значительно повысить долю данных секвенирования, приходящихся на интересные регионы. Например, в тесте *Panorama* [47] используют процедуру обогащения генома примерно до 20 000 локусов, имеющих более плотное расположение в областях микроделеционных синдромов. Благодаря такому подходу, по мнению разработчиков, удастся выявлять микроделеции с точностью 97,8% и выше [48].

С момента открытия фДНК были разработаны подходы для диагностики генетических нарушений у плода. Первые среди них, способы определения пола ребенка [49] и его резус-статуса [50], основаны на поиске нехарактерных для материнского генома последовательностей с помощью различных ПЦР (qPCR, ddPCR, QF-PCR). В дальнейшем разработка методик диагностики признаков, наследуемых от отца, стала носить рутинный характер: появились STR-маркеры X-хромосомы, унаследованной от отца [51], а также маркеры аутосомно-доминантных заболеваний, например хореи Гентингтона [52] и миотонической дистрофии [53]. Однако большинство моногенных заболеваний аутосомно-рецессивны и развиваются при наличии мутаций в обеих копиях гена. Поэтому на сегодняшний день используют три секвенирования: секвенируют геномную ДНК матери и отца, чтобы определить гаплотипы, а также в каком из них локализованы интересные мутации, а затем секвенируют вкДНК, в которой уже по маркерам гаплотипов определяют, какие конкретно хромосомы унаследовал развивающийся ребенок [54].

Метилонный анализ внеклеточного генома плода показал наличие паттерна метилирования, по которому можно определить анеуплоидию [55, 56]. Также выявлено, что метилом плаценты (а ведь в НИПС анализируют именно его) динамичен, паттерн метилирования может меняться в зависимости от клинического состояния плода и матери. Так, метилонный анализ вкДНК может послужить методом диагностики преэклампсии [57–59].

Несмотря на сложности в работе с внРНК (контаминация неинформативной рРНК, плохая сохранность в биоматериале, более низкая воспроизводимость результатов по сравнению с вкДНК), показано, что изменение экспрессии некоторых транскриптов в фетальном транскриптоме может служить хорошим маркером развития той же преэклампсии еще до проявления клинических симптомов болезни [60].

Валидация НИПС

Несмотря на возможности НИПС, методика должна была пройти ряд клинических испытаний, которые докажут ее эффективность.

В 2014 г. на выборке 1914 беременных из 21 медицинского центра США было показано, что частота ложноположительных результатов НИПС по сравнению со стандартным биохимическим скринингом была существенно ниже (0,3% против 3,6% при $p < 0,001$ — для T21 и 0,2% против 0,6% при $p < 0,03$ — для T18). Стоит отметить, что для 0,9% пациентов получить результаты НИПС не удалось [61].

В 2015 г. было опубликовано обширное исследование по сравнению эффективности НИПС с традиционными методиками [62], проводимое в 35 медицинских центрах на выборке из 15 841 беременной. Для T21 с помощью НИПС удалось обнаружить все случаи (38) истинной анеуплоидии, а у 9 пациенток результат оказался ложноположительным. Таким образом, DR для T21 составила 100%, FPR — 0,06%, PPV — 80,9% (значения стандартного скрининга на этой выборке составили 78,9%, 5,4%, 3,4% соответственно). По T13 и T18 результаты НИПС также оказались существенно лучше стандартного скрининга. Таким образом, НИПС можно использовать для выявления трисомий у плода, так как он имеет более высокое разрешение и точность по сравнению с традиционными подходами.

Причины ложных результатов НИПС

НИПС имеет ряд ограничений, которые могут приводить к ошибочным результатам.

Вес матери и срок гестации

Количество фДНК находится в прямой зависимости от срока гестации и в обратной — от ИМТ беременной. Именно низкая доля фДНК на сроках менее 9–10 недель беременности не позволяет получать надежные результаты НИПС. Для женщин с высоким ИМТ проведение НИПС также может оказаться неэффективным, так как вероятность ложного результата будет высокой [15, 63] без оценки доли фДНК.

Плацентарный мозаицизм

Для исключения вероятности наличия ПМ наиболее предпочтительным способом забора материала для инвазивной диагностики после положительного НИПС является амниоцентез. Биопсия ворсин хориона может быть непоказательна, так как ДНК в них имеет такое же плацентарное происхождение, как и фДНК [64–67]. Явление ПМ — еще один признак необходимости подтверждения диагноза, обнаруженного НИПС, инвазивным способом. Решение о прерывании беременности на основании только результатов НИПС принимать категорически нельзя (см. раздел ниже).

Близнецы

НИПС может быть использован для анализа анеуплоидий и при двуплодных беременностях, однако тест не позволяет определить, какой из близнецов имеет анеуплоидию, это необходимо делать с помощью инвазивной диагностики обоих детей. Несмотря на повышенную долю общей фДНК по сравнению с одноплодными беременностями [68] и возможность ее оценки для каждого из близнецов, точность теста снижается по сравнению с одноплодными беременностями [69].

Среди многоплодных беременностей встречается явление исчезающего близнеца, при котором развитие одного из плодов замирает в первом триместре беременности. Показано, что частота анеуплоидий среди исчезающих близнецов существенно выше, чем при нормальном развитии обоих плодов. Так как НИПС анализирует всю вкДНК и в большинстве случаев не позволяет определять наличие дополнительных гаплотипов в образцах, исчезающий близнец может и влиять на ложноположительный результат, когда сам является

анеуплоидом, и маскировать анеуплоидию второго близнеца, приводя к ложноотрицательным результатам НИПС, и мешать корректному определению пола ребенка. Согласно оценке более 30 000 НИПС, частота встречаемости исчезающих близнецов с анеуплоидиями составляет 0,11% среди всей выборки [70]. Эти данные близки к значению ложноположительных результатов, полученных в ходе крупного метаанализа публикаций, посвященных НИПС [71]. Чтобы избежать ошибок при НИПС, связанных с исчезающим близнецом, стоит уделять более пристальное внимание УЗИ-исследованию, проводимому в I триместре, в котором можно обнаружить второй плод.

CNV у родителей

По некоторым данным, причиной 17% ложноположительных результатов НИПС были CNV в материнских клетках на соответствующих хромосомах размером от 0,5 млн до 14 млн п.о. [72].

Мозаицизм у родителей также может стать причиной ложных результатов НИПС, как и отмеченный ранее ПМ. Например, частота моносомии по X прямо коррелирует с возрастом женщины [74], и было показано, что 16% обнаруженных с помощью НИПС анеуплоидий плода по половым хромосомам на самом деле связаны с нарушениями в кариотипе матери по X-хромосоме [65]. В зависимости от определения нижней границы мозаицизма, частота встречаемости моносомий по X составляет от 1 : 3300 (доля мозаичных клеток выше 34%) [74] до 1 : 300 (доля мозаичных клеток 4% и выше) [75].

Опухоли

Показано, что различные формы онкологических заболеваний беременной приводят к искажению результатов НИПС, так как клеткам опухолей присуща геномная нестабильность, опухоли, как правило, высокоангиогенизированы и выделяют большое количество вкДНК в просвет сосудистого русла [76].

Заблуждение по поводу опасности проведения ИД

В качестве одного из аргументов, приводимых за более активное внедрение НИПС в клиническую практику, компании — производители услуг НИПС называют опасность осложнений (включая потерю плода), возникающих при проведении процедуры забора биоматериала: оба подхода забора биоматериала ребенка примерно в 1% случаев приводят к потере беременности [4, 77, 78]. Однако другие авторы приводят более низкие значения потери: для ИД 1 : 200 для забора ворсин хориона и 1 : 300 для амниоцентеза [79, 80]. Эти значения ниже, чем в случаях самопроизвольного прерывания беременности [81].

Законодательство и рекомендации для НИПС

На сегодняшний день во многих странах главенствуют две модели внедрения НИПС в клиническую практику.

1. Контингентная: тест назначают женщинам из группы риска по результатам скрининга, проводимого в I триместре. Такой подход позволяет субсидировать оплату части или всей стоимости НИПС из государственного бюджета.

2. Коммерческая: тест предлагают проходить беременным, имеющим финансовые (собственные или за счет медицинской страховки) ресурсы для его оплаты.

В Нидерландах и Дании кроме того проводят широкомасштабные исследования применимости НИПС — TRIDENT-2 (<http://www.meeroverniet.nl>), в рамках которых беременным предлагают пройти НИПС вместо скрининга в I триместре.

Ниже рассмотрены примеры использования и регулирования НИПС в некоторых странах.

Великобритания

Ежегодно в этой стране регистрируют 800 000 случаев беременностей. В стране действует Национальный скрининговый комитет [82], который в январе 2016 г. опубликовал рекомендации по инкорпорированию НИПС в существующую программу выявления аномалий развития плода [83]. Согласно этому документу, НИПС рекомендуется проводить всем женщинам, имеющим повышенный ($> 1 : 150$) риск анеуплоидий по результатам комбинированного теста, проводимого на 10–14-й неделе беременности. Проведение оценки эффективности методики запланировано на 2018–2019 гг. В случае успеха, расходы на проведение НИПС будут как минимум частично покрываться за счет сокращения числа ИД и высвобождения выделенных на них средств.

Швеция

Ежегодно в этой стране насчитывают 120 000 случаев беременностей. Шведское общество акушеров и гинекологов в июне 2016 г. выпустило руководство [84], в котором рекомендует проводить НИПС всем женщинам, имеющим по результатам комбинированного скрининга промежуточное значение риска анеуплоидий (от $1 : 51$ до $1 : 1000$), а также при ограничениях проведения ИД (инфицирование беременной ВИЧ или гепатитом). С осторожностью необходимо назначать НИПС при многоплодных беременностях. В случае более высокого риска необходимо проведение ИД, более низкого — стандартного мониторинга беременности. Общество не рекомендует проводить НИПС всем беременным по причине недостаточных доказательств эффективности теста для всех групп этой категории пациенток и высокой стоимости исследования.

Франция

Во Франции количество забеременевших женщин достигает около 800 000 человек в год. В 2017 г. Министерство здравоохранения Франции выпустило свои рекомендации [85]. До НИПС система выявления анеуплоидий была основана на стандартах FMF [29]. В случае определения высокого риска ($> 1 : 250$), проводили ИД с последующим кариотипированием. Все процедуры оплачивает система страхования здоровья Франции. Согласно рекомендациям 2017 г., анализ циркулирующей вкДНК рекомендован при проведении скрининга на трисомию по 21-й хромосоме для женщин, имеющих повышенный риск по результатам

комбинированного скрининга, проводимого в I триместре (от $1 : 1000$ до $1 : 51$). Для беременных с риском $1 : 50$ и выше рекомендовано проводить ИД, однако женщины могут выбрать сначала и проведение молекулярного скрининга. Особо отмечено, что НИПС не следует рассматривать как замену ИД. Рекомендуется также разработать систему контроля качества и аккредитации лабораторий, проводящих НИПС. Через 3 года запланирован пересмотр стратегии скрининга, включая вопросы о скрининге на другие анеуплоидии и микроделеции.

США

В США ежегодно регистрируют около 6,35 млн беременностей. Рынок НИПС полностью коммерциализирован и принадлежит нескольким крупным компаниям (табл.) [86].

Оплата НИПС происходит либо за счет страховых компаний, либо из собственных средств пациентов. Государство НИПС не субсидирует.

В настоящее время выпущено четыре актуальных рекомендации:

- Американского общества акушеров и гинекологов (ACOG) в мае 2016 г. [87];
- Международного общества по пренатальной диагностике (ISPD) в апреле 2015 г. [80];
- Национального общества генетических консультантов (NSGC) в октябре 2016 г. [88];
- Американской коллегии по медицинской генетике и геномике (ACMG) [89].

В документе ACMG отмечено, что развитие техник и методик анализа в области НИПС происходит так быстро, что любые клинические указания и директивы устаревают буквально за считанные годы. Как и в вышедших чуть раньше рекомендациях ACOG, в руководстве ACMG указано, что все беременные женщины должны быть соответствующим образом проинформированы о возможности проведения НИПС и его относительных преимуществах перед традиционным скринингом в выявлении анеуплоидий по 13-й, 18-й и 21-й хромосомам. Некоторые специалисты и компании интерпретировали содержимое как рекомендацию по назначению НИПС для всех беременных женщин, независимо от риска, показанного на скрининге в I триместре. Это не соответствует действительности. Фактически ACMG рекомендует информировать всех женщин о наличии НИПС, но только с указанием на соответствующую информационную и директивную поддержку [86]. К сожалению, до сих пор многие независимые врачи недостаточно осведомлены об ограничениях НИПС, некорректно интерпретируют результаты исследований и принимают ошибочные решения. Зная об этом, компании проводят собственные медико-генетические консультирования, к которым у регуляторов есть вопросы, так как врачи, их осуществляющие, могут быть ангажированы.

Отмечено возрастающее число ложноположительных случаев, связанных с определением анеуплоидий по

Таблица. Ведущие компании США, предлагающие коммерческие НИПС

Коммерческое название теста	Компания	Расположение
MaterniT21Plus™	Sequenom, «дочка» LabCorp, Inc.	San Diego, CA
Verifi™	Verinata Health, теперь Illumina	Redwood City, CA
Harmony™	Ariosa Diagnostics	San Jose, CA
Panorama™	Natera	San Carlos, CA

половым хромосомам. В связи с этим указывается на обязательное информирование пациентов об этом, а также о разнообразии исходов для детей с такими анеуплоидиями. Например, кариотип X0 является распространенной причиной потери беременности, с одной стороны, а с другой, женщины с синдромом Шершевского–Тернера имеют достаточно высокое качество жизни.

Особую важность авторы рекомендаций уделяют содержанию заключения по исследованию. Для всех анализируемых типов мутаций (анеуплоидии аутосом, половых хромосом, CNV) должны быть четко прописаны параметры чувствительности, специфичности, PPV и NPV, а также доля фетальной ДНК.

Наиболее частой причиной неудачи проведения НИПС оказывается низкая доля фДНК. Показано, что низкая доля фДНК коррелирует с разными анеуплоидиями плода [62, 72], поэтому в случае неудачи рекомендуется не повторять НИПС, а сразу отправлять беременную на ИД. Комиссия ACMG не рекомендует проводить анализ микроделеций, так как хороших независимых оценок чувствительности и специфичности этого типа НИПС не проведено.

Россия

В России происходит около 1,8 млн беременностей ежегодно. Система скрининга и диагностики генетических аномалий развития плода включает в себя биохимический и УЗИ-скрининг, проводимые в I триместре, по результатам

которых в случае превышения риска 1 : 100 беременная направляется на медико-генетическую консультацию и ИД. Эти процедуры финансируются за счет средств ОМС и региональных бюджетов [90]. В 2016 г. были опубликованы клинические рекомендации по проведению НИПС [91], которые во многом согласуются с описанными выше рекомендациями ACMG.

Внедрение НИПС на российском рынке в значительной мере затруднено. НИПС не имеет официальной сертификации, а практически все оборудование и реагенты, необходимые для проведения MPS, не имеют регистрационных удостоверений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В масштабах страны использование НИПС представляет собой «палку о двух концах»: если слишком поднять значение риска, выше которого следует проводить НИПС, специалисты, проводящие ИД, лишатся львиной доли своей практики, что приведет к снижению их квалификации, и, как следствие, ошибкам ИД (т. е. статистика выявляемости может даже ухудшиться). Если наоборот «распустить» риск вплоть до назначения НИПС всем беременным, статья расходов на этот вид исследований станет очень значительной даже для самых развитых стран. Таким образом, необходимо найти то оптимальное значение риска, при котором соотношение выявляемости анеуплоидий и стоимости их обнаружения окажется оптимальным для государства.

Литература

- Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human molecular genetics*. 2007; 16 (2): 203–8.
- Driscoll DA, Gross S. Prenatal screening for aneuploidy. *New England Journal of Medicine*. 2009; 360 (24): 2556–62.
- Nagaoka SI, Hassold TJ, Hunt PA. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nature Reviews Genetics*. 2012; 13 (7): 493–504.
- Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2011; 204 (3): 205–e1.
- Morris JK, Mutton DE, Alberman E. Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome. *Journal of medical screening*. 2002; 9 (1): 2–6.
- Buckley F, Buckley S. Wrongful deaths and rightful lives-screening for Down syndrome. *Down Syndrome Research and Practice*. 2008; 12 (2): 79–86.
- Wald NJ, Hackshaw AK. Combining ultrasound and biochemistry in first-trimester screening for Down's syndrome. *Prenatal diagnosis*. 1997; 17 (9): 821–9.
- Sillence KA, Madgett TE, Roberts LA, Overton TG, Avent ND. Non-invasive screening tools for Down's syndrome: a review. *Diagnostics*. 2013; 3 (2): 291–314.
- Choy KW, Kwok YK, Cheng YKY, Wong KM, Wong HK, Leung KO, et al. Diagnostic accuracy of the BACs-on-Beads™ assay versus karyotyping for prenatal detection of chromosomal abnormalities: a retrospective consecutive case series. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2014; 121 (10): 1245–52.
- Lo YD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The lancet*. 1997; 350 (9076): 485–7.
- Lo YD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *New England Journal of Medicine*. 1998; 339 (24): 1734–8.
- Farina A, Caramelli E, Concu M, Sekizawa A, Ruggeri R, Bovicelli L, et al. Testing normality of fetal DNA concentration in maternal plasma at 10–12 completed weeks' gestation: a preliminary approach to a new marker for genetic screening. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2002; 22 (2): 148–52.
- Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Human reproduction update*. 2005; 11 (1): 59–67.
- Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenatal diagnosis*. 2013; 33 (7): 662–6.
- Curnow KJ, Gross SJ, Hall MP, Stosic M, Demko Z, Zimmermann B, et al. Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2014; 211 (5): 527–e1.
- Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA. *The American journal of pathology*. 2006; 169 (2): 400–4.
- Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, Soothill PW. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2007; 27 (5): 415–8.
- Gardner RM, Sutherland GR, Shaffer LG. *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. Oxford University Press USA. 2011; (61).
- Lo YD, Chan KA, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Science translational medicine*. 2010; 2 (61): 61ra91–61ra91.
- Ivanov M, Baranova A, Butler T, Spellman P, Mileyko V. Non-random fragmentation patterns in circulating cell-free DNA reflect epigenetic regulation. *BMC genomics*. 2015; 16 (13): S1.

21. Sancho M, Diani E, Beato M, Jordan A. Depletion of human histone H1 variants uncovers specific roles in gene expression and cell growth. *PLoS genetics*. 2008; 4 (10): e1000227.
22. Jiang P, Lo YMD. The long and short of circulating cell-free DNA and the ins and outs of molecular diagnostics. *Trends in Genetics*. 2016; 32 (6): 360–71.
23. Geiman TM, Muegge K. DNA methylation in early development. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 2010; 77 (2): 105–13.
24. Sun K, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015; 112 (40): E5503–E5512.
25. Sun K, Jiang P, Wong AI, Cheng YK, Cheng SH, Zhang H, et al. Size-tagged preferred ends in maternal plasma DNA shed light on the production mechanism and show utility in noninvasive prenatal testing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018; 115 (22): E5106–E5114.
26. Tamminga S, van Maarle M, Henneman L, Oudejans CB, Cornel MC, Siermans EA. Maternal plasma DNA and RNA sequencing for prenatal testing. *Advances in clinical chemistry*. 2016; (74): 63–102.
27. Ashoor G, Poon L, Syngelaki A, Mosimann B, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11–13 weeks' gestation: effect of maternal and fetal factors. *Fetal diagnosis and therapy*. 2012; 31 (4): 237–43.
28. Canick JA, et al. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenatal diagnosis*. 2013; 33 (7): 667–74.
29. Wright D, Syngelaki A, Bradbury I, Akolekar R, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomies 21, 18 and 13 by ultrasound and biochemical testing. *Fetal diagnosis and therapy*. 2014; 35 (2): 118–26.
30. Kim SK, Hannum G, Geis J, Tynan J, Hogg G, Zhao C, et al. Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenatal diagnosis*. 2015; 35 (8): 810–15.
31. Jiang P, Peng X, Su X, Sun K, Stephanie CY, Chu WI, et al. FetalQuant SD: accurate quantification of fetal DNA fraction by shallow-depth sequencing of maternal plasma DNA. *NPJ genomic medicine*. 2016; (1): 16013.
32. Peng XL, Jiang P. Bioinformatics approaches for fetal DNA fraction estimation in noninvasive prenatal testing. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18 (2): 453.
33. Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J, et al. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenatal diagnosis*. 2012; 32 (13): 1233–41.
34. Lun FM, Chiu RW, Sun K, Leung TY, Jiang P, Chan KA, et al. Noninvasive prenatal methylomic analysis by genomewide bisulfite sequencing of maternal plasma DNA. *Clinical chemistry*. DOI: 10.1373/clinchem.2013.212274.
35. Yu SC, et al. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014; 111 (23): 8583–8.
36. Cirigliano V, Ordoñez E, Rueda L, Syngelaki A, Nicolaides KH. Performance of the neoBona test: a new paired-end massively parallel shotgun sequencing approach for cell-free DNA-based aneuploidy screening. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2017; 49 (4): 460–4.
37. Straver R, Oudejans C, Siermans EA, Reinders MJ. Calculating the fetal fraction for noninvasive prenatal testing based on genome-wide nucleosome profiles. *Prenatal diagnosis*. 2016; 36 (7): 614–21.
38. Kim SK, Hannum G, Geis J, Tynan J, Hogg G, Zhao C, Boom D. Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenatal diagnosis*. 2015; 35 (8): 810–5.
39. Chen S, Lau TK, Zhang C, Xu C, Xu Z, Hu P, et al. A method for noninvasive detection of fetal large deletions/duplications by low coverage massively parallel sequencing. *Prenatal diagnosis*. 2013; 33 (6): 584–90.
40. Van den Veyver IB. Recent advances in prenatal genetic screening and testing. *F1000 Research*. 2016; 5 (F1000 Faculty Rev): 2591.
41. Peters D, Chu T, Yatsenko SA, Hendrix N, Hogge WA, Surti U, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of a fetal microdeletion syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2011; 365 (19): 1847–8.
42. Jensen TJ, Dzakula Z, Deciu C, van den Boom D, Ehrich M. Detection of microdeletion 22q11. 2 in a fetus by next-generation sequencing of maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2012; 58 (7): 1148–51.
43. Srinivasan A, Bianchi DW, Huang H, Sehnert AJ, Rava RP. Noninvasive detection of fetal subchromosome abnormalities via deep sequencing of maternal plasma. *The American Journal of Human Genetics*. 2013; 92 (2): 167–76.
44. Lefkowitz RB, Tynan JA, Liu T, Wu Y, Mazloom AR, Almasri E, et al. Clinical validation of a noninvasive prenatal test for genomewide detection of fetal copy number variants. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2016; 215 (2): 227–e1.
45. Straver R, Siermans EA, Holstege H, Visser A, Oudejans CB, Reinders MJ. WISECONDOR: detection of fetal aberrations from shallow sequencing maternal plasma based on a within-sample comparison scheme. *Nucleic acids research*. 2013; 42 (5): e31–e31.
46. Zhao C, Tynan J, Ehrich M, Hannum G, McCullough R, Saldivar JS, Deciu C. Detection of fetal subchromosomal abnormalities by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2015.
47. Nicolaides KH, Syngelaki A, Gil M, Atanasova V, Markova D. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenatal diagnosis*. 2013; 33 (6): 575–9.
48. Wapner RJ, Babiarz JE, Levy B, Stosic M, Zimmermann B, Sigurjonsson S, Hu J. Expanding the scope of noninvasive prenatal testing: detection of fetal microdeletion syndromes. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015; 212 (3): 332–e1.
49. Costa JM, Benachi A, Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346 (19): 1502.
50. Lo YD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *New England Journal of Medicine*. 1998; 339 (24): 1734–8.
51. Tang NL, Leung TN, Zhang J, Lau TK, Lo YD. Detection of fetal-derived paternally inherited X-chromosome polymorphisms in maternal plasma. *Clinical chemistry*. 1999; 45 (11): 2033–5.
52. Bustamante-Aragón A, de Alba MR, Perlado S, Trujillo-Tiebas MJ, Arranz JP, Díaz-Recasens J, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of single-gene disorders from maternal blood. *Gene*. 2012; 504 (1): 144–9.
53. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2000; 46 (2): 301–2.
54. Vermeulen C, Geeven G, de Wit E, Verstegen MJ, Jansen RP, van Kranenburg M, et al. Sensitive monogenic noninvasive prenatal diagnosis by targeted haplotyping. *The American Journal of Human Genetics*. 2017; 101 (3): 326–39.
55. Tong YK, Jin S, Chiu RW, Ding C, Chan KA, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach. *Clinical chemistry*. 2010; 56 (1): 90–8.
56. Tsui DW, Lam YD, Lee WS, Leung TY, Lau TK, Lau ET, et al. Systematic identification of placental epigenetic signatures for the noninvasive prenatal detection of Edwards syndrome. *PloS one*. 2010; 5 (11): e15069.
57. Yuen RK, Penaherrera MS, Von Dadelszen P, McFadden DE, Robinson WP. DNA methylation profiling of human placentas reveals promoter hypomethylation of multiple genes in early-onset preeclampsia. *European Journal of Human Genetics*. 2010; 18 (9): 1006.
58. Blair JD, Yuen RK, Lim BK, McFadden DE, von Dadelszen P, Robinson WP. Widespread DNA hypomethylation at gene enhancer regions in placentas associated with early-onset preeclampsia. *Molecular human reproduction*. 2013; 19 (10): 697–708.
59. Chu T, Bunce K, Shaw P, Shridhar V, Althouse A, Hubel C, et al. Comprehensive analysis of preeclampsia-associated DNA methylation in the placenta. *PLoS One*. 2014; 9 (9): e107318.

60. Hahn S, Rusterholz C, Hösli I, Lapaire O. Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta*. 2011; (32): S17–S20.
61. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *New England journal of medicine*. 2014; 370 (9): 799–808.
62. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Brar H, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *New England Journal of Medicine*. 2015; 372 (17): 1589–97.
63. Wataganara T, Peter I, Messerlian GM, Borgatta L, Bianchi DW. Inverse correlation between maternal weight and second trimester circulating cell-free fetal DNA levels. *Obstetrics & Gynecology*. 2004; 104 (3): 545–50.
64. Румянцев А. Г., Курцер М. А., Мареева Ю. М., Мисюрин А. В., Румянцев С. А., Устюгов А. Ю. Клиническое значение фетального микрохимеризма у матери. *Гены и клетки*. 2012; 7 (2): 103–111.
65. Wang Y, et al. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. *Clinical chemistry*. 2014; 60 (1): 251–9.
66. Bianchi DW. Cherchez la femme: maternal incidental findings can explain discordant prenatal cell-free DNA sequencing results. *Genetics in Medicine*. 2017; DOI: 10.1038/gim.2017.219.
67. Hartwig TS, Ambye L, Sørensen S, Jørgensen FS. Discordant non-invasive prenatal testing (NIPT)—a systematic review. *Prenatal diagnosis*. 2017; 37 (6): 527–39.
68. Attilakos G, Maddocks DG, Davies T, Hunt LP, Avent ND, Soothill PW, et al. Quantification of free fetal DNA in multiple pregnancies and relationship with chorionicity. *Prenatal diagnosis*. 2011; 31 (10): 967–72.
69. Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaides KH, Ordoñez E, Cirigliano V, Dierckx H, et al. Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2015; 45 (1): 61–6.
70. Curnow KJ, Wilkins-Haug L, Ryan A, Kirkizlar E, Stosic M, Hall MP, et al. Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015; 212 (1): 79–e1.
71. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*. 2015; 45 (3): 249–66.
72. Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2015; 45 (5): 530–8.
73. Russell LM, Strike P, Browne CE, Jacobs PA. X chromosome loss and ageing. *Cytogenetic and genome research*. 2007; 116 (3): 181–5.
74. Samango-Sprouse C, Kirkizlar E, Hall MP, Lawson P, Demko Z, Zneimer SM, et al. Incidence of X and Y chromosomal aneuploidy in a large child bearing population. *PloS One*. 2016; 11 (8): e0161045.
75. Shubina J, Trofimov DY, Barkov IY, Stupko OK, Goltsov AY, Mukosey IS, et al. In silico size selection is effective in reducing false positive NIPS cases of monosomy X that are due to maternal mosaic monosomy X. *Prenatal diagnosis*. 2017; 37 (13): 1305–10.
76. Bianchi DW, Chudova D, Sehnert AJ, Bhatt S, Murray K, Prosen TL, et al. Noninvasive prenatal testing and incidental detection of occult maternal malignancies. *Jama*. 2015; 314 (2): 162–9.
77. Ferguson-Smith MA. Placental mRNA in maternal plasma: prospects for fetal screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100 (8): 4360–2.
78. Chiu RW, Cantor CR, Lo YD. Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies. *Trends in genetics*. 2009; 25 (7): 324–31.
79. ACOG Practice Bulletin № 77: screening for fetal chromosomal abnormalities. *Obstet Gynecol*. 2007; (109): 217–27.
80. Benn P, Borrell A, Chiu RW, Cuckle H, Dugoff L, Faas B, et al. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenatal diagnosis*. 2015; 35 (8): 725–34.
81. Кащеева Т. К., Кузнецова Т. В., Баранов В. С. Новые технологии и тенденции развития пренатальной диагностики. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2017; 66 (2): 33–39.
82. UK National Screening Committee. www.gov.uk URL. Available from: <https://www.gov.uk/government/groups/uk-national-screening-committee-uk-nsc> (дата обращения: 20.07.2018).
83. Screening in the UK: making effective recommendations 2015 to 2016. Public Health England hosts the UK National Screening Committee URL. Available from: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/538524/Screening_in_the_UK_making_effective_recommendations_2015_to_2016_180716_final.pdf (дата обращения: 20.07.2018).
84. Analysis of foetal DNA in the woman's blood: non-invasive prenatal testing (NIPT) for trisomy 13, 18 and 21. SFOG Guidelines URL: <http://www.nfog.org/files/guidelines/NIPT%202016%2006%2005%20.pdf> (дата обращения: 20.07.2018).
85. Trisomie 21 : la HAS actualise ses recommandations concernant le dépistage prénatal de la trisomie 21. www.has-sante.fr URL. Available from: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2768535/fr/trisomie-21-la-has-actualise-ses-recommandations-concernant-le-depistage-prenatal-de-la-trisomie-21 (дата обращения: 20.07.2018).
86. Allyse M, Wick MJ. What do the new American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines mean for the provision of non-invasive prenatal genetic screening? *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2017; 37 (6): 795–8.
87. American College of Obstetricians and Gynecologists: Screening for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol*. 2016; 127 (5): e123–137.
88. Prenatal cell-free DNA screening. National Society of Genetic Counselors. Available from: <http://www.nsgc.org/p/bl/et/blogaid=805#.WCTELTNRftw.linkedin>.
89. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, Monaghan KG, Bajaj K, Best RG, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in medicine*. 2016; 18 (10): 1056–65.
90. Информационно-методическое письмо Минздрава РФ от 19.03.2015 № 15-4/607. Доступно по ссылке: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_177689/.
91. Сухих Г. Т., Трофимов Д. Ю., Барков И. Ю., Донников А. Е., Шубина Е. С., Коростин Д. О. и др. Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий плода по крови матери методом высокопроизводительного секвенирования. *Клинические рекомендации. Акушерство и гинекология*. 2016; (6): 3–22.

References

1. Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human molecular genetics*. 2007; 16 (2): 203–8.
2. Driscoll DA, Gross S. Prenatal screening for aneuploidy. *New England Journal of Medicine*. 2009; 360 (24): 2556–62.
3. Nagaoka SI, Hassold TJ, Hunt PA. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nature Reviews Genetics*. 2012; 13 (7): 493–504.
4. Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tyman JA, Cagasan L, Tim R, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2011; 204 (3): 205–e1.
5. Morris JK, Mutton DE, Alberman E. Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome. *Journal of medical screening*. 2002; 9 (1): 2–6.
6. Buckley F, Buckley S. Wrongful deaths and rightful lives-screening for Down syndrome. *Down Syndrome Research and Practice*. 2008; 12 (2): 79–86.
7. Wald NJ, Hackshaw AK. Combining ultrasound and biochemistry in first-trimester screening for Down's syndrome. *Prenatal diagnosis*. 1997; 17 (9): 821–9.
8. Sillence KA, Madgett TE, Roberts LA, Overton TG, Avent ND.

- Non-invasive screening tools for Down's syndrome: a review. *Diagnostics*. 2013; 3 (2): 291–314.
9. Choy KW, Kwok YK, Cheng YKY, Wong KM, Wong HK, Leung KO, et al. Diagnostic accuracy of the BACs-on-Beads™ assay versus karyotyping for prenatal detection of chromosomal abnormalities: a retrospective consecutive case series. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2014; 121 (10): 1245–52.
 10. Lo YD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet*. 1997; 350 (9076): 485–7.
 11. Lo YD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *New England Journal of Medicine*. 1998; 339 (24): 1734–8.
 12. Farina A, Caramelli E, Concu M, Sekizawa A, Ruggeri R, Bovicelli L, et al. Testing normality of fetal DNA concentration in maternal plasma at 10–12 completed weeks' gestation: a preliminary approach to a new marker for genetic screening. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2002; 22 (2): 148–52.
 13. Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Human reproduction update*. 2005; 11 (1): 59–67.
 14. Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenatal diagnosis*. 2013; 33 (7): 662–6.
 15. Curnow KJ, Gross SJ, Hall MP, Stosic M, Demko Z, Zimmermann B, et al. Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2014; 211 (5): 527–e1.
 16. Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA. *The American journal of pathology*. 2006; 169 (2): 400–4.
 17. Alberdy M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, Soothill PW. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*. 2007; 27 (5): 415–8.
 18. Gardner RM, Sutherland GR, Shaffer LG. Chromosome abnormalities and genetic counseling. Oxford University Press USA. 2011; (61).
 19. Lo YD, Chan KA, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Science translational medicine*. 2010; 2 (61): 61ra91–61ra91.
 20. Ivanov M, Baranova A, Butler T, Spellman P, Mileyko V. Non-random fragmentation patterns in circulating cell-free DNA reflect epigenetic regulation. *BMC genomics*. 2015; 16 (13): S1.
 21. Sancho M, Diani E, Beato M, Jordan A. Depletion of human histone H1 variants uncovers specific roles in gene expression and cell growth. *PLoS genetics*. 2008; 4 (10): e1000227.
 22. Jiang P, Lo YMD. The long and short of circulating cell-free DNA and the ins and outs of molecular diagnostics. *Trends in Genetics*. 2016; 32 (6): 360–71.
 23. Geiman TM, Muegge K. DNA methylation in early development. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 2010; 77 (2): 105–13.
 24. Sun K, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015; 112 (40): E5503–E5512.
 25. Sun K, Jiang P, Wong AI, Cheng YK, Cheng SH, Zhang H, et al. Size-tagged preferred ends in maternal plasma DNA shed light on the production mechanism and show utility in noninvasive prenatal testing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018; 115 (22): E5106–E5114.
 26. Tamminga S, van Maarle M, Henneman L, Oudejans CB, Cornel MC, Siermans EA. Maternal plasma DNA and RNA sequencing for prenatal testing. *Advances in clinical chemistry*. 2016; (74): 63–102.
 27. Ashoor G, Poon L, Syngelaki A, Mosimann B, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11–13 weeks' gestation: effect of maternal and fetal factors. *Fetal diagnosis and therapy*. 2012; 31 (4): 237–43.
 28. Canick JA, et al. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenatal diagnosis*. 2013; 33 (7): 667–74.
 29. Wright D, Syngelaki A, Bradbury I, Akolekar R, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomies 21, 18 and 13 by ultrasound and biochemical testing. *Fetal diagnosis and therapy*. 2014; 35 (2): 118–26.
 30. Kim SK, Hannum G, Geis J, Tynan J, Hogg G, Zhao C, et al. Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenatal diagnosis*. 2015; 35 (8): 810–15.
 31. Jiang P, Peng X, Su X, Sun K, Stephanie CY, Chu WI, et al. FetalQuant SD: accurate quantification of fetal DNA fraction by shallow-depth sequencing of maternal plasma DNA. *NPJ genomic medicine*. 2016; (1): 16013.
 32. Peng XL, Jiang P. Bioinformatics approaches for fetal DNA fraction estimation in noninvasive prenatal testing. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18 (2): 453.
 33. Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J, et al. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenatal diagnosis*. 2012; 32 (13): 1233–41.
 34. Lun FM, Chiu RW, Sun K, Leung TY, Jiang P, Chan KA, et al. Noninvasive prenatal methylomic analysis by genomewide bisulfite sequencing of maternal plasma DNA. *Clinical chemistry*. DOI: 10.1373/clinchem.2013.212274.
 35. Yu SC, et al. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014; 111 (23): 8583–8.
 36. Cirigliano V, Ordoñez E, Rueda L, Syngelaki A, Nicolaides KH. Performance of the neoBona test: a new paired-end massively parallel shotgun sequencing approach for cell-free DNA-based aneuploidy screening. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2017; 49 (4): 460–4.
 37. Straver R, Oudejans C, Siermans EA, Reinders MJ. Calculating the fetal fraction for noninvasive prenatal testing based on genome-wide nucleosome profiles. *Prenatal diagnosis*. 2016; 36 (7): 614–21.
 38. Kim SK, Hannum G, Geis J, Tynan J, Hogg G, Zhao C, Boom D. Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts. *Prenatal diagnosis*. 2015; 35 (8): 810–5.
 39. Chen S, Lau TK, Zhang C, Xu C, Xu Z, Hu P, et al. A method for noninvasive detection of fetal large deletions/duplications by low coverage massively parallel sequencing. *Prenatal diagnosis*. 2013; 33 (6): 584–90.
 40. Van den Veyver IB. Recent advances in prenatal genetic screening and testing. *F1000 Research*. 2016; 5 (F1000 Faculty Rev): 2591.
 41. Peters D, Chu T, Yatsenko SA, Hendrix N, Hogge WA, Surti U, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of a fetal microdeletion syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2011; 365 (19): 1847–8.
 42. Jensen TJ, Dzakula Z, Deciu C, van den Boom D, Ehrich M. Detection of microdeletion 22q11.2 in a fetus by next-generation sequencing of maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2012; 58 (7): 1148–51.
 43. Srinivasan A, Bianchi DW, Huang H, Sehnert AJ, Rava RP. Noninvasive detection of fetal subchromosome abnormalities via deep sequencing of maternal plasma. *The American Journal of Human Genetics*. 2013; 92 (2): 167–76.
 44. Lefkowitz RB, Tynan JA, Liu T, Wu Y, Mazloom AR, Almasri E, et al. Clinical validation of a noninvasive prenatal test for genomewide detection of fetal copy number variants. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2016; 215 (2): 227–e1.
 45. Straver R, Siermans EA, Holstege H, Visser A, Oudejans CB, Reinders MJ. WISECONDOR: detection of fetal aberrations from shallow sequencing maternal plasma based on a within-sample comparison scheme. *Nucleic acids research*. 2013; 42 (5): e31–e31.
 46. Zhao C, Tynan J, Ehrich M, Hannum G, McCullough R, Saldivar JS, Deciu C. Detection of fetal subchromosomal abnormalities by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2015.

47. Nicolaides KH, Syngelaki A, Gil M, Atanasova V, Markova D. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenatal diagnosis*. 2013; 33 (6): 575–9.
48. Wapner RJ, Babiarz JE, Levy B, Stosic M, Zimmermann B, Sigurjonsson S, Hu J. Expanding the scope of noninvasive prenatal testing: detection of fetal microdeletion syndromes. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015; 212 (3): 332–e1.
49. Costa JM, Benachi A, Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346 (19): 1502.
50. Lo YD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *New England Journal of Medicine*. 1998; 339 (24): 1734–8.
51. Tang NL, Leung TN, Zhang J, Lau TK, Lo YD. Detection of fetal-derived paternally inherited X-chromosome polymorphisms in maternal plasma. *Clinical chemistry*. 1999; 45 (11): 2033–5.
52. Bustamante-Aragón A, de Alba MR, Perlado S, Trujillo-Tiebas MJ, Arranz JP, Díaz-Recasens J, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of single-gene disorders from maternal blood. *Gene*. 2012; 504 (1): 144–9.
53. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2000; 46 (2): 301–2.
54. Vermeulen C, Geeven G, de Wit E, Verstegen MJ, Jansen RP, van Kranenburg M, et al. Sensitive monogenic noninvasive prenatal diagnosis by targeted haplotyping. *The American Journal of Human Genetics*. 2017; 101 (3): 326–39.
55. Tong YK, Jin S, Chiu RW, Ding C, Chan KA, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach. *Clinical chemistry*. 2010; 56 (1): 90–8.
56. Tsui DW, Lam YD, Lee WS, Leung TY, Lau TK, Lau ET, et al. Systematic identification of placental epigenetic signatures for the noninvasive prenatal detection of Edwards syndrome. *PloS one*. 2010; 5 (11): e15069.
57. Yuen RK, Penaherrera MS, Von Dadelszen P, McFadden DE, Robinson WP. DNA methylation profiling of human placentas reveals promoter hypomethylation of multiple genes in early-onset preeclampsia. *European Journal of Human Genetics*. 2010; 18 (9): 1006.
58. Blair JD, Yuen RK, Lim BK, McFadden DE, von Dadelszen P, Robinson WP. Widespread DNA hypomethylation at gene enhancer regions in placentas associated with early-onset preeclampsia. *Molecular human reproduction*. 2013; 19 (10): 697–708.
59. Chu T, Bunce K, Shaw P, Shridhar V, Althouse A, Hubel C, et al. Comprehensive analysis of preeclampsia-associated DNA methylation in the placenta. *PLoS One*. 2014; 9 (9): e107318.
60. Hahn S, Rusterholz C, Hösli I, Lapaire O. Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta*. 2011; (32): S17–S20.
61. Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, et al. DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *New England journal of medicine*. 2014; 370 (9): 799–808.
62. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Brar H, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *New England Journal of Medicine*. 2015; 372 (17): 1589–97.
63. Watananara T, Peter I, Messerlian GM, Borgatta L, Bianchi DW. Inverse correlation between maternal weight and second trimester circulating cell-free fetal DNA levels. *Obstetrics & Gynecology*. 2004; 104 (3): 545–50.
64. Rumyantsev AG, Kurcer MA, Mareeva JM, Misjurin AV, Roumiantsev SA, Ustjugov AJ. Clinical significance of the fetal microchimerism for mother. *Cellular Transplantation & Tissue Engineering*. 2012; 7 (2): 103–111.
65. Wang Y, et al. Maternal mosaicism is a significant contributor to discordant sex chromosomal aneuploidies associated with noninvasive prenatal testing. *Clinical chemistry*. 2014; 60 (1): 251–9.
66. Bianchi DW. Cherchez la femme: maternal incidental findings can explain discordant prenatal cell-free DNA sequencing results. *Genetics in Medicine*. 2017; DOI: 10.1038/gim.2017.219.
67. Hartwig TS, Ambye L, Sørensen S, Jørgensen FS. Discordant non-invasive prenatal testing (NIPT)—a systematic review. *Prenatal diagnosis*. 2017; 37 (6): 527–39.
68. Attilakos G, Maddocks DG, Davies T, Hunt LP, Avent ND, Soothill PW, et al. Quantification of free fetal DNA in multiple pregnancies and relationship with chorionicity. *Prenatal diagnosis*. 2011; 31 (10): 967–72.
69. Bevilacqua E, Gil MM, Nicolaides KH, Ordoñez E, Cirigliano V, Dierckx H, et al. Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2015; 45 (1): 61–6.
70. Curnow KJ, Wilkins-Haug L, Ryan A, Kirkizlar E, Stosic M, Hall MP, et al. Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015; 212 (1): 79–e1.
71. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*. 2015; 45 (3): 249–66.
72. Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2015; 45 (5): 530–8.
73. Russell LM, Strike P, Browne CE, Jacobs PA. X chromosome loss and ageing. *Cytogenetic and genome research*. 2007; 116 (3): 181–5.
74. Samango-Sprouse C, Kirkizlar E, Hall MP, Lawson P, Demko Z, Zneimer SM, et al. Incidence of X and Y chromosomal aneuploidy in a large child bearing population. *PloS One*. 2016; 11 (8): e0161045.
75. Shubina J, Trofimov DY, Barkov IY, Stupko OK, Goltsov AY, Mukosey IS, et al. In silico size selection is effective in reducing false positive NIPS cases of monosomy X that are due to maternal mosaic monosomy X. *Prenatal diagnosis*. 2017; 37 (13): 1305–10.
76. Bianchi DW, Chudova D, Sehner AJ, Bhatt S, Murray K, Prosen TL, et al. Noninvasive prenatal testing and incidental detection of occult maternal malignancies. *Jama*. 2015; 314 (2): 162–9.
77. Ferguson-Smith MA. Placental mRNA in maternal plasma: prospects for fetal screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100 (8): 4360–2.
78. Chiu RW, Cantor CR, Lo YD. Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies. *Trends in genetics*. 2009; 25 (7): 324–31.
79. ACOG Practice Bulletin # 77: screening for fetal chromosomal abnormalities. *Obstet Gynecol*. 2007; (109): 217–27.
80. Benn P, Borrell A, Chiu RW, Cuckle H, Dugoff L, Faas B, et al. Position statement from the Chromosome Abnormality Screening Committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. *Prenatal diagnosis*. 2015; 35 (8): 725–34.
81. Kascheeva TK, Kuznetsova TV, Baranov VS. New technologies and trends of prenatal diagnostics. *Journal of obstetrics and woman disease*. 2017; 66 (2): 33–39.
82. UK National Screening Committee. www.gov.uk URL. Available from: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/538524/Screening_in_the_UK_making_effective_recommendations_2015_to_2016_180716_final.pdf (data obrashhenija: 20.07.2018).
83. Screening in the UK: making effective recommendations 2015 to 2016. Public Health England hosts the UK National Screening Committee URL. Available from: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/538524/Screening_in_the_UK_making_effective_recommendations_2015_to_2016_180716_final.pdf (data obrashhenija: 20.07.2018).
84. Analysis of foetal DNA in the woman's blood: non-invasive prenatal testing (NIPT) for trisomy 13, 18 and 21. SFOG Guidelines URL. Available from: <http://www.nfog.org/files/guidelines/NIPT%202016%2006%2005%20.pdf> (data obrashhenija: 20.07.2018).
85. Trisomie 21 : la HAS actualise ses recommandations concernant le dépistage prénatal de la trisomie 21. www.has-sante.fr URL. Available from: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2768535/fr/trisomie-21-la-has-actualise-ses-recommandations-concernant-le

- depistage-prenatal-de-la-trisomie-21 (data obrashhenija: 20.07.2018).
86. Allyse M, Wick MJ. What do the new American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines mean for the provision of non-invasive prenatal genetic screening? *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2017; 37 (6): 795–8.
 87. American College of Obstetricians and Gynecologists: Screening for fetal aneuploidy. *Obstet Gynecol*. 2016; 127 (5): e123–137.
 88. Prenatal cell-free DNA screening. National Society of Genetic Counselors. Available from: <http://www.nsgc.org/p/bl/et/blogaid=805#.WCTELtNRftw.linkedin>.
 89. Gregg AR, Skotko BG, Benkendorf JL, Monaghan KG, Bajaj K, Best RG, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in medicine*. 2016; 18 (10): 1056–65.
 90. Informacionno-metodicheskoe pis'mo Minzdrava RF ot 19.03.2015 # 15-4/607. Available from: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_177689/.
 91. Sukhikh GT, Trofimov DYU, Barkov IYu, Donnikov AE, Shubina ES, Korostin DO, et al. Non-invasive prenatal DNA-screening of fetus aneuploidies using maternal blood based on high-throughput sequencing. *Clinical recommendations. Obstetrics and gynecology*. 2016; (6): 3–22.

ДЕТЕКЦИЯ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В КОРОТКОМ ПЛЕЧЕ 4-Й И 12-Й ХРОМОСОМ КАК ПРИМЕР ПОЛНОГЕНОМНОГО ПОДХОДА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ НЕИНВАЗИВНОГО ДНК-СКРИНИНГА

А. Ю. Гольцов , И. С. Мукосей, Т. О. Кочеткова, Е. Шубина, М. В. Кузнецова, О. К. Ступко, И. Ю. Барков, Д. В. Ребриков, Д. Ю. Трофимов

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Своевременное обнаружение анеуплоидий плода очень важно в клинической практике. В настоящее время идет активное развитие аналитических методов с применением высокопроизводительного секвенирования. Благодаря неинвазивному пренатальному ДНК-скринингу (НИПС) достоверные результаты можно получать на сроке 9–11 недель. Описан клинический случай применения НИПС и дальнейшей верификации полученных результатов. С помощью методов высокопроизводительного секвенирования, микроматричного анализа амниотической жидкости и цитогенетического кариотипирования у плода обнаружен высокий риск хромосомных перестроек в коротком плече 4-й и 12-й хромосом. Результаты были подтверждены с помощью молекулярного кариотипирования. Проверка родителей позволила выявить у матери сбалансированные хромосомные перестройки в 4-й и 12-й хромосомах. Данный случай демонстрирует преимущества полногеномного подхода перед таргетным при проведении НИПС.

Ключевые слова: анеуплоидии, неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг, синдром, инвазивная диагностика, комбинированный скрининг

Информация о вкладе авторов: А. Ю. Гольцов, И. С. Мукосей — неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг; Е. Шубина, Т. О. Кочеткова — анализ данных; М. В. Кузнецова — микроматричный анализ; О. К. Ступко — цитогенетическое кариотипирование; И. Ю. Барков — медико-генетическое консультирование; Д. Ю. Трофимов, Д. В. Ребриков — руководство.

Соблюдение этических стандартов: исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ «НЦАГиП имени В. И. Кулакова» (протокол № 2015/13).

 **Для корреспонденции:** Андрей Юрьевич Гольцов
ул. Академика Опарина д. 4, г. Москва, 117997; andrey.goltsov@gmail.com

Статья получена: 24.05.2019 **Статья принята к печати:** 08.06.2019 **Опубликована онлайн:** 15.06.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.040

DETECTION OF CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS IN THE SHORT ARMS OF CHROMOSOMES 4 AND 12 AS AN EXAMPLE OF A WHOLE-GENOME APPROACH TO NONINVASIVE PRENATAL TESTING

Goltsov AYU , Mukosey IS, Kochetkova TO, Shubina J, Kuznetsova MV, Stupko OK, Barkov IYu, Rebrikov DV, Trofimov DYU


Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Timely detection of fetal aneuploidy is an important aspect of clinical practice. At present, analytical techniques involving high-throughput sequencing are on the rise. Noninvasive prenatal testing (NIPT) ensures reliable results as early as week 9–11 into pregnancy. This article describes a clinical case of NIPT application and further verification of its results. Using next-generation sequencing, the microarray analysis of cell-free DNA in the amniotic fluid and the cytogenetic analysis of fetal chromosomes, a high risk of chromosomal rearrangements was detected in the short arms of chromosomes 4 and 12. This prediction was verified by molecular karyotyping conducted in both parents. The mother was found to be a balanced carrier of translocations between chromosomes 4 and 12. This case demonstrates the advantages of a whole-genome approach to NIPT over targeted-based.

Keywords: aneuploidy, noninvasive prenatal testing, syndrome, invasive diagnostic test, combined screening

Author contribution: Goltsov AYU, Mukosey IS — noninvasive prenatal screening; Shubina J, Kochetkova TO — data analysis; Kuznetsova MV — microarray analysis; Stupko OK — cytogenetic chromosome analysis; Barkov IYu — genetic counseling; Trofimov DYU, Rebrikov DV — study supervision.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (Protocol № 2015/13).

 **Correspondence should be addressed:** Andrey Yu. Goltsov
Akademika Oparina 4, Moscow, 117997; andrey.goltsov@gmail.com

Received: 24.05.2019 **Accepted:** 08.06.2019 **Published online:** 15.06.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.040

Хромосомные анеуплоидии (ХА) оказываются частой причиной перинатальной смертности и нарушений развития плода. Их обнаруживают примерно в каждом третьем случае неразвивающейся беременности и выкидыша. У новорожденных ХА встречаются с частотой до 1 : 300. Среди наиболее часто обнаруживаемых анеуплоидий можно назвать трисомии по 21-й, 18-й и 13-й хромосомам [1], а также анеуплоидии по половым хромосомам. Одним из факторов риска наличия ХА является возраст матери.

Для своевременного обнаружения ХА плода в России в настоящее время проводят комбинированный скрининг, основанный на результатах УЗИ и биохимических показателях в 1-м триместре беременности [2]. Скрининг имеет ограничение по чувствительности и специфичности, так как изменения биохимических показателей зависят не только от хромосомного статуса плода, но и от

гормонального фона беременной женщины и других факторов. При высоком риске по биохимическим показателям формируют группу, в которой можно проводить дополнительные исследования для более точной детекции хромосомных нарушений. Подтверждение наличия ХА происходит примерно у 13–15% пациенток группы. Подтверждающую диагностику проводят инвазивными методами (биопсия хориона, амниоцентез или кордоцентез), что может быть причиной потери плода в 0,5–2% случаев и противопоказано женщинам с повышенным риском прерывания беременности. В таких случаях и при сроке беременности не более 18–19 недель возможно определение наличия ХА плода по крови матери методом неинвазивного пренатального ДНК-скрининга (НИПС) [3]. Данная процедура не имеет противопоказаний для женщин с риском прерывания и возможна для

проведения с 9–10-й недели беременности. В настоящее время существует много разновидностей НИПС. Различия между ними состоит в числе исследуемых хромосом. Единственными мишенями для большинства таких тестов служат хромосомы 13, 18 и 21 [4, 5]. Остальные хромосомы не всегда анализируют (тест Prenetix, панель Panorama) даже при полногеномном исследовании. Кроме того, существует анализ только по трисомии 21 (синдром Дауна), который также называют НИПС, но при этом отмечают, что данное исследование проводят только по 21-й хромосоме.

Описание клинического случая

Пациентка П., 30 лет. ИМТ = 17,6 кг/м². Имеет ребенка — девочка 3 года, ДВС-синдром, гипертензионно-гидроцефальный синдром. Данная беременность третья, самопроизвольная. Результаты комбинированного скрининга 1-го триместра: ультразвуковые маркеры хромосомных аномалий и врожденные пороки развития не выявлены. ТВП = 1,3 мм. Кости носа определяются. β-ХГЧ = 0,508 МоМ; PAPP-A = 0,314 МоМ.

По результатам скрининга 1-го триместра установлены следующие риски:

риск трисомии 21 — 1 : 10 084 (при изначальном базовом риске 1 : 585);

риск трисомии 18 — 1 : 1073 (при базовом риске 1 : 1396);

риск трисомии 13 — 1 : 1372 (при базовом риске 1 : 4389).

Образец крови на НИПС был получен на сроке 13 недель 4 дня. Полногеномное секвенирование приготовленной из внеклеточной ДНК-библиотеки проводили с использованием прибора Ion S5XL (ThermoFisher Scientific; США), данные анализировали по ранее описанному протоколу [6], включая картирование полученных в результате секвенирования ридов на референсный геном с проведением ГЦ-коррекции и подсчетом уникальных картированных ридов. Анализ риска ХА проводили с использованием программного обеспечения собственной разработки [7].

В результате анализа были сделаны следующие выводы. При количестве ридов полногеномной библиотеки 7,5 млн генетический пол плода — мужской, доля плодовой ДНК по Y-хромосоме — 16%. По хромосомам 13, 18, 21 анеуплоидий выявлено не было. Были обнаружены высокий риск делеции по короткому плечу 4-й хромосомы (включает регионы p16–p14), размер примерно 35 Мб (рис. 1А), а также дупликации по короткому плечу 12-й хромосомы (включает регионы p13.3–p12.1), размер

примерно 25 Мб (рис. 1Б). Полученные данные требуют подтверждения инвазивными методами [8, 9].

Для проверки полученных на НИПС данных [10] было назначено проведение микроматричного анализа амниотической жидкости с использованием микрочипов CytoScan Optima Array (Affimetrix; США). Забор амниотической жидкости проводили на сроке 16 недель.

Результаты пренатальной диагностики по амниотической жидкости представлены на рис. 2 и 3.

В ходе исследования установлен следующий молекулярный кариотип плода:

arr[hg19] 4p16.3(68,345-35,195,686)x1 — делеция короткого плеча 4-й хромосомы размером 35 млн п.н. Данная делеция соответствует синдрому Вольфа–Хиршхорна (Wolf–Hirschhorn syndrome OMIM 194190);

arr[hg19] 12p13.33p11.22(173,786-28,183,286)x3 — дупликация короткого плеча 12-й хромосомы размером 28 млн п.н. Дупликация в данном регионе описана как синдром Паллистера–Киллиана, называемая также тетрасомией 12p (Pallister–Killian syndrome OMIM 601803).

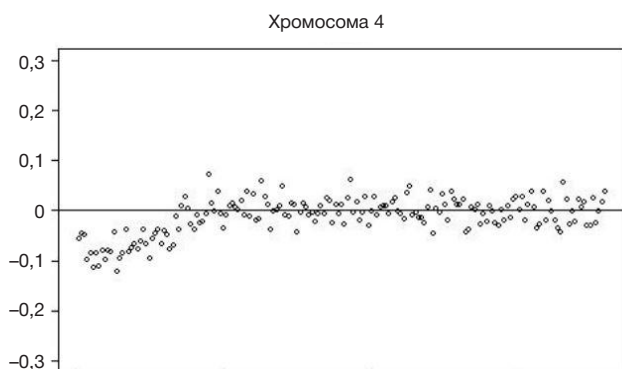
По результатам молекулярного кариотипирования было рекомендовано прервать беременность. Беременность была прервана на сроке 18 недель.

Обсуждение клинического случая

В связи с тем что у плода обнаружены патогенные хромосомные перестройки, было рекомендовано провести кариотипирование родителей. Кариотипирование матери выявило сбалансированную транслокацию с вовлечением 4-й и 12-й хромосом, которая и была причиной появления нарушений у плода (рис. 4).

В ходе проведенных анализов редкие хромосомные нарушения были обнаружены благодаря тому, что при НИПС был использован полногеномный метод исследования. В настоящее время существует несколько видов НИПС. Некоторые из них основаны либо на таргетном секвенсе 13-й, 18-й и 21-й хромосом, либо на выборочном анализе только определенных хромосом [11, 12]. Такие методы не позволяют обнаружить хромосомные перестройки, которые могут присутствовать на других хромосомах. В клинической практике встречались случаи, при которых после проведения таргетного НИПС были пропущены делеции как отдельных участков хромосом 22q11 — синдром ДиДжорджа, так и целого короткого плеча 5p — синдром кошачьего крика, что приводило к рождению больного ребенка.

А



Б

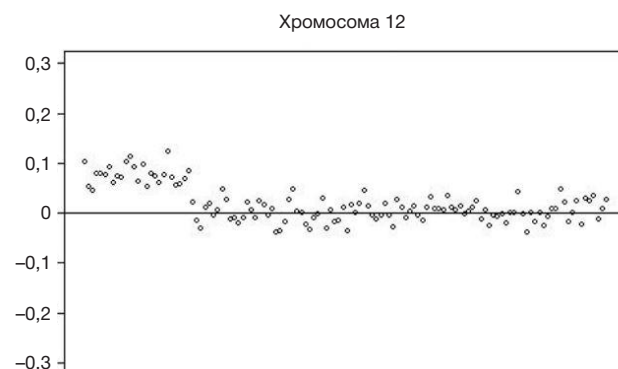


Рис. 1. Визуализация распределения ридов по длине хромосомы. По оси ординат указаны отклонения количества ридов от референсных значений, формируемых для нормального генотипа. **А.** Распределение для хромосомы 4. **Б.** Распределение для хромосомы 12



Рис. 2. Результаты молекулярного кариотипирования амниотической жидкости пациентки П. — делеция на коротком плече 4-й хромосомы

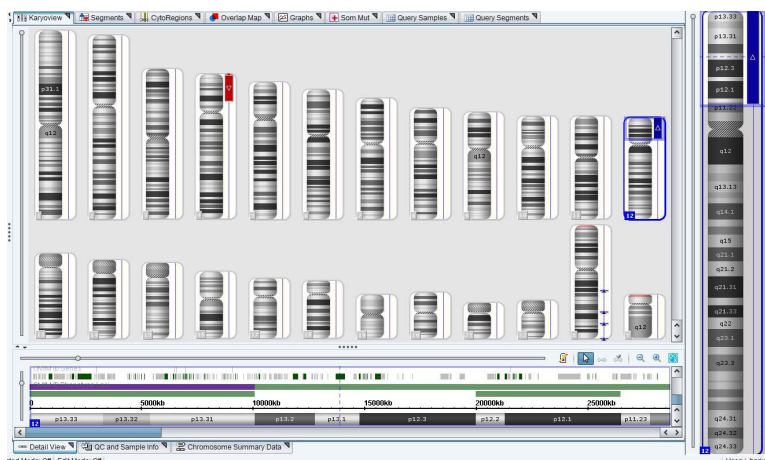


Рис. 3. Результаты молекулярного кариотипирования амниотической жидкости пациентки П. — дупликация на коротком плече 12-й хромосомы

Материал: периферическая кровь

Тип окраски: G-бэнд

Кариотип: 46,XX,t(4;12)(p15.1;p11.2)

Заключение: сбалансированный женский кариотип, содержащий реципрокную транслокацию между хромосомами 4 и 12 с точками разрыва 4p15.1 и 12p11.2.

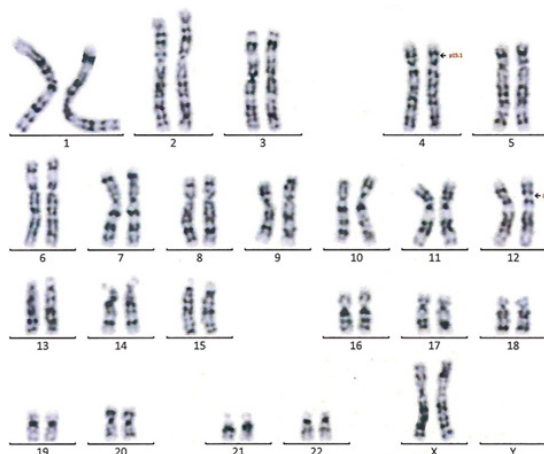


Рис. 4. Результаты кариотипирования пациентки П.

ВЫВОДЫ

По результатам данного клинического случая можно сделать выводы как частного, так и общего характера. В связи с высоким риском хромосомных нарушений при следующей беременности пациентке П. и ее супругу рекомендовано

проведение преимплантационной генетической диагностики. При проведении НИПС полногеномный подход, в отличие от таргетного, имеет преимущества, так как его использование не приводит к потере данных по клинически важным участкам генома. А при проведении полногеномного НИПС необходимо проводить анализ всех хромосом.

Литература

1. Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2011; 204 (3): 205–e1.
2. Wald NJ, Hackshaw AK. Combining ultrasound and biochemistry in first-trimester screening for Down's syndrome. *Prenatal diagnosis*. 1997; 17 (9): 821–9.
3. Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: Clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound Obstet. Gynecol*. 2015; 45 (5): 530–8.
4. Hartwig TS, Ambye L, Sørensen S, Jørgensen FS. Discordant non-invasive prenatal testing (NIPT) — a systematic review. *Prenat Diagn*. 2017; 37 (6): 527–39.
5. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn*. 2013; 33 (7): 667–74.
6. Сухих Г. Т., Каретникова Н. А., Баранова Е. Е., Шубина Е. С., Коростин Д. О., Екимов А. Н. и др. Неинвазивная пренатальная диагностика анеуплоидий методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) в группе женщин высокого риска. *Акушерство и гинекология*. 2015; (4): 5–10.
7. Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий плода по крови матери методом высокопроизводительного секвенирования. Клинические рекомендации. *Акушерство и гинекология*. 2016; (6): 1–22.
8. Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*. 2010; 2 (61): 61–91.
9. Fiorentino F, Bono S, Pizzuti F, Mariano M, Polverari A, Duca S, et al. The importance of determining the limit of detection of non invasive prenatal testing methods. *Prenat Diagn*. 2016; 36 (4): 304–11.
10. Juneau K, Bogard PE, Huang S, Mohseni M, Wang ET, Ryvkin P, et al. Microarray-Based Cell-Free DNA Analysis Improves Noninvasive Prenatal Testing. *Fetal Diagn Ther*. 2014; 36 (4): 282–6.
11. Wang J-C, Sahoo T, Schonberg S, Kopita K, Ross L, Patek K, et al. Discordant noninvasive prenatal testing and cytogenetic results: a study of 109 consecutive cases. *Genet Med*. 2015; 17 (3): 234–6.
12. Ma J, Cram DS, Zhang J, Shang L, Yang H, Pan H. Birth of a child with trisomy 9 mosaicism syndrome associated with paternal isodisomy 9: case of a positive noninvasive prenatal test result unconfirmed by invasive prenatal diagnosis. *Mol Cytogenet*. 2015; (8): 44.

References

1. Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R, et al. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2011; 204 (3): 205–e1.
2. Wald NJ, Hackshaw AK. Combining ultrasound and biochemistry in first-trimester screening for Down's syndrome. *Prenatal diagnosis*. 1997; 17 (9): 821–9.
3. Zhang H, Gao Y, Jiang F, Fu M, Yuan Y, Guo Y, et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: Clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound Obstet. Gynecol*. 2015; 45 (5): 530–8.
4. Hartwig TS, Ambye L, Sørensen S, Jørgensen FS. Discordant non-invasive prenatal testing (NIPT) — a systematic review. *Prenat Diagn*. 2017; 37 (6): 527–39.
5. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn*. 2013; 33 (7): 667–74.
6. Sukhikh GT, Karetnikova NA, Baranova EE, Shubina E, Korostin DO, Ekimov A, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies by next-generation sequencing (ngs) in a group of high-risk women. *Obstetrics and Gynecology*. 2015; (4): 5–10.
7. Noninvasive prenatal DNA-screening fetal aneuploidy in maternal blood by next-generation sequencing (ngs) method. *Clinical recommendation. Obstetrics and Gynecology*. 2016; (6): 1–22.
8. Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*. 2010; 2 (61): 61–91.
9. Fiorentino F, Bono S, Pizzuti F, Mariano M, Polverari A, Duca S, et al. The importance of determining the limit of detection of non invasive prenatal testing methods. *Prenat Diagn*. 2016; 36 (4): 304–11.
10. Juneau K, Bogard PE, Huang S, Mohseni M, Wang ET, Ryvkin P, et al. Microarray-Based Cell-Free DNA Analysis Improves Noninvasive Prenatal Testing. *Fetal Diagn Ther*. 2014; 36 (4): 282–6.
11. Wang J-C, Sahoo T, Schonberg S, Kopita K, Ross L, Patek K, et al. Discordant noninvasive prenatal testing and cytogenetic results: a study of 109 consecutive cases. *Genet Med*. 2015; 17 (3): 234–6.
12. Ma J, Cram DS, Zhang J, Shang L, Yang H, Pan H. Birth of a child with trisomy 9 mosaicism syndrome associated with paternal isodisomy 9: case of a positive noninvasive prenatal test result unconfirmed by invasive prenatal diagnosis. *Mol Cytogenet*. 2015; (8): 44.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ¹³C-МЕЧЕНЫХ ЛИНОЛЕВОЙ И ЛИНОЛЕНОВОЙ КИСЛОТ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ТЕСТОВ

Я. Я. Тыньо¹, Г. В. Морозова², Ю. К. Бирюкова^{3,4} ✉, Е. В. Трубникова³, М. В. Зылькова⁴, Д. А. Сивохин⁵, К. П. Иванов⁶, Н. В. Позднякова⁷, Е. А. Казакова⁸, Е. С. Мутных⁹, А. Б. Шевелев^{9,10}

¹ Российский государственный университет физической культуры, спорта, молодежи и туризма, Москва, Россия

² Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К. И. Скрябина, Москва, Россия

³ Курский государственный университет, Курск, Россия

⁴ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунологических препаратов имени М. П. Чумакова, Москва, Россия

⁵ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

⁶ Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии имени А. Н. Бакулева, Москва, Россия

⁷ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина, Москва, Россия

⁸ Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, Москва, Россия

⁹ Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова, Москва, Россия

¹⁰ Российский экономический университет имени Г. В. Плеханова, Москва, Россия

Неинвазивные дыхательные тесты с применением изотопно-меченых соединений представляют собой новый высокоточный и безопасный метод функционального исследования печени и билиарной системы. Целью работы было провести биологические испытания острой и субхронической токсичности ¹³C-меченых линолевой и линоленовой кислот, синтезированных по оригинальной методике и предназначенных для проведения диагностических дыхательных тестов. При однократном внутрижелудочном введении изучаемых соединений лабораторным мышам линии BALB/c и крысам Wistar в дозах, превышающих диагностические в 500–2500 раз, образцы соединений не вызвали смертности экспериментальных животных. При проведении субхронического эксперимента на крысах при дозировках испытываемых соединений, в 5 и 25 раз превышающих терапевтическую дозу для человека, в течение 14 суток было выявлено отсутствие достоверных изменений у животных в экспериментальных группах по сравнению с контрольной по массе тела, гематологическим показателям (содержанию эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов в крови) и биохимическим показателям сыворотки крови (уровню гемоглобина, общего белка, щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы, билирубина). Исследованные меченые кислоты безвредны в дозах, планируемых для перорального введения, и могут быть рекомендованы к доклиническим и клиническим испытаниям.

Ключевые слова: дыхательный тест, линолевая кислота, линоленовая кислота, углерод-13

Финансирование: работа выполнена в рамках тематики Государственного задания № 0112-2019-0001 «Геномные исследования и генетический полиморфизм клетки, организма и популяции» (под руководством Н. К. Янковского).

Информация о вкладе авторов: Я. Я. Тыньо, Г. В. Морозова — наработка образцов меченой линолевой кислоты; Ю. К. Бирюкова — определение биохимических показателей сыворотки крови крыс; Е. В. Трубникова — статистическая обработка результатов; М. В. Зылькова — изготовление гистологических срезов; Д. А. Сивохин — обзор литературы, написание статьи; К. П. Иванов — забой крыс, патоморфологическое исследование внутренних органов и тканей; Н. В. Позднякова, Е. С. Мутных — исследование острой токсичности ¹³C-меченых кислот при однократном введении; Е. А. Казакова — исследование субхронической токсичности ¹³C-меченых кислот; А. Б. Шевелев — постановка проблемы, анализ и обсуждение результатов.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено Региональным этическим комитетом (протокол № 3 от 26 февраля 2018 г.). Экспериментальных животных содержали в соответствии с действующими Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14.

✉ **Для корреспонденции:** Юлия Константиновна Бирюкова
ул. Косыгина, д. 4, г. Москва, 119334; biriukova-ula@mail.ru

Статья получена: 24.06.2019 **Статья принята к печати:** 28.06.2019 **Опубликована онлайн:** 30.06.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.044

TOXICITY OF ¹³C-LABELED LINOLEIC AND LINOLENIC ACIDS FOR DIAGNOSTIC BREATH TESTS

Tynio YaYa¹, Morozova GV², Biryukova YuK^{3,4} ✉, Trubnikova EV³, Zylkova MV⁴, Sivokhin DA⁵, Ivanov KP⁶, Pozdniakova NV⁷, Kazakova EA⁸, Mutnykh ES⁹, Shevelev AB^{9,10}

¹ Russian State University of Physical Education, Sport, Youth and Tourism, Moscow, Russia

² Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

³ Kursk State University, Kursk, Russia

⁴ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune and Biological Products, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁵ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

⁶ Bakulev Center for Cardiovascular Surgery Moscow, Russia

⁷ Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

⁸ National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

⁹ Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

¹⁰ Plekhanov Russian University of Economics, Moscow, Russia

Noninvasive stable isotope breath tests allow highly accurate and safe estimation of liver and biliary tract function. The aim of this study was to test ¹³C-labeled linoleic and linolenic acids intended for diagnostic use for acute and subchronic toxicity. The acids were synthesized using the patented method. A single intragastric administration of the tested compounds to experimental BALB/c mice and Wistar rats in the amounts exceeding clinical doses 500 to 2500-fold did not cause animal death. In the subchronic toxicity test, the rats received 5 to 25 times higher doses than recommended for clinical use in humans. In a 14-day follow-up period, no significant differences were observed between the main and the control groups in terms of weight, blood count (red blood cells, white blood cells, platelets), and blood biochemistry (hemoglobin, total protein, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, bilirubin). The studied compounds are safe at doses intended for oral administration and are recommended for further preclinical and clinical trials.

Keywords: breath test, linoleic acid, linolenic acid, carbon-13

Funding: this study was part of the State Project 0112-2019-0001 on *Genomic studies and genetic polymorphism of the cell, organism and population* headed by Yankovsky NK.

Author contribution: Tynio YaYa, Morozova GV — synthesis of ¹³C-labeled linoleic acid; Biryukova YuK — blood biochemistry tests; Trubnikova EV — statistical analysis; Zylkova MV — preparation of histological slides; Sivokhin DA — literature analysis, manuscript draft; Ivanov KP — animal sacrifice and necropsy; Pozdniakova NV, Mutnykh ES — acute toxicity tests of ¹³C-labeled acids following their single administration; Kazakova EA — subchronic toxicity tests of ¹³C-labeled acids; Shevelev AB — study conception, analysis and discussion of its results.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the regional Ethics Committee (Protocol № 3 dated February 26, 2018). Animal housing met the *Sanitary and Epidemiological Requirements for Laboratory Animal Facilities* (Guidelines 2.2.1.3218-14).

✉ **Correspondence should be addressed:** Yulia K. Biryukova
Kosygina 4, Moscow, 119334; biriukova-ula@mail.ru

Received: 24.06.2019 **Accepted:** 28.06.2019 **Published online:** 30.06.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.044

Дыхательные тесты являются одним из наиболее эффективных и безопасных методов оценки состояния внутренних органов человека. В конце XX в. для диагностики заболеваний желудочно-кишечного тракта в клиническую практику был введен уреазный дыхательный тест на основе использования мочевины, меченной стабильным изотопом ^{13}C [1] или радиоактивным аналогом ^{14}C [2], являющийся в настоящее время «золотым стандартом» в обнаружении бактерии *Helicobacter pylori* [3]. В присутствии этого патогена, обладающего высокой уреазной активностью, происходит гидролиз мочевины на изотопно-меченый CO_2 и аммиак, которые затем попадают в кровь и выводятся через легкие [4]. Диагностический потенциал дыхательных тестов реализуется на основе регистрации количества выдыхаемого пациентом CO_2 с мечеными изотопами углерода с помощью масс-спектрометрии или счетчика Гейгера–Мюллера [5]. В отсутствие *Helicobacter pylori* у обследуемого пациента описанная реакция не идет, и полученные значения содержания изотопно-меченого CO_2 в выдыхаемом воздухе не отличаются от контрольных.

Неинвазивные дыхательные тесты характеризуются высокой точностью, экономической доступностью, низкой трудоемкостью и безопасностью, как для самого пациента, так и для врача. Они позволяют определить целый ряд показателей, необходимых для выбора правильного лечения [6].

На сегодняшний день разработаны дыхательные тесты для определения чувствительности к инсулину на основе ^{13}C -глюкозы [7], ^{13}C -метацетина [8], ^{13}C -галактозы и ^{13}C -аминофеназона [9], а также для диагностики хронических заболеваний печени, таких как вирусные гепатиты В и С, цирроз, токсический и алкогольный гепатит, и др. ^{13}C -октановая кислота находит применение при измерении скорости опорожнения желудка [10], ($^{13}\text{C}_3$ -карбонил)триоктаоин служит для диагностики недостаточной секреции ферментов поджелудочной железы [4].

Работы, проводимые по увеличению производства изотопов углерода и созданию специализированной и недорогой аппаратуры для измерения изотопного состава выдыхаемого воздуха, позволяют надеяться на скорое внедрение этой методики в повседневную клиническую практику.

В разработке дыхательного теста для диагностики функциональной активности гепатобилиарной системы в роли основных компонентов лекарственных форм используют линолевую и линоленовую кислоты — жирные кислоты, углеводная цепочка которых состоит из 18 атомов углерода. Данные кислоты являются ненасыщенными: первая из них имеет две двойные углевод–углеводные связи, а вторая — три таких связи [11].

Формообразующий компонент данных лекарственных форм разрабатываемых дыхательных тестов представлен пирофосфатом натрия. Его широко используют в отечественных и зарубежных радиофармацевтических препаратах. Так, в России его применяют в виде основного вещества радиофармпрепарата «Пирфотех, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ », который разрешен к медицинскому применению приказом Министра здравоохранения РФ № 507 от 14 апреля 1985 г. (регистрационный № 85/507/13) [12]. Препарат эффективен для сцинтиграфии скелета, визуализации острого инфаркта миокарда и кровеносного русла сосудистой оболочки глаза, ангиокардиографии и др. [12, 13].

В патенте РФ № 2630691 «Способ синтеза линолевой и линоленовой кислот, меченных изотопами углерода ^{13}C

и ^{14}C » [14] описан оригинальный способ синтеза изотопно-меченых жирных кислот, предназначенных к использованию в диагностических дыхательных тестах для выявления патологии гепатобилиарной системы. Необходимым этапом разработки лекарственных и диагностических средств для внутреннего введения являются исследования их безопасности. Целью настоящей работы было исследовать острую и субхроническую токсичность изотопно-меченых линолевой и линоленовой кислот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение острой токсичности линолевой и линоленовой кислот, меченных изотопом ^{13}C в положении 1, выполнено в соответствии с «Методическими указаниями по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [15]. Исследование проводили на 95 мышах линии BALB/C (самцы и самки, масса тела 18–20 г) и 45 крысах линии Вистар (самцы и самки, масса тела 180–210 г).

Исследуемые ^{13}C -меченые кислоты синтезировали, как описано в патенте РФ № 2630691 «Способ синтеза линолевой и линоленовой кислот, меченных изотопами углерода ^{13}C и ^{14}C » [14]. Структуру и чистоту полученных промежуточных и конечных продуктов контролировали спектроскопией ядерного магнитного резонанса на приборе AM-300, 300 МГц (Bruker; Германия) и DRX-500, 500 МГц (Bruker; Германия). Масс-спектрометрический анализ выполняли на установке Finnigan MAT Model Incos 50 (70 эВ) (Finnigan MAT; Англия) с прямым вводом и масс-спектрометре высокого разрешения MicrOTOFII (BrukerDaltonics; Германия) (ESI).

Экспериментальных животных, участвовавших в эксперименте, содержали в клетках типа Т-3, в условиях, соответствующих действующим Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник. Животные получали в неограниченном количестве водопроводную питьевую воду. Для питья использовали поилки (500-мл стеклянные бутылки с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре). Кормление проводили в фиксированное время и только специализированными брикетированными кормами, сбалансированными по аминокислотному составу, минеральным веществам и витаминам. В течение всего эксперимента фиксировали общее состояние и поведение животных (двигательную активность, динамику массы тела, аппетит и состояние шерстяного покрова).

При испытаниях острой токсичности образцы испытываемых соединений растворяли в оливковом масле и принудительно с помощью зонда однократно вводили свежеприготовленные растворы в желудок в следующем диапазоне доз: для крыс 100–500 мг, для мышей — 10–50 мг. Длительность наблюдения за животными с начала эксперимента составляла 3 суток. Для выявления результатов испытания острой токсичности исследуемых соединений при однократном внутрижелудочном способе введения мышам BALB/c и крысам Wistar определяли значения летальной дозы (LD_{50}) по методу Дейхмана и Лебланка [15].

Изучение субхронической токсичности испытываемых соединений проводили в соответствии с «Методическими указаниями по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [15]. Исследование выполняли на 150 крысах линии Вистар с массой тела 180–200 г. Исследуемые соединения в виде

свежеприготовленных растворов в указанных дозах вводили ежедневно внутривентрально в течение 2 недель. Животные были разделены на несколько групп по 30 животных в каждой (15 самцов и 15 самок): I группа — контроль (масляный растворитель без действующего вещества); II группа — ^{13}C -линолевая кислота, доза 5 мг/кг (в 5 раз больше диагностической дозы для человека); III группа — ^{13}C -линолевая кислота, доза 25 мг/кг (в 25 раз больше диагностической дозы для человека); IV группа — ^{13}C -линоленовая кислота, доза 5 мг/кг (в 5 раз больше диагностической дозы для человека); V группа — ^{13}C -линоленовая кислота, доза 25 мг/кг (в 25 раз больше диагностической дозы для человека).

Забор крови у крыс производили из хвостовой вены в объеме 2,0–2,5 мл перед началом субхронического эксперимента, через неделю после начала эксперимента и по окончании 2-недельного наблюдения. Гематологический анализ образцов крови проводили с помощью автоматического счетчика крови «ПИКОСКЕЛЬ ПС-4М» («Медикор-Электромедика»; Венгрия).

Определение биохимических показателей сыворотки крови (глюкозы, общего белка, креатинина, холестерина и общего билирубина), а также активности ферментов сыворотки (щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и лактатдегидрогеназы) проводили с помощью полуавтоматического биохимического анализатора FP 901 (Labsystems; Финляндия).

По окончании субхронического эксперимента на 14-й день проводили забой крыс для патоморфологического исследования внутренних органов и тканей животных. Животных вскрывали сразу же после забоя, чтобы исключить возможный автолиз тканей и клеток внутриклеточными ферментами. На каждое животное составляли полный патологоанатомический протокол вскрытия.

Образцы органов и тканей фиксировали в 10%-м нейтрализованном растворе формалина, после чего проводили обезжиривание, обезвоживание и проводку тканей с их заливкой вручную в парафин с воском. Гистологические срезы получали с помощью санного микротомы MC-1 («Амбимед»; Россия), что позволило сделать серийные срезы. После депарафинирования срезы окрашивали гематоксилин-эозином, заключали в канадский балзам под покровные стекла, и полученные таким образом гистологические препараты микроскопировали. Микроскопирование и микрофото съемку проводили с помощью оптической системы, состоявшей из микроскопа Leica CM E (Leica Microsystems; Германия) и окуляр-камеры «Микромед DCM-510 SCOPE» («Наблюдательные приборы»; Россия) при увеличении $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$ и $\times 400$ с документированием снимков в программе Future Win Joe (Future Optics; Китай), входящей в комплект поставки окуляр-камеры. Данные патоморфологического обследования крыс экспериментальных групп, которым вводили ^{13}C -линолевую и ^{13}C -линоленовую кислоты, сравнивали с данными обследования животных контрольной группы.

Проверку гипотезы об отсутствии статистически значимых различий между контрольной и каждой из экспериментальных групп проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни и точного критерия Фишера, реализованного в виде пакета программ Statistica 8.0 for Windows (Dell; США). Проводили расчет медианы признака, интерквартильных интервалов, минимального и максимального значений [16]. При обработке качественных показателей вычисляли размер

выборочной доли в процентах и ошибку выборочной доли. В случае отклонения нулевой гипотезы и принятия альтернативной ($p < 0,05$) проводили попарное сравнение групп с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни, применяя поправку Бонферони при оценке значения p .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование острой токсичности ^{13}C -меченых линолевой и линоленовой кислот при однократном введении

При введении препаратов в желудок в максимально вводимых дозах для мышей — 2,632 мг/кг, для крыс — 2,564 мг/кг картины интоксикации указанных животных, а также симптомов раздражения желудочно-кишечного тракта не наблюдали. Не было отмечено также гибели мышей и крыс. Не установлено видовых и половых различий в чувствительности животных к токсическому действию изученных соединений.

Таким образом, при введении в желудок двум видам мелких лабораторных животных ^{13}C -меченых линолевой и линоленовой кислот в дозах, превышающих диагностическую в 2500 раз, на протяжении 3 суток наблюдения не было обнаружено явлений интоксикации и гибели животных. В спецификации на ^{13}C -меченую линолевую кислоту (Science Lab; США) указана ЛД₅₀, равная 3,2 г/кг. Этот показатель получен при введении животным значительно большего количества жирной кислоты. Таким образом, можно сделать вывод о том, что при испытаниях острой токсичности различия между коммерчески доступным аналогом и испытываемыми соединениями, синтезированными по оригинальной методике, различий в токсичности не обнаружено.

Исследование субхронической токсичности ^{13}C -меченых линолевой и линоленовой кислот на крысах

При ежедневном 2-недельном внутривентральном введении ^{13}C -меченых линолевой и линоленовой кислот крысам в дозах 5 и 25 мг/кг не выявлено существенных изменений в поведении и внешнем виде животных. Они имели гладкий шерстный покров, охотно поедали корм, сохраняли обычную двигательную активность.

Результаты исследования массы тела крыс во всех экспериментальных группах, получавших исследуемые препараты, в течение всего эксперимента представлены в табл. 1 и табл. 2.

Отсутствовали значимые различия между группами контроля и экспериментальными группами во всех случаях, кроме групп самцов, получавших ^{13}C -линоленовую кислоту в дозах 5 и 25 мг/кг. В этом случае привесы животных в экспериментальных группах оказались выше, чем в контроле, что свидетельствует о стимулирующем влиянии испытываемого соединения на рост животных. Негативного влияния соединений на рост и состояние животных не выявлено.

Результаты исследований гематологических показателей экспериментальных животных по сравнению с контролем представлены в табл. 3.

В условиях субхронического опыта при введении ^{13}C -линолевой кислоты крысам в дозе 5 мг/кг достоверные, хотя и небольшие отличия (по 1-му порогу достоверности) были выявлены в группе самцов по гемоглобину, а в группе

Таблица 1. Динамика массы тела самцов в ходе 2-недельного внутрижелудочного введения ^{13}C -линолевой и ^{13}C -линоленовой кислот

До начала эксперимента	Контроль, г	Опыт, г	p
Линолевая кислота, 5 мг/кг	113,3	115,7	$> 0,05$
Линолевая кислота, 25 мг/кг	113,3	114,0	$> 0,05$
Через 14 суток			
Линолевая кислота, 5 мг/кг	132,1	135,3	$> 0,05$
Линолевая кислота, 25 мг/кг	132,1	133,6	$> 0,05$
До начала эксперимента			
Линоленовая кислота, 5 мг/кг	116,4	114,2	$> 0,05$
Линоленовая кислота, 25 мг/кг	116,4	117,5	$> 0,05$
Через 14 суток			
Линоленовая кислота, 5 мг/кг	130,6	136,3	$> 0,001$
Линоленовая кислота, 25 мг/кг	130,6	138,2	$< 0,001$

Таблица 2. Динамика массы тела самок в ходе 2-недельного внутрижелудочного введения ^{13}C -линолевой и ^{13}C -линоленовой кислот

До начала эксперимента	Контроль, г	Опыт, г	p
Линолевая кислота, 5 мг/кг	111,9	112,2	$> 0,05$
Линолевая кислота, 25 мг/кг	111,9	112,9	$> 0,05$
Через 14 суток			
Линолевая кислота, 5 мг/кг	129,3	132,1	$> 0,05$
Линолевая кислота, 25 мг/кг	129,3	131,5	$> 0,05$
До начала эксперимента			
Линоленовая кислота, 5 мг/кг	113,8	115,4	$> 0,05$
Линоленовая кислота, 25 мг/кг	113,8	114,6	$> 0,05$
Через 14 суток			
Линоленовая кислота, 5 мг/кг	127,2	134,1	$> 0,05$
Линоленовая кислота, 25 мг/кг	127,2	130,3	$> 0,05$

самок — по лейкоцитам и тромбоцитам. Однако после 14 суток наблюдения эти отличия исчезали, что может свидетельствовать о случайном характере наблюдаемых колебаний.

Напротив, при дозировке ^{13}C -линолевой кислоты 25 мг/кг через неделю наблюдений различий между группами не наблюдалось, но через 14 суток эксперимента было выявлено существенное снижение содержания лейкоцитов в группе самок (3-й порог достоверности) и слабо

выраженное снижение уровня тромбоцитов в группах самок и самцов (1-й порог достоверности). Несмотря на наличие различий между группами, абсолютные значения этих показателей оставались в пределах нормы, что позволяет сделать вывод о безопасности испытываемого соединения.

Сведения о результатах определения уровня общего белка в сыворотке крови представлены в табл. 4.

При дозировке испытываемого соединения, равной 5 мг/кг, уровень общего белка в группах самок через

Таблица 3. Гематологические показатели крыс при введении ^{13}C -линолевой кислоты в течение 2 недель

5 мг/кг			25 мг/кг		
Эритроциты					
	Самцы	Самки		Самцы	Самки
Первая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$	Первая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,05$
Вторая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$	Вторая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,05$
Лейкоциты					
Первая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,05$	Первая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Вторая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$	Вторая неделя	$p > 0,05$	$p = 0,001$
Тромбоциты					
Первая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,05$	Первая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Вторая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$	Вторая неделя	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Гемоглобин					
Первая неделя	$p < 0,05$	$p > 0,05$	Первая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Вторая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$	Вторая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Таблица 4. Содержание общего белка (г/л) в сыворотке крови крыс, получавших ^{13}C -линолевую кислоту в течение 2 недель

5 мг/кг			25 мг/кг		
	Самцы	Самки		Самцы	Самки
Первая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,05$	Первая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,05$
Вторая неделя	$p < 0,05$	$p < 0,05$	Вторая неделя	$p < 0,05$	$p > 0,05$

Таблица 5. Содержание общего белка (г/л) в сыворотке крови крыс, получавших ^{13}C -линолевую кислоту в течение 2 недель

5 мг/кг			25 мг/кг		
Щелочная фосфатаза					
	Самцы	Самки		Самцы	Самки
Первая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,05$	Первая неделя	$p < 0,01$	$p < 0,01$
Вторая неделя	$p < 0,05$	$p < 0,05$	Вторая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,01$
Аланинаминотрансфераза, Ед./л					
Первая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,05$	Первая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Вторая неделя	$p < 0,05$	$p < 0,05$	Вторая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Аспартатаминотрансфераза, Ед./л					
Первая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$	Первая неделя	$p < 0,05$	$p > 0,05$
Вторая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,01$	Вторая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Лактатдегидрогеназа, Ед./л					
Первая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,001$	Первая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Вторая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,001$	Вторая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Билирубин общий, мкМ					
Первая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,01$	Первая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Вторая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,001$	Вторая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,001$

неделю эксперимента, самок и самцов после 2 недель эксперимента достоверно выше, чем в контроле. Такие же результаты выявлены для группы самок через неделю и группы самцов через 2 недели при дозировке 25 мг/кг. Это свидетельствует о стимуляции синтеза белка испытуемым соединением, что не может быть рассмотрено в качестве признака токсического действия ^{13}C -линолевой кислоты.

Гепатотоксичность кандидатных лекарственных средств традиционно оценивают по возрастанию уровня активности аспартат- и аланинаминотрансфераз, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы в сыворотке крови, а также уровню общего билирубина (табл. 5).

Произошло небольшое снижение уровня печеночных ферментов в сыворотке крови на первой неделе эксперимента при дозировке испытуемого соединения 5 мг/кг, тогда как на второй неделе эксперимента это снижение становится достоверным во всех группах. В случае щелочной фосфатазы еще большее падение активности в крови наблюдали при дозировке испытуемого соединения 25 мг/кг, однако в случае аминотрансфераз, напротив, наблюдается восстановление показателей активности на второй неделе эксперимента, сниженное на первой неделе.

Введение испытуемого соединения в обеих дозировках достоверно снижает уровень общего билирубина в крови как на первой, так и на второй неделе эксперимента (кроме группы самцов на второй неделе). Это наблюдение показывает, что испытуемое соединение не только не обладает гепатотоксичностью, но и может быть рассмотрено в качестве гепатопротектора.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение функциональной пригодности разрабатываемых дыхательных тестов на мелких лабораторных животных осложнено тем, что отбор образцов выдыхаемого воздуха в строго заданных объемах у этих животных технически сложен. Поэтому испытания клинической эффективности дыхательных тестов с применением разрабатываемых соединений планируется проводить непосредственно на больных по окончании развернутых токсикологических испытаний. Аналогичный прецедент имел место при разработке уреазного дыхательного теста для выявления *H. pylori* с помощью ^{14}C -мочевина [2].

Исследования острой токсичности ^{13}C -линолевой и ^{13}C -линоленовой кислот при однократном внутрижелудочном способе введения мышам линии BALB/c и крысам линии Wistar в дозах, в 500–2500 раз превышающих диагностическую, не выявили признаков общей интоксикации, симптомов раздражения желудочно-кишечного тракта в обоих случаях. Полностью отсутствовали случаи гибели мышей и крыс.

Исследования субхронической токсичности при пероральном введении ^{13}C -линолевой кислоты крысам линии Wistar обоего пола в дозах 5 и 25 мг/кг (5- и 25-кратные диагностические дозы) ежедневно в течение 2 недель также не показали явного влияния на общее состояние и поведение животных и их функционального состояния.

Более того, испытуемые соединения в указанных дозировках, превышающих терапевтические дозы,

рекомендованные для человека, оказывали благотворное действие, что отражалось на уровне гематологических и биохимических показателей крови: происходило более или менее кратковременное снижение уровня лейкоцитов и тромбоцитов крови, не выходящее за пределы нормальных значений, а также снижение активности щелочной фосфатазы, аминотрансфераз, лактатдегидрогеназы и билирубина. Указанные эффекты имели дозовую зависимость, позволяя предположить, что в случае применения испытываемых соединений в терапевтических дозах отмеченные эффекты будут сведены к нулю. Аналогичные эффекты для немеченных

изотопами линолевой и линоленовой кислот описаны в литературе [17].

ВЫВОДЫ

Синтезированные согласно способу, описанному в патенте РФ № 2630691 «Способ синтеза линолевой и линоленовой кислот, меченных изотопами углерода ^{13}C и ^{14}C », ^{13}C -линолевая и ^{13}C -линоленовая кислоты оказались безвредными для животных в дозах, планируемых для перорального введения, и могут быть рекомендованы к доклиническим и клиническим испытаниям.

Литература

1. Savarino V, Vigneri S, Celle G. The ^{13}C urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 1999; 45 (suppl. 1): 18–23.
2. Balán H, Gold CA, Dworkin HJ, McCormick VA, Freitas JE. Procedure Guideline for Carbon-14-Urea Breath Test. *J Nucl Med*. 2016; 39 (11): 2012–14.
3. Zhou Q, Li L, Ai Y, Pan Z, Guo M, Han J. Diagnostic accuracy of the ^{14}C -urea breath test in *Helicobacter pylori* infections: a meta-analysis. *Wien Klin Wochenschr*. 2017; 129 (1–2): 38–45.
4. Эльман А. Р., Рапопорт С. И. Стабильно-изотопная диагностика в России: итоги и перспективы. ^{13}C -препараты, приборы, методы. *Клин. мед.* 2014; 92 (7): 5–11.
5. Modak AS. Stable isotope breath tests in clinical medicine: A review. *J Breath Res*. 2007; 1 (1): R1–R13.
6. Musialik J, Jonderko K, Kasicka-Jonderko A, Buschhaus M. $^{13}\text{CO}_2$ breath tests in non-invasive hepatological diagnosis. *Prz Gastroenterol*. 2015; 10 (1): 1–6.
7. Mizrahi M, Lalazar G, Adar T, Raz I, Ilan Y. Assessment of insulin resistance by a ^{13}C glucose breath test: A new tool for early diagnosis and follow-up of high-risk patients. *Nutr J*. 2010; (9): 25. DOI:10.1186/1475-2891-9-25.
8. Эльман А. Р., Корнеева Г. А., Носков Ю. Г., Хан В. Н., Шишкина Е. Ю., Негримовски В. М. и др. Синтез продуктов, меченных изотопом ^{13}C , для медицинской диагностики. *Российский химический журнал*. 2013; LVII (5–2): 3–24.
9. Giannini EG, Alberto F, Paolo B, Federica B, Federica M. ^{13}C -galactose breath test and ^{13}C -aminopyrine breath test for the study of liver function in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005; 3 (3): 279–85.
10. Horowitz M, O'Donovan D, Jones KL, Feinle C, Rayner CK, Samsom M. Gastric emptying in diabetes: Clinical significance and treatment. *Diabet Med*. 2002; 19 (3): 177–94.
11. Титов В. Н. Клиническая биохимия жирных кислот, липидов и липопротеинов. Гиполипидемическая терапия и профилактика атеросклероза. Клинико-лабораторный консилиум. 2014; (1): 4–29.
12. Малышева А. О., Кодина Г. Е., Вороницкая Н. Н., Графскова Т. А., Семоненко Н. П. Определение качества радиофармацевтического препарата «Пирфотех, 99m Tc» в медицинских учреждениях. МОБИ-ХимФарма. 2017; с. 103. Доступно по ссылке: <http://mobi-chem.org/arithiv.html>.
13. Сазонова С. И., Ильюшенкова Ю. Н., Лишманов Ю. Б. Методика радионуклидного исследования воспалительных процессов в сердце. *Сибирский медицинский журнал*. 2015; 30 (4): 32–5.
14. Поздеев В. В., Тынько Я. Я., Морозова Г. В., Быченко А. Б., Бирюкова Ю. К., Шевелев А. Б., авторы; ООО «ГК НАШ МИР» (RU), патентообладатель. Способ синтеза линолевой и линоленовой кислот, меченных изотопами углерода ^{13}C и ^{14}C . Патент РФ № 2630691. 12.09.2017.
15. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005; 832 с.
16. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2003; 312 с.
17. Teng H, Lin Q, Li K, Yuan B, Song H, Peng H, et al. Hepatoprotective effects of raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) seed oil and its major constituents. *Food Chem Toxicol*. 2017; (110): 418–24.

References

1. Savarino V, Vigneri S, Celle G. The ^{13}C urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 1999; 45 (suppl. 1): 18–23.
2. Balán H, Gold CA, Dworkin HJ, McCormick VA, Freitas JE. Procedure Guideline for Carbon-14-Urea Breath Test. *J Nucl Med*. 2016; 39 (11): 2012–14.
3. Zhou Q, Li L, Ai Y, Pan Z, Guo M, Han J. Diagnostic accuracy of the ^{14}C -urea breath test in *Helicobacter pylori* infections: a meta-analysis. *Wien Klin Wochenschr*. 2017; 129 (1–2): 38–45.
4. Eman AR, Rapoport SI. Stabil'no-izotopnaja diagnostika v Rossii: itogi i perspektivy. ^{13}C -preparaty, pribory, metody. *Klin med*. 2014; 92 (7): 5–11. Russian.
5. Modak AS. Stable isotope breath tests in clinical medicine: A review. *J Breath Res*. 2007; 1 (1): R1–R13.
6. Musialik J, Jonderko K, Kasicka-Jonderko A, Buschhaus M. $^{13}\text{CO}_2$ breath tests in non-invasive hepatological diagnosis. *Prz Gastroenterol*. 2015; 10 (1): 1–6.
7. Mizrahi M, Lalazar G, Adar T, Raz I, Ilan Y. Assessment of insulin resistance by a ^{13}C glucose breath test: A new tool for early diagnosis and follow-up of high-risk patients. *Nutr J*. 2010; (9): 25. DOI:10.1186/1475-2891-9-25.
8. Elman AR, Korneeva GA, Noskov YuG, Khan VN, Shishkina EYu, Negrimovski VM, i dr. Sintez produktov, mechennyh izotopom ^{13}S , dlja medicinskoj diagnostiki. *Rossijskij himicheskij zhurnal*. 2013; LVII (5–2): 3–24. Russian.
9. Giannini EG, Alberto F, Paolo B, Federica B, Federica M. ^{13}C -galactose breath test and ^{13}C -aminopyrine breath test for the study of liver function in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005; 3 (3): 279–85.
10. Horowitz M, O'Donovan D, Jones KL, Feinle C, Rayner CK, Samsom M. Gastric emptying in diabetes: Clinical significance and treatment. *Diabet Med*. 2002; 19 (3): 177–94.
11. Titov VN. Klinicheskaja bihimija zhirnyh kislot, lipidov i lipoproteinov. Gipolipidemicheskaja terapija i profilaktika ateroskleroza. *Kliniko-laboratornyj konsilium*. 2014; (1): 4–29. Russian.
12. Malysheva AO, Kodina GE, Voronitskaya NN, Grafskova TA, Semonenko NP. Opredelenie kachestva radiofarmaceuticheskogo preparata «Pirfoteh, 99m Tc» v medicinskih uchrezhdenijah. *MOBI-HimFarma*. 2017; s. 103. Available from: <http://mobi-chem.org/arithiv.html>.

- org/arhiv.html. Russian.
13. Sazonova SI, Ilyushenkova YuN, Lishmanov YuB. Metodika radionuklidnogo issledovaniya vospalitel'nyh processov v serdce. Sibirskij medicinskij zhurnal. 2015; 30 (4): 32–5. Russian.
 14. Pozdeev VV, Tyno YYa, Morozova GV, Bychenko AB, Biryukova YuK, Shevelev AB, avtory; OOO «GK NASH MIR» (RU), patentoobladatel'. Synthesis method of linoleum and linolenic acids, marked by carbon compounds ^{13}C and ^{14}C . Patent RF № 2630691. 12.09.2017.
 15. Habriev RU. Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskikh veshhestv. M.: Medicina, 2005; 832 s. Russian
 16. Rebrova OYu. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA. M.: MediaSfera, 2003; 312 s. Russian
 17. Teng H, Lin Q, Li K, Yuan B, Song H, Peng H, et al. Hepatoprotective effects of raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) seed oil and its major constituents. Food Chem Toxicol. 2017; (110): 418–24.

МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК: СОВПАДЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНЫХ ВЕЛИЧИН И РАЗЛИЧИЯ АБСОЛЮТНЫХ

О. П. Балановский^{1,2,3}✉, Ж. А. Кагазежева^{1,2}, М. В. Олькова²

¹ Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова, Москва, Россия

² Медико-генетический научный центр, Москва, Россия

³ Биобанк Северной Евразии, Москва, Россия

Измерение концентрации ДНК является базовым методом, от надежности которого зависит эффективность дальнейшего хранения и использования образцов. Существует несколько широко распространенных и хорошо зарекомендовавших себя способов измерения концентрации ДНК, однако степень их согласованности друг с другом изучена недостаточно. Целью работы было измерить концентрации одних и тех же образцов разными методами и провести сравнительный анализ полученных результатов. В двух независимых экспериментах, суммарно включивших 100 образцов геномной ДНК, сравнивали три метода определения концентрации ДНК: спектрофотометрический (Nanodrop), флуориметрический (Qubit) и ПЦР в реальном времени (Quantifier). Выявлено, что значения концентрации ДНК, полученные разными методами, хорошо коррелируют друг с другом (коэффициенты корреляции составляют 0,98–0,99). Однако при такой отличной корреляции относительных величин концентрации абсолютные величины, полученные разными методами, варьируют значительно, вплоть до двукратных различий. Спектрофотометрический метод дает наиболее высокие концентрации, ПЦР в реальном времени — промежуточные, а флуориметрический — наиболее низкие. Различия в результатах более выражены для образцов с низкой концентрацией. Мы рекомендуем учитывать наличие этих систематических различий между результатами измерения концентрации ДНК, полученными разными методами.

Ключевые слова: концентрация ДНК, методы измерения, ПЦР в реальном времени, спектрофотометрический метод, флуориметрический метод

Финансирование: исследование выполнено в рамках Государственного задания для Медико-генетического научного центра (эксперимент 1) и при поддержке гранта РНФ 17-14-01345 (эксперимент 2).

Информация о вкладе авторов: О. П. Балановский — дизайн исследования, анализ данных, написание текста статьи; Ж. А. Кагазежева — проведение экспериментальных работ; М. В. Олькова — проведение экспериментальных работ, подбор литературы.

Соблюдение этических стандартов: исследование выполнено на образцах, полученных в ходе популяционно-генетических обследований генофонда и одобрено Этическим комитетом Медико-генетического научного центра (протокол № 3/1 от 5 сентября 2018 г.). Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и публикацию данных.

✉ **Для корреспонденции:** Олег Павлович Балановский
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119991; balanovsky@inbox.ru

Статья получена: 21.06.2019 **Статья принята к печати:** 27.06.2019 **Опубликована онлайн:** 30.06.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.043

METHODS FOR DNA QUANTIFICATION YIELD SIMILAR RELATIVE BUT DIFFERENT ABSOLUTE VALUES

Balanovsky OP^{1,2,3}✉, Kagazheva ZhA^{1,2}, Olkova MV²

¹ Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

² Research Center for Medical Genetics, Moscow, Russia

³ Biobank of North Eurasia, Moscow, Russia

DNA quantification is a routine yet important procedure that determines the efficacy of long-term sample storage and further manipulations with the sample. There are a few well-established methods for measuring DNA concentrations. However, it is still not fully clear how concordant their results are. The aim of this work was to measure DNA concentrations in a set of samples using different quantification methods and to compare the obtained values. In 2 independent experiments, a total of 100 genomic DNA samples were analyzed using 3 different DNA quantification methods, including spectrophotometry (NanoDrop), fluorometry (Qubit) and real-time PCR (Quantifier). The obtained relative concentrations demonstrated an excellent correlation (the correlation coefficients were as high as 0.98 to 0.99). However, the absolute concentrations showed a considerable variation and even a twofold difference. Spectrophotometry yielded the highest concentrations, whereas fluorometry yielded the lowest. The real-time PCR results were intermediate. The differences were more pronounced for the samples with low DNA concentrations. We recommend that such differences should be accounted for when estimating DNA concentrations using an arsenal of different quantification methods.

Keywords: DNA concentration, measurement method, real-time PCR, spectrophotometry, fluorometry

Funding: this study was part of the Government contract with the Research Center for Medical Genetics (Experiment 1). Experiment 2 was supported in part by Grant 17-14-01345 of the Russian Science Foundation.

Author contribution: Balanovsky OP conceived the study, analyzed the obtained data and wrote this manuscript; Kagazheva ZhA conducted one of the experiments; Olkova MV conducted one of the experiments and analyzed the literature.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Center for Medical Genetics (Protocol № 3/1 dated September 5, 2018). The analyzed samples were obtained during population genetic studies. All study participants gave informed consent to participate.

✉ **Correspondence should be addressed:** Oleg P. Balanovsky
Gubkina 3, Moscow, 119991; balanovsky@inbox.ru

Received: 21.06.2019 **Accepted:** 27.06.2019 **Published online:** 30.06.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.043

Измерение концентрации ДНК является базовым рутинным методом, используемым во многих лабораториях, и полученные значения используют в последующей работе с образцами ДНК — от долгосрочного хранения и биобанкирования до использования в NGS.

Существует несколько широко распространенных и хорошо зарекомендовавших себя способов измерения концентрации ДНК, удобство использования которых обусловлено в том числе наличием коммерчески доступных наборов и специализированных приборов различных

производителей. Во многих лабораториях сталкивались с тем, что значения концентрации ДНК, полученные разными методами, порой плохо согласуются, а существующие по данному вопросу литературные источники [1–6] указывают на то, что разные методы имеют ограничения и особенности применения, которые не всегда изучены. Массовые измерения концентрации геномной ДНК и геномных библиотек проводят, например, перед проведением полногеномного секвенирования, а во многих биобанках — при принятии образцов и мониторинге их сохранности. Выбор оптимального метода измерения концентрации ДНК, выявление его особенностей и сопоставимости с другими методами являются одной из задач, стоящих перед нашим коллективом в процессе работы с обширными коллекциями Биобанка Северной Евразии [7], а также при выполнении ряда популяционных проектов. Можно предположить, что сходные задачи могут стоять и перед многими другими лабораториями. Целью работы было измерить концентрации одних и тех же образцов разными методами и провести сравнительный анализ полученных результатов: оценить воспроизводимость каждого метода; определить степень сходства результатов, полученных разными методами; выявить закономерности в различиях между результатами, полученными этими тремя методами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В течение 2017–2018 гг. мы провели ряд экспериментов, сравнивая результаты измерений концентрации ДНК, полученные разными методами на одних и тех же образцах. Использовали три наиболее широко распространенных метода определения концентрации ДНК: а) спектрофотометрический метод, позволяющий оценить качество и количество ДНК по уровню поглощения образцом волн определенной длины с помощью Nanodrop; б) флуориметрический метод с использованием флуоресцентных красителей (Qubit); в) ПЦР в реальном времени (Human DNA Quantifier).

Все эксперименты демонстрировали сходную картину, но в данной статье для краткости будут приведены результаты только двух из них, выполненных наиболее тщательно и с контролем наибольшего числа параметров: эксперимента 1 и эксперимента 2. Оба эксперимента проведены на популяционных образцах, хранящихся в Биобанке Северной Евразии и выделенных фенол-хлороформным методом.

В эксперименте 1 использовали 49 образцов ДНК. Концентрация образцов была предварительно оценена с помощью Qubit и для высококонцентрированных образцов уменьшена до значений, не превышающих 50 нг/мкл, поскольку набор Human Quantifier (при использовании внутренних стандартов в строгом соответствии с инструкцией производителя) гарантирует точные измерения при концентрациях до 55 нг/мкл. Для этих образцов проводили измерение концентрации ДНК методом спектрофотометрии с помощью Nanodrop (в трех повторностях для каждого образца), методом флуориметрии с помощью Qubit (в трех повторностях) и методом ПЦР в реальном времени с помощью Human DNA Quantifier (в связи с высокой стоимостью реактивов этот эксперимент проводили для половины образцов в двух повторностях, и поскольку корреляция между ними составила 0.99, для второй половины образцов провели в одной повторности).

Спектрофотометрические измерения осуществляли на приборе NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific; США) в строгом соответствии с инструкциями производителя. Забор образца осуществляли автоматической пипеткой объемом 1–10 мкл Research Plus (Eppendorf; Германия). Концентрацию ДНК измеряли в образце объемом 2 мкл при температуре 20 °C.

Флуориметрические измерения проводили на приборе Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific; США). При работе с прибором использовали тонкостенные пробирки для флуориметра Qubit™ объемом 0,5 мл (Thermo Fisher Scientific; США). Концентрацию ДНК измеряли с помощью набора Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific; США) в строгом соответствии с инструкциями производителя [7]. Забор образцов осуществляли автоматической пипеткой Research Plus объемом 0,1–2,5 мкл (Eppendorf; Германия). Концентрацию ДНК измеряли в образце объемом 2 мкл при температуре 20 °C.

Измерение концентрации методом ПЦР в реальном времени проводили на приборе 7500 Real-Time PCR System for Human Identification (Applied Biosystems; США) с использованием набора Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific; США) в строгом соответствии с инструкциями производителя. Для амплификации использовали по 2 мкл образца ДНК. Забор образца осуществляли автоматической пипеткой Research Plus объемом 0,1–2,5 мкл (Eppendorf; Германия).

В эксперименте 2 использовали 51 образец ДНК, выделенной фенол-хлороформным методом. Концентрацию ДНК во всех образцах также измеряли с помощью Nanodrop, Qubit и Quantifiler. Измерения с помощью Qubit проводили в двух повторностях, измерения остальными методами — в одной повторности. Диапазон концентраций ДНК, предварительно оцененный с помощью Qubit, в эксперименте 2 был сдвинут в большую сторону по сравнению с экспериментом 1 — от 20 до 90 нг/мкл.

Эксперименты 1 и 2 проводили разные операторы в разные периоды времени.

Первичную обработку данных и построение графиков проводили в MS Excel, расчет коэффициентов корреляций — в программе Statistica 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты эксперимента 1 представлены в табл. 1, эксперимента 2 — в табл. 2. Эксперименты однотипны, поэтому их результаты представлены на рисунке и в табл. 3 и 4 параллельно. Сначала описаны результаты более подробного эксперимента 1, а затем дано их сравнение с итогами эксперимента 2.

Прежде всего мы оценивали воспроизводимость результатов эксперимента 1 в разных повторностях для одного и того же образца, полученных одним методом. Она оказалась чрезвычайно высокой (коэффициент корреляции варьировал от 0,99 до 1,00), что свидетельствует по крайней мере об отсутствии эффекта погрешностей пипетирования в эксперименте 1. Поэтому в дальнейшем мы использовали для каждого образца средние значения его концентрации по всем повторностям.

Метод оценки концентрации, основанный на ПЦР в реальном времени (далее — Quantifiler), считают наиболее точным, поэтому мы взяли его в качестве условного стандарта и сравнили с ним результаты остальных двух методов (выбор другого стандарта не изменил бы выводов). На рис. 1А по оси абсцисс отложены концентрации,

полученные методом ПЦР в реальном времени, а по оси ординат — значения концентраций, полученные всеми тремя методами. В этом случае график для Quantifiler может

представлять собой только прямую под углом 45° (*черная линия*), которая служит «линией отсчета», но поведение графиков двух других методов представляет интерес.

Таблица 1. Результаты измерений концентрации в отдельных образцах в эксперименте 1

SampleID	Quantifiler1	Quantifiler2	Qubit1	Qubit2	Qubit3	Nanodrop1	Nanodrop2	Nanodrop3
21	10,7	10,3	6,1	5,9	5,6	11,6	13,1	12,0
22	18,3	17,6	12,2	11,2	11,4	23,7	25,0	24,1
23	36,6	33,2	24,4	24,1	24,0	51,6	51,2	49,8
24	44,2	47,8	34,0	36,2	31,9	73,7	75,2	73,2
25	64,3	58,4	47,2	45,0	49,6	101,1	104,4	102,8
31	10,2	9,8	5,5	5,4	5,6	8,6	7,9	8,0
32	18,1	18,3	11,2	11,0	10,9	15,7	16,4	17,1
33	37,0	35,7	23,6	24,5	23,4	38,6	37,6	39,5
34	44,7	47,4	32,9	30,1	31,4	51,5	54,4	51,7
35	59,2	54,4	42,1	43,3	42,6	67,8	70,7	69,4
41	10,3	9,7	5,6	6,1	5,2	8,2	7,7	7,5
42	14,8	15,5	11,6	11,0	10,9	16,3	16,9	16,2
43	28,7	27,3	22,3	23,0	22,7	35,8	35,8	36,8
44	40,1	39,8	32,8	32,3	33,5	53,2	51,5	53,4
45	59,0	55,3	45,3	45,7	46,0	70,7	71,9	71,7
51	10,1	10,5	5,9	5,7	5,5	10,0	9,3	9,3
52	20,1	20,2	11,8	11,6	11,5	19,9	19,2	19,5
53	34,2	35,8	23,2	22,0	23,4	38,4	39,4	36,3
54	47,7	44,6	31,9	33,7	34,0	59,5	57,8	58,1
71	9,0	8,8	5,3	5,4	5,1	8,1	8,1	8,4
72	15,5	15,4	9,7	10,3	10,3	17,2	17,5	17,7
73	28,2	30,6	18,5	19,5	19,1	36,3	36,1	36,3
74	42,3	44,6	34,2	27,7	30,3	54,3	52,7	54,1
75	53,0	58,1	40,6	46,3	41,9	75,2	72,1	72,6
81	10,8		5,8	5,7	5,8	9,1	9,0	9,0
82	23,1		11,8	11,6	11,8	20,4	19,3	19,5
83	32,7	32,4	21,9	21,7	21,2	36,5	37,5	36,8
84	48,3		32,0	33,6	33,9	59,7	58,0	58,3
85	63,6		45,6	46,9	47,0	77,1	80,5	80,5
91	10,9		5,7	5,8	5,8	10,2	9,8	9,8
92	19,4		11,7	11,9	10,9	22,4	23,3	23,5
93	33,9		22,2	22,9	23,0	46,2	47,0	46,0
94	51,5		36,0	35,5	36,0	70,3	70,9	69,6
95	62,2		40,3	45,3	46,6	92,3	90,2	91,5
101	10,1		5,6	5,9	5,7	10,7	10,5	11,6
102	22,4		12,5	12,3	12,2	23,8	24,6	21,9
103	39,0		22,0	23,3	22,8	50,3	50,7	50,0
104	51,9		32,2	34,0	34,1	70,4	70,6	68,0
105	63,0		44,7	46,4	46,4	95,0	92,0	95,5
111	8,3		4,5	4,7	4,7	7,0	7,5	7,7
112	17,4		10,1	10,3	10,0	14,9	14,9	16,3
113	30,2		18,0	19,6	20,2	31,5	33,0	29,8
114	43,6		28,8	28,3	30,0	45,6	44,6	46,2
115	56,9		39,3	41,8	40,5	62,8	63,3	61,4
121	9,8		5,3	5,1	4,8	10,3	9,9	10,4
122	20,5		10,4	10,9	11,2	21,0	21,8	21,9
123	36,2		22,3	22,6	23,5	43,9	43,7	42,4
124	49,4		32,6	32,3	32,0	63,0	64,2	63,9
125	56,4		41,9	41,5	42,8	84,0	82,8	81,9

Таблица 2. Результаты измерений концентрации в отдельных образцах в эксперименте 2

SampleID	Nanodrop	Qubit1	Qubit2	Quantifiler
1	67,5	45,4	50,2	56,0
2	71,9	51,2	52	56,2
3	99,1	78	65,1	78,5
4	59,2	47,5	49	48,4
8	97,1	69,7	76,2	83,7
10	76,4	67,2	65,9	68,1
11	58	46,7	43,3	46,6
12	88,7	66,8	63,7	73,1
13	59,8	42,2	40,8	48,9
14	92,4	62,1	66,1	79,8
15	78,6	50,4	51,8	62,7
16	74,3	50,7	51,4	60,5
17	72,5	29,6	48,4	43,6
18	47,5	34,6	35,5	39,0
19	84,5	59,1	59,8	63,7
20	98,5	71,2	77	83,5
21	69,9	56,4	61,3	68,5
26	66,2	45,2	33,8	62,3
27	100,1	54,9	77,9	81,3
28	97	74,1	75	79,5
29	95,6	62,8	68,1	72,4
32	58,5	39,2	40,6	41,5
33	71,3	47,4	44,3	61,1
34	82,6	43	64,1	75,3
35	101,7	69,2	74,1	86,5
37	101,6	73,3	74	84,5
44	101,7	49,8	48,3	70,2
46	99,2	86	63,6	93,9
48	101,7	70,7	78,5	80,1
49	50,9	36,5	37,5	41,2
51	50,8	27,4	29,8	34,8
52	48,1	38,7	42,2	50,3
53	52,6	31,9	46,1	54,4
54	27,2	18,3	15,9	23,1
55	52,5	34,6	36,8	36,7
56	55,8	32,7	34,7	72,3
57	50,2	31,2	35,8	50,1
58	62,7	58,2	50,9	28,5
59	36,3	23,2	26,7	25,7
60	18,5	11,4	11,9	31,9
61	34,8	22,2	25,9	27,1
62	73,3	28,2	55,9	66,6
63	112,5	50	90,2	92,2
65	54,1	21,7	36	42,3
72	63,3	42,9	50,6	53,4
73	66,9	40,1	36,5	50,0
74	68,9	40,2	47,4	50,4
75	41,1	25,4	24,7	29,1
76	75	43,3	51,4	63,8
77	71,7	51,1	50,4	61,2
79	99,7	64,8	64,9	74,9

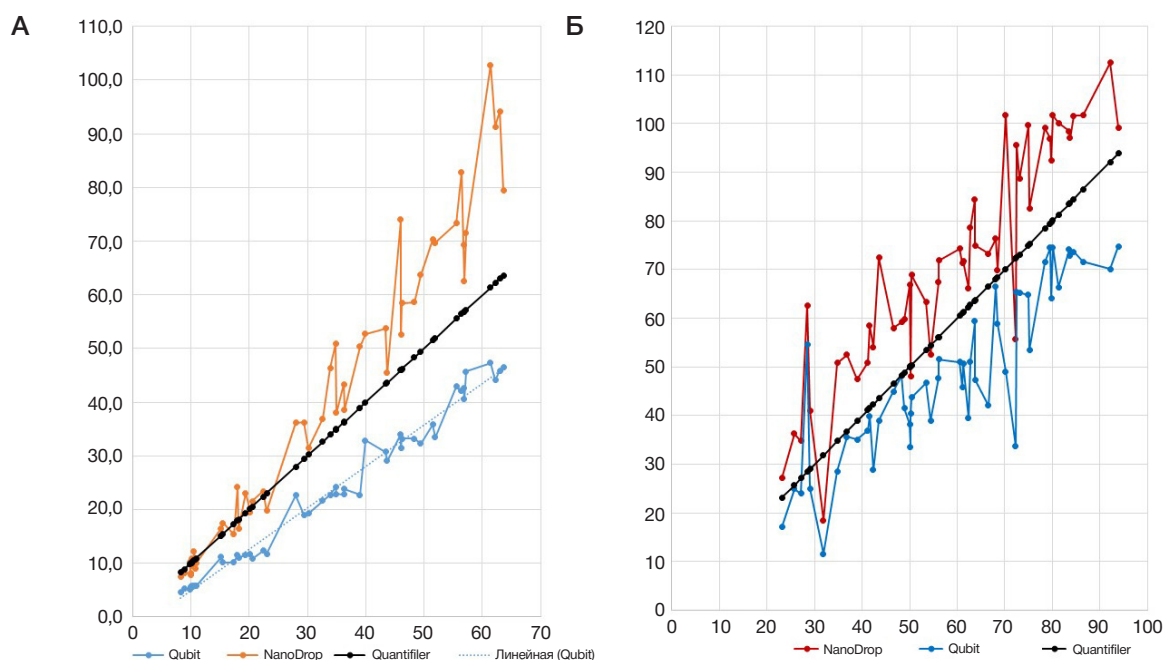


Рис. 1. Сравнение концентраций ДНК, полученных разными методами, для отдельных образцов в эксперименте 1 (А); в эксперименте 2 (Б). По оси абсцисс: значения концентрации, полученные с помощью Quantifiler. По оси ординат: значения концентрации, полученные с помощью Quantifiler (черная линия), Qubit (синяя линия) и Nanodrop (красная линия)

График для Nanodrop (рис. 1А; красная линия) построен на значениях, в целом сходных с Quantifiler, но они несколько более высокие и со стохастическими колебаниями («биения» графика). Отметим, что завышение результатов, полученных с помощью Nanodrop, по сравнению с результатами Quantifiler было отмечено для образцов с концентрациями выше 20 нг/мкл, а для более низких концентраций результаты двух методов выглядят чрезвычайно близкими.

Если красный график (Nanodrop) расположен выше черной линии (Quantifiler), то синий график (Qubit) — ниже ее. Действительно, для всех образцов концентрации, измеренные с помощью Qubit, оказываются ниже концентраций, полученных с помощью Quantifiler. При сравнении с Nanodrop результаты Qubit выглядят более устойчивыми (график более ровный). Хотя на первый

взгляд создается впечатление, что график Qubit просто смещен вниз (результаты занижены на фиксированную величину), но линия тренда Qubit (синяя пунктирная линия) показывает, что это не так: график результатов Qubit отличается от графика результатов Quantifiler не только систематическим занижением, но и тангенсом угла наклона.

После рассмотрения результатов на качественном уровне перейдем к количественному сравнению. В табл. 3 (значения над диагональю) представлены коэффициенты корреляции между результатами, полученными всеми тремя методами. Эти коэффициенты оказались велики (не ниже 0,98), демонстрируя отличную корреляцию между концентрациями, оцененными разными методами. Однако при сравнении средних величин картина уже иная (табл. 4). Прежде всего, концентрации, измеренные

Таблица 3. Коэффициенты корреляции между значениями концентрации, полученными разными методами. Над диагональю: эксперимент 1. Под диагональю: эксперимент 2

	Quantifiler	Qubit	Nanodrop
Quantifiler	1	0,99	0,98
Qubit	0,93	1	0,98
Nanodrop	0,91	0,88	1

Таблица 4. Средние значения концентрации, полученные разными методами

		Quantifiler	Qubit	Nanodrop	Qubit/Quantifiler	Nanodrop/Quantifiler
Эксперимент 1	Все образцы	33,1	22,7	41,3	0,68	1,25
	lower conc (n = 24)	17,0	10,4	18,0	0,61	1,05
	higher conc (n = 25)	48,6	34,5	63,8	0,71	1,31
	conc_range1 (n = 10)	9,9	5,5	9,3	0,55	0,94
	conc_range2 (n = 10)	19,0	11,2	19,7	0,59	1,04
	conc_range3 (n = 10)	33,6	22,2	40,8	0,66	1,22
	conc_range4 (n = 10)	46,6	32,6	59,9	0,70	1,29
	conc_range5 (n = 10)	59,2	44,2	80,8	0,75	1,36
Эксперимент 2	Все образцы	59,0	49,2	71,4	0,83	1,21

с помощью Qubit, оказываются значительно (примерно в полтора раза) ниже концентраций, измеренных с помощью Quantifiler, а измеренные с помощью Nanodrop — наоборот, на 25% выше концентраций Quantifiler. Более того, степень выраженности различий в концентрациях сама зависит от концентрации: когда выборка была поделена нами на две подвыборки равного объема, но разной средней концентрации, то соотношение средних концентраций Qubit/Quantifiler составило 61% для образцов с низкими концентрациями и 71% для образцов с более высокими концентрациями (табл. 4; различия, согласно критерию Манна–Уитни, достоверны при $p = 0,01$). Чтобы исследовать закономерность зависимости расхождения измерений, сделанных разными методами, от концентрации ДНК более подробно, мы разделили нашу выборку на 5 подвыборок по степени возрастания концентрации и рассчитали соотношение концентраций Qubit/Quantifiler (табл. 4). Несмотря на малый объем подвыборок (по 10 образцов), была выявлена четкая закономерность: соотношение концентраций, полученных двумя методами, монотонно увеличивается от 55% (т. е. двукратных различий при низких концентрациях) до 75% (т. е. различий на четверть при высоких концентрациях).

Все описанные результаты относились к эксперименту 1. Что касается эксперимента 2, то график индивидуальных образцов (рис. 1Б) демонстрирует ту же закономерность: по сравнению с оценкой концентрации, полученной методом ПЦР в реальном времени (Quantifiler), Nanodrop дает завышенные концентрации (*красный график*), а Qubit — заниженные (*синий график*). Обращает на себя внимание, что статистический шум (хаотичность графиков) выражен в эксперименте 2 намного сильнее, что мы относим к «эффекту оператора». Количественный анализ результатов эксперимента 2, как и для эксперимента 1, выявляет высокую корреляцию результатов, полученных разными методами. Но эффект меньшего опыта работы оператора в эксперименте 2 проявляется и в этом случае: коэффициенты корреляции, хотя и высоки (0,88–0,93), все же явно ниже, чем в эксперименте 1 (табл. 3; значения под диагональю). Сравнение средних значений, как и в эксперименте 1, выявило значительное расхождение между методами: Qubit на 20% занижает, а Nanodrop на 20% завышает концентрации по сравнению с Quantifiler. Единственное, что не было выявлено в эксперименте 2, — зависимость соотношения концентраций, оцененных разными методами, от самой концентрации. Мы относим это к большей экспериментальной погрешности в эксперименте 2: в результате «эффекта оператора» эта закономерность не проявляется при данном объеме выборки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оба эксперимента, проведенные в разное время разными операторами с разным опытом работы и на разных образцах, выявили одинаковые закономерности: концентрации ДНК, измеренные разными методами, хорошо скоррелированы друг с другом, но значительно различаются по оцениваемой ими величине концентрации ДНК. Иными словами, разные методы определения концентрации ДНК дают хорошую согласованность относительных, но резкое различие абсолютных величин концентрации ДНК. Более того, чем ниже концентрация, тем более существенными становятся эти различия между методами. Это означает, что относительные

значения концентрации, полученные любым из трех использованных методов, достаточно надежны и могут использоваться для сравнения с другими образцами, но эти образцы обязательно должны быть измерены тем же самым методом. А вот совместное использование в одном исследовании значений концентрации, полученных разными методами, представляет собой проблему. Можно было бы предложить коэффициенты пересчета (значения последних двух столбцов в табл. 4 могут выступать в этой роли), но такой пересчет будет сложным, поскольку коэффициент пересчета сам зависит от концентрации.

В ранее проведенных работах, посвященных сравнению методов измерения концентрации ДНК, были выявлены как согласованность [1], так и различия между разными методами [3, 4]. Особенностью нашего исследования стало использование большого числа образцов (суммарно в обоих экспериментах их 100, тогда как в большинстве аналогичных работ — 3–6 образцов), что позволило провести статистический анализ и выявить зависимость степени согласованности методов от концентрации.

Отметим, что, исходя из особенностей методов, можно было ожидать разное соотношение. С одной стороны, значения, полученные методом ПЦР в реальном времени (Quantifiler), могут быть ниже полученных флуориметрическим методом (Qubit), поскольку ПЦР в реальном времени оценивает только эффективную концентрацию ДНК (ДНК, вступающую в ПЦР, т. е. фрагменты достаточной длины и без повреждений), тогда как Qubit оценивает всю двухцепочечную ДНК. С другой стороны, значения, полученные методом ПЦР в реальном времени, могут быть выше полученных флуориметрически, так как в процесс ПЦР вовлечены как двухцепочечные, так и одноцепочечные нити ДНК каждого из образцов, а флуориметр получает информацию о концентрации лишь двухцепочечной ДНК в образце. Что касается завышенных концентраций ДНК при спектрофотометрическом измерении по сравнению с измерением концентрации методом ПЦР в реальном времени, то картину можно объяснить влиянием примесей фенола и белков. Большее значение оказывают примеси фенола, так как пик спектра поглощения фенола приходится на 270 нм и накладывается на пик поглощения ДНК при длине волны 260 нм.

В какой-то мере различия между разными методами можно объяснить используемыми стандартами (ДНК известной концентрации, входящей в набор). И действительно, при измерении с помощью Qubit стандарта Quantifiler (его концентрация заявлена производителем равной 200 нг/мкл) выявлена концентрация, на 5–10% ниже заявленной. Отметим, что и Quantifiler, и Qubit в настоящее время производят в одной и той же компании — Thermo Fisher Scientific [8]. Проблема со стандартами Quantifiler была отмечена в одной из предыдущих работ. Впрочем, даже заменой используемых стандартов проблему не решить, поскольку разница в результатах методов не постоянна, а зависит как минимум от концентрации ДНК образца.

Различия в результатах методов могут зависеть и от других факторов, связанных с условиями наших экспериментов. Мы работали на ДНК, выделенной фенол-хлороформным методом, в диапазоне концентраций 5–100 нг/мкл и имеющей сравнительно низкую степень фрагментации. Мы предполагаем, что обнаруженные нами закономерности простираются и на образцы ДНК, выделенной другими методами и имеющей разную степень

сохранности, но на измерение концентраций таких образцов могут действовать дополнительные факторы, которые могли не проявиться в наших экспериментах.

Отметим, что спектрофотометрическое определение с помощью Nanodrop, не пользующееся в большинстве лабораторий репутацией надежного метода определения концентрации, в наших экспериментах зарекомендовало себя неожиданно хорошо: хотя степень погрешности и несколько выше, чем для Qubit (см. рис.), коэффициенты корреляции и с Qubit, и с Quantifiler чрезвычайно высоки (табл. 3).

Мы продемонстрировали также значение «эффекта оператора»: один и тот же метод, проведенный на одном и том же оборудовании и по одной и той же методике, но разными руками обладает разной воспроизводимостью. Это согласуется с результатами, полученными нами ранее [6].

Хотя мы не наблюдали систематической ошибки в работе двух операторов, погрешности измерений операторами с разным опытом работы значительно различаются даже в условиях тщательно проводимого эксперимента. Можно предположить, что в условиях рутинной лабораторной работы и точность измерений,

и различия в точности измерений между операторами оказываются еще выше.

ВЫВОДЫ

При измерениях концентрации ДНК для одного и того же большого набора образцов, но разными методами выявлено, что значения концентрации ДНК, измеренной разными методами, хорошо коррелируют друг с другом, но значительно различаются по оцениваемой ими величине концентрации ДНК: спектрофотометрический метод (Nanodrop) дает более высокие значения концентрации, ПЦР в реальном времени (Quantifiler) — промежуточные, а флуориметрический (Qubit) — более низкие, причем различия могут быть двукратными. Различия в результатах разных методов более выражены для образцов с низкой концентрацией. Мы рекомендуем учитывать наличие этих систематических различий между результатами измерения концентрации ДНК, полученными разными методами. Таким образом, при указании концентрации ДНК необходимо также уточнять, каким методом и с помощью какого набора реактивов она была определена.

Литература

1. Bhat S, Curach N, Mostyn T, Bains GS, Griffiths KR, et al. Comparison of methods for accurate quantification of DNA mass concentration with traceability to the international system of units. *Anal Chem.* 2010 Sep 1; 82 (17): 7185–92. DOI: 10.1021/ac100845m.
2. Li X, Wu Y, Zhang L, Cao Y, Li Y, Li J, et al. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Anal Biochem.* 2014 Apr 15; (451): 18–24. DOI: 10.1016/j.ab.2014.01.016.
3. Nielsen K, Mogensen HS, Hedman J, Niederstätter H, Parson W, Morling N. Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Science International: Genetics.* 2008; 2 (3): 226–30.
4. He HJ, Stein EV, DeRose P, Cole KD. Limitations of methods for measuring the concentration of human genomic DNA and oligonucleotide samples. *Biotechniques.* 2018 Feb 1; 64 (2): 59–68. DOI: 10.2144/btn-2017-0102.
5. Nakayama Y, Yamaguchi H, Einaga N, Esumi M. Pitfalls of DNA Quantification Using DNA Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. *PLoS ONE.* 2016; 11 (3): e0150528. DOI: 10.1371/journal.pone.0150528.
6. Беленикин М. С., Галахова А. А., Балановская Е. В., Балановский О. П. Оценка воспроизводимости флуориметрического измерения концентрации ДНК. *Генетика.* 2018; (54): 113–6. DOI: 10.1134/S0016675818130040.
7. Балановская Е. В., Жабагин М. К., Агджоян А. Т., Чухряева М. И., Маркина Н. В., Балаганская О. А. и др. Популяционные биобанки: принципы организации и перспективы применения в геногеографии и персонализированной медицине. *Генетика.* 2016; (12): 1371–87.
8. Qubit dsDNA BR Assay Kits Manual (MAN0002325, Revision: A.0). Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf.

References

1. Bhat S, Curach N, Mostyn T, Bains GS, Griffiths KR, et al. Comparison of methods for accurate quantification of DNA mass concentration with traceability to the international system of units. *Anal Chem.* 2010 Sep 1; 82 (17): 7185–92. DOI: 10.1021/ac100845m.
2. Li X, Wu Y, Zhang L, Cao Y, Li Y, Li J, et al. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Anal Biochem.* 2014 Apr 15; (451): 18–24. DOI: 10.1016/j.ab.2014.01.016.
3. Nielsen K, Mogensen HS, Hedman J, Niederstätter H, Parson W, Morling N. Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Science International: Genetics.* 2008; 2 (3): 226–30.
4. He HJ, Stein EV, DeRose P, Cole KD. Limitations of methods for measuring the concentration of human genomic DNA and oligonucleotide samples. *Biotechniques.* 2018 Feb 1; 64 (2): 59–68. DOI: 10.2144/btn-2017-0102.
5. Nakayama Y, Yamaguchi H, Einaga N, Esumi M. Pitfalls of DNA Quantification Using DNA Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. *PLoS ONE.* 2016; 11 (3): e0150528. DOI: 10.1371/journal.pone.0150528.
6. Belenikin MS, Galahova AA, Balanovskaya EV, Balanovsky OP. Ocenka vosproizvodimosti fluometricheskogo izmereniya koncentracii DNK. *Genetika.* 2018; (54): 113–6. DOI: 10.1134/S0016675818130040. Russian.
7. Balanovskaya EV, Zhabagin MK, Agdzhoyan AT, Chukhryaeva MI, Markina NV, Balaganskaya OA, et al. Population biobanks: Organizational models and prospects of application in gene geography and personalized medicine. *Russian Journal of Genetics.* 2016; 52 (12): 1227–43.
8. Qubit dsDNA BR Assay Kits Manual (MAN0002325, Revision: A.0). Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СВЕРТОЧНОЙ НЕЙРОННОЙ СЕТЬЮ ПО ДАННЫМ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАФИИ

В. Б. Савинов, С. А. Ботман, В. В. Сапунов, В. А. Петров, И. Г. Самусев, Н. Н. Шушарина ✉

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия

Существующие методы определения эмоционального состояния, основанные на регистрации тональности голоса и мимики, не обладают достаточной точностью и специфичностью. Эти показатели можно повысить с помощью анализа биосигналов, которые не проходят через сознательные фильтры, для чего необходимо создание эффективного алгоритма определения эмоционального состояния на основании анализа электрофизиологических сигналов. Целью работы было провести бинарную классификацию валентности эмоционального состояния по данным электроэнцефалографии с использованием сверточной нейронной сети и сравнить эффективность ее работы с эффективностью метода случайного леса. В качестве подопытного был выбран здоровый 30-летний мужчина. В течение 10 сессий по 2 ч каждая с подопытного производили запись электроэнцефалограммы во время просмотра им специально сформированного набора видеофильмов. Полученный сигнал фильтровали, сегментировали и использовали для обучения классификаторов. При использовании сети удалось достичь значения F1-меры, равного 87%, что превышает показатель, полученный при использовании метода случайного леса с входными данными в виде вектора признаков (67%). Достигнутые результаты свидетельствуют о высокой перспективности применения нейронных сетей сверточного типа в общем, и предложенной архитектуры, в частности, для решения задач по распознаванию эмоционального состояния по данным электрофизиологических сигналов. Дальнейшие работы по развитию подхода могут быть направлены на оптимизацию архитектуры сети для расширения числа идентифицируемых классов, а также повышения обобщающей способности сети при работе с большим количеством испытуемых.

Ключевые слова: машинное обучение, искусственные нейронные сети, электроэнцефалограмма, эмоциональное состояние, валентность, глубокое обучение, сверточные сети

Информация о вкладе авторов: В. Б. Савинов, С. А. Ботман, В. В. Сапунов и В. А. Петров — сбор и обработка материала, написание текста статьи; И. Г. Самусев — написание, редактирование текста статьи; Н. Н. Шушарина — руководство и редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено Научно-этическим комитетом Балтийского федерального университета имени И. Канта (протокол № 7 от 26 марта 2019 г.). Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие на участие в эксперименте и публикацию результатов.

✉ **Для корреспонденции:** Наталья Николаевна Шушарина
ул. Университетская, д. 2, г. Калининград, 236006; nnshusharina@gmail.com

Статья получена: 21.03.2019 **Статья принята к печати:** 16.05.2019 **Опубликована онлайн:** 29.05.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.037

ELECTROENCEPHALOGRAM-BASED EMOTION RECOGNITION USING A CONVOLUTIONAL NEURAL NETWORK

Savinov VB, Botman SA, Sapunov VV, Petrov VA, Samusev IG, Shusharina NN ✉

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

The existing emotion recognition techniques based on the analysis of the tone of voice or facial expressions do not possess sufficient specificity and accuracy. These parameters can be significantly improved by employing physiological signals that escape the filters of human consciousness. The aim of this work was to carry out an EEG-based binary classification of emotional valence using a convolutional neural network and to compare its performance to that of a random forest algorithm. A healthy 30-year old male was recruited for the experiment. The experiment included 10 two-hour-long sessions of watching videos that the participant had selected according to his personal preferences. During the sessions, an electroencephalogram was recorded. Then, the signal was cleared of artifacts, segmented and fed to the model. Using a neural network, we were able to achieve a F1 score of 87%, which is significantly higher than the F1 score for a random forest model (67%). The results of our experiment suggest that convolutional neural networks in general and the proposed architecture in particular hold great promise for emotion recognition based on electrophysiological signals. Further refinement of the proposed approach may involve optimization of the network architecture to include more classes of emotions and improvement of the network's generalization capacity when working with a large number of participants.

Keywords: machine learning, artificial neural network, electroencephalogram, emotional state, valence, deep learning, convolutional networks

Author contribution: Savinov VB, Botman SA, Sapunov VV, Petrov VA — data acquisition and processing, manuscript preparation; Samusev IG — manuscript preparation and revision; Shusharina NN — project supervision and manuscript revision.

Compliance with ethical standards: this study was approved by the Ethics Committee of Immanuel Kant Baltic Federal University (Protocol № 7 dated March 26, 2019). The participants gave informed consent gave written informed consent to participation in the study and publication of his personal data.

✉ **Correspondence should be addressed:** Natalya N. Shusharina
Universitetskaya 2, Kaliningrad, 236006; nnshusharina@gmail.com

Received: 21.03.2019 **Accepted:** 16.05.2019 **Published online:** 29.05.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.037

Эмоции играют ключевую роль в повседневной жизни человека, оказывая значительное влияние на восприятие, принятие решений, общение между людьми. Внутреннее эмоциональное состояние может проявляться внешне (например, в тоне голоса или выражении лица), а также внутренне — в изменении физиологических параметров. Исследования, основанные на методах самооценки,

позволяют получить полезную информацию, однако такой подход имеет проблемы с достоверностью и верификацией полученных результатов [1]. Голос и выражение лица также не являются надежными индикаторами эмоций, поскольку их можно симитировать [2]. В то же время анализ физиологических сигналов позволяет обеспечить достижение более глубокого понимания основных

эмоциональных реакций и связанных с ними биологических процессов [3].

Для определения эмоционального состояния путем анализа физиологических данных чаще всего используют следующие биосигналы: кожно-гальваническую реакцию (КГР), электромиограмму (ЭМГ), частоту сердечных сокращений (ЧСС), частоту дыхательных движений, электроэнцефалограмму (ЭЭГ). Среди них наиболее интересен сигнал ЭЭГ, который отражает динамику работы коры головного мозга, где происходит формирование определенных эмоциональных реакций. Несмотря на то что ЭЭГ имеет низкое пространственное разрешение, данный метод обеспечивает достаточно высокое временное разрешение, позволяя изучать фазочастотные изменения в ответ на эмоциональные раздражители. Кроме того, снятие ЭЭГ происходит неинвазивно, быстро и не требует использования дорогостоящих расходных материалов, что делает такой метод получения биологических данных предпочтительным при изучении физиологических реакций на эмоциональные раздражители.

Как правило, работы в области распознавания эмоционального состояния на основе данных ЭЭГ связаны с классификацией сравнительно небольшого числа дискретных состояний, вызываемых специфическими стимулами. При этом чаще всего используют следующий подход: сырой ЭЭГ-сигнал фильтруют, затем из него извлекают признаки, а в конце выполняют непосредственно классификацию с использованием одного из алгоритмов машинного обучения. Важным фактором, влияющим на эффективность подобного подхода, являются конструирование и подбор надлежащих признаков — математически рассчитанных характеристик сигнала от временных, частотных и иных параметров. Обычно при создании признаков учитывают эмпирические и теоретические данные о биологии работы мозга и протекающих в нем процессах, вызываемых эмоциональными стимулами.

Далее выбранные признаки используют для формирования векторов признаков для моделей машинного обучения, таких как случайный лес, многослойный перцептрон, метод опорных векторов, метод k -ближайших соседей и пр. [4–6]. Качество классификации для подобных подходов различается в зависимости от качества входных сигналов, критериев задачи и выбора типа алгоритма. Такой подход позволяет достичь точности классификации в 77% случаев для ЭЭГ-сигнала [7] и 83% случаев при использовании дополнительных модальностей [8]. На результат значительным образом влияет выбор как модели и ее параметров, так и признаков сигнала, а также методик сокращения пространства признаков.

При альтернативном варианте решения задачи по определению эмоционального состояния по сигналам ЭЭГ используют нейронные сети сверточного типа и глубокого обучения. Нейронные сети с успехом применяют в анализе различных электрофизиологических сигналов [9]. В настоящее время анализ ЭЭГ с помощью сверточных нейронных сетей используют для решения различных медицинских задач и организации мозг–компьютерного взаимодействия: предсказания эпилептических приступов [10], детектирования волны P300 [11], распознавания эмоций [12, 13] — в том числе на открытом наборе данных DEAP [14]. Это позволяет утверждать об эффективности применения сверточных нейронных сетей для решения поставленной задачи. При этом глубокое обучение позволяет осуществлять автоматическую генерацию оптимальных признаков в процессе обучения алгоритма и

полностью исключить ручной отбор признаков. Впрочем, в некоторых работах по распознаванию эмоционального состояния с использованием нейронных сетей в качестве входных данных используют рассчитанные вне сети признаки [15], Фурье и вейвлет-образы сигнала [16, 17].

Основной целью работы было решить задачу бинарной классификации валентности эмоционального состояния по данным электроэнцефалографии путем создания и обучения нейронной сети сверточного типа, а также сравнить эффективность ее работы с алгоритмами, использующими явное формирование вектора признаков, на примере модели случайного леса.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В качестве подопытного был выбран один из участников проекта (здоровый мужчина, 30 лет, без истории психических заболеваний), на котором проводили многократные эксперименты в течение нескольких недель с применением различных стимулов, что является адаптацией известного в литературе метода [18]. Этот вариант отличается от широко распространенного подхода по рекрутингу большого числа подопытных, с каждым из которых проводят однократные экспериментальные сессии. Однако несмотря на то что все данные получают с единственного субъекта, их объем оказывается достаточно большим за счет многократного повторения экспериментов. Разумеется, эмоциональный отклик на схожие стимулы может различаться у разных людей, однако в рамках исследования это многообразие лишь усложняет поиск физиологических паттернов, соответствующих конкретным эмоциональным состояниям. Использование единственного подопытного в череде экспериментов значительно повышает интерпретируемость данных, ведь индивидуальные особенности восприятия стимулов остаются неизменными.

Первоначальный набор видеofilмов для вызова одного из двух эмоциональных состояний (положительного или отрицательного) был сформирован на основании предпочтений испытуемого. Испытуемый был знаком со всеми «эталонными» видеосюжетами, за счет чего его эмоциональное состояние при просмотре было во многом обусловлено не столько внешним стимулом, сколько внутренними особенностями психической деятельности, например воспоминаниями. Впоследствии база видеоматериалов была расширена за счет подбора дополнительных образцов, чью принадлежность к определенной категории эмоциональных стимулов определяли на основании схожести с «эталонными». Экспериментальная часть, посвященная сбору данных, заняла две недели. За это время было проведено десять сессий по два часа каждая. В рамках одной сессии испытуемый просматривал по шесть пятнадцатиминутных видео (два для каждой категории) с перерывами. Ролики не повторяли. Различные видео демонстрировали поочередно, в таком порядке: позитивное, негативное.

Для записи данных ЭЭГ использовали разработанное ранее нейроустройство [19]. Следуя стандартным практикам, были выбраны чашечные хлорсеребряные электроды (Ag/AgCl), которые использовали вместе с электропроводящим гелем. Электроды закрепляли на специальной шапочке для снятия ЭЭГ согласно системе 10–20 в позициях F3, F4, C3, C4, P3, P4, O1, O2 по монополярной схеме — электрод на позиции Fpz использовали как в качестве земли, так и в качестве

референса. Сигналы ЭЭГ снимали на частоте 250 Гц. Для выделения полезного сигнала использовали фильтры Баттерворта второго порядка на частотах 1 и 50 Гц, а также дополнительно режекторный фильтр для частоты 50 Гц.

После фильтрации данные стандартизировали (по каждому каналу отдельно) и сегментировали скользящим окном размером 2 с перекрытием 0,2 с и подавали на вход нейронной сети. Для расчета признаков использовали фильтрованный сигнал без стандартизации с аналогичной сегментацией. В качестве признаков было выбрано несколько из рекомендуемых в литературе [20]: пересечения высокого порядка (ПВП) в диапазоне от 1 до 6, мощность в полосах частот (МПЧ) для дельта, тета-, альфа-, бета- и гамма-диапазонов, а также относительная асимметрия по каналам (ОАК).

Непосредственно обучение всех моделей проходило по единой схеме: данные ЭЭГ для каждой из экспериментальных сессий размечали в зависимости от типа демонстрируемого стимула, во время которого они были получены. Использовали бинарную разметку: позитивные стимулы относили к одному классу, а негативные — к другому. Обучение нейронной сети вели методом стохастического градиентного спуска по мини-батчам (оптимизатор — Adam [21], размер мини-батча — 64, скорость обучения — 0,001, число эпох — 30) с категориальной перекрестной энтропией в качестве функции потерь. Таким образом, входной тензор имел размерность [64, 8, 500], где 64 соответствует размеру мини-батча, 8 — число каналов ЭЭГ, 500 — длительность сегмента ЭЭГ данных, взятых с перекрытием в 50 отсчетов.

Все этапы, включая регистрацию, обработку сигналов и тренировку моделей, осуществляли с помощью кода, написанного на языке *Python* с использованием библиотек *scikit-learn* и *Keras*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате эксперимента была создана нейронная сеть со следующей структурой: два сверточных слоя по 64 ядра, слой нормализации по батчу, слой активации ELU (экспоненциальная линейная функция), слой субдискретизации (по среднему, размер окна — 4, шаг — 1), два сверточных слоя по 64 ядра, слой нормализации по батчу, слой активации ReLU (блок линейной ректификации), слой субдискретизации (по максимуму, размер окна — 2, шаг — 1), два сверточных слоя по 128 ядер, слой нормализации по батчу, слой активации ReLU, слой субдискретизации (по максимуму, размер окна — 2,

шаг — 1), полносвязный слой в 256 нейронов с активацией ReLU. Во всех сверточных слоях использовали следующие параметры: размер — 3, шаг — 1, заполнение — 0. В качестве функции активации для выходного слоя использовали функцию *softmax* (нормализованную экспоненциальную функцию).

Применение нейронной сети позволило достичь значения F1-меры на уровне 87% на валидационной выборке, что значительно выше соответствующего показателя для модели случайного леса (составившего 67%). Согласно матрицам несоответствия (рис.), модель случайного леса успешно идентифицировала положительные состояния (несколько превосходя по этому параметру нейронную сеть), однако обладала низкой специфичностью для отрицательных, в то время как метод глубокого обучения с равной эффективностью идентифицировал и дифференцировал оба состояния.

Проверка работы сверточной нейронной сети на данных с предварительно отфильтрованными артефактами (электроокулография (ЭОГ)) не продемонстрировала существенных изменений точности классификации. Проведенный анализ активаций нейронной сети показал, что артефакты ЭОГ не вносят существенного вклада в классификацию сигнала.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время устоявшийся подход к анализу электрофизиологических сигналов на основе ручного выбора признаков сигнала и классических моделей машинного обучения вытесняет решения, полученные на основе нейронных сетей. Такие тенденции можно наблюдать и в области классификации эмоционального состояния. Одним из основных отличий предложенного подхода от аналогов, базирующихся на применении нейронных сетей сверточного типа, является использование в качестве входных данных сигнала напрямую без перевода его в частотное представление (например с помощью преобразования Фурье или вейвлет-преобразования).

С учетом того, что для обучения и тестирования использовали данные, полученные в рамках этой работы, невозможно сравнить эффективность разработанной сети с аналогами. Однако можно с уверенностью утверждать, что данная сеть показывает лучшие результаты по сравнению с классическим подходом. Использование сети позволяет также избавиться от ручного выбора оптимального набора признаков под конкретные решаемые задачи.

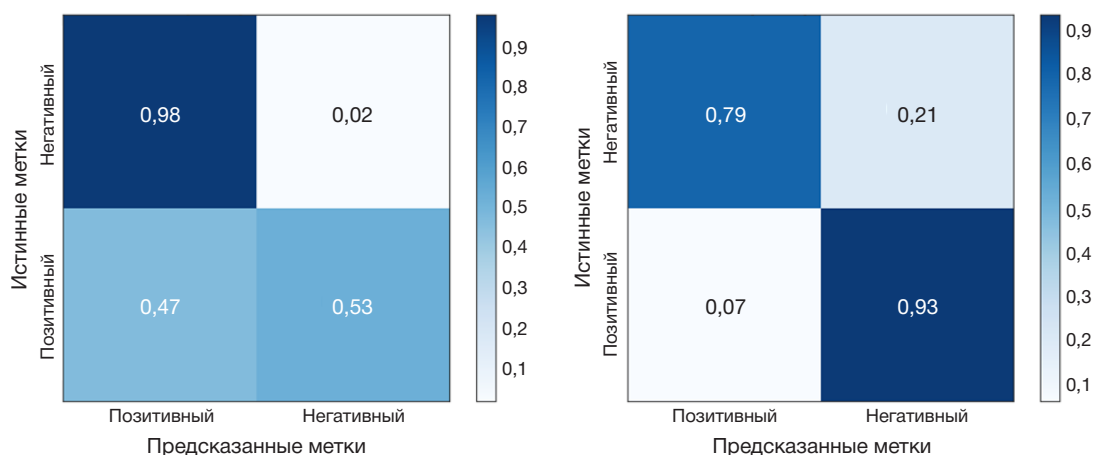


Рис. Матрицы ошибок для алгоритма случайного леса (слева) и сверточной нейронной сети (справа)

ВЫВОДЫ

Предложенный подход к классификации эмоций на основе нейронной сети сверточного типа без преобразования сигнала в частотное представление показал свою эффективность по сравнению с методом случайного леса на базе признаков

сигнала. Дальнейшее развитие данного подхода будет направлено на повышение общности, а также расширение числа распознаваемых классов эмоций. В перспективе создание эффективных методов оценки эмоционального состояния человека позволит использовать их для решения прикладных задач, в частности в психологии и маркетинге.

Литература

1. Calvo RA, D'Mello S. Affect detection: An interdisciplinary review of models, methods, and their applications. *IEEE Transactions on affective computing*. 2010; 1 (1): 18–37.
2. Jerritta S, Murugappan M, Nagarajan R, Wan K. Physiological signals based human emotion recognition: a review. *Signal Processing and its Applications (CSPA), 2011 IEEE 7th International Colloquium on*. IEEE. 2011; p. 410–5.
3. Li Q, Yang Z, Liu S, Dai Z, Liu Y. The study of emotion recognition from physiological signals. *Advanced Computational Intelligence (ICACI). 2015 Seventh International Conference on*. IEEE. 2015; p. 378–82.
4. Soroush MZ, Maghooli K, Setarehdan SK, Nasrabadi AM. Emotion classification through nonlinear EEG analysis using machine learning methods. *International Clinical Neuroscience Journal*. 2018; 5 (4): 135–49.
5. Liu J, Meng H, Nandi A, Li M. Emotion detection from EEG recordings. *The 2016 12th International Conference on Natural Computation, Fuzzy Systems and Knowledge Discovery (ICNC-FSKD)*. IEEE. 2016; p. 1722–7.
6. Ackermann P, Kohlschein C, Bitsch JA, Wehrle K, Jeschke S. EEG-based automatic emotion recognition: Feature extraction, selection and classification methods. *2016 IEEE 18th international conference on e-health networking, applications and services (Healthcom)*. IEEE. 2016; p. 1–6.
7. Mehmood RM, Du R, Lee HJ. Optimal feature selection and deep learning ensembles method for emotion recognition from human brain EEG sensors. *IEEE Access*. 2017; (5): 14797–806.
8. Yin Z, Zhao M, Wang Y, Yang J, Zhang J. Recognition of emotions using multimodal physiological signals and an ensemble deep learning model. *Computer methods and programs in biomedicine*. 2017; (140): 93–110.
9. Min S, Lee B, Yoon S. Deep learning in bioinformatics. *Briefings in bioinformatics*. 2017; 18 (5): 851–69.
10. Page A, Shea C, Mohsenin T. Wearable seizure detection using convolutional neural networks with transfer learning. *2016 IEEE International Symposium on Circuits and Systems (ISCAS)*. IEEE. 2016; p. 1086–9.
11. Cecotti H, Graser A. Convolutional neural networks for P300 detection with application to brain-computer interfaces. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*. 2011; 33 (3): 433–45.
12. Gao Y, Lee HJ, Mehmood RM. Deep learning of EEG signals for emotion recognition. *2015 IEEE International Conference on Multimedia & Expo Workshops (ICMEW)*. IEEE. 2015; p. 1–5.
13. Tripathi S, Acharya S, Sharma RD, Mittal S, Bhattacharya S. Using Deep and Convolutional Neural Networks for Accurate Emotion Classification on DEAP Dataset. *Twenty-Ninth IAAI Conference*. 2017.
14. Koelstra S, Muhl C, Soleymani M, Lee JS, Yazdani A, Ebrahimi T et al. Deap: A database for emotion analysis; using physiological signals. *IEEE transactions on affective computing*. 2012; 3 (1): 18–31.
15. Li J, Zhang Z, He H. Hierarchical convolutional neural networks for EEG-based emotion recognition. *Cognitive Computation*. 2018; 10 (2): 368–80.
16. Kwon YH, Shin SB, Kim SD. Electroencephalography based fusion two-dimensional (2D)-convolution neural networks (CNN) model for emotion recognition system. *Sensors*. 2018; 18 (5): 1383.
17. Yuan L, Cao J. Patients' eeg data analysis via spectrogram image with a convolution neural network. *International Conference on Intelligent Decision Technologies*. Cham: Springer, 2017; p. 13–21.
18. Picard RW, Vyzas E, Healey J. Toward machine emotional intelligence: Analysis of affective physiological state. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*. 2001; 23 (10): 1175–91.
19. Shusharina NN, Borchevkin DA, Sapunov VV, Petrov VA, Patrushev MV. A Wireless Portable Platform for Physiological Potentials Registration and Processing: A Unified Approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2017; 9 (7): 1178.
20. Jenke R, Peer A, Buss M. Feature extraction and selection for emotion recognition from EEG. *IEEE Transactions on Affective Computing*. 2014; 5 (3): 327–39.
21. Kingma DP, Ba J. Adam: A method for stochastic optimization. *arXiv:1412.6980*. [Preprint]. 2014 [cited 2014 Dec 22]. Available from: <https://arxiv.org/abs/1412.6980>.

References

1. Calvo RA, D'Mello S. Affect detection: An interdisciplinary review of models, methods, and their applications. *IEEE Transactions on affective computing*. 2010; 1 (1): 18–37.
2. Jerritta S, Murugappan M, Nagarajan R, Wan K. Physiological signals based human emotion recognition: a review. *Signal Processing and its Applications (CSPA), 2011 IEEE 7th International Colloquium on*. IEEE. 2011; p. 410–5.
3. Li Q, Yang Z, Liu S, Dai Z, Liu Y. The study of emotion recognition from physiological signals. *Advanced Computational Intelligence (ICACI). 2015 Seventh International Conference on*. IEEE. 2015; p. 378–82.
4. Soroush MZ, Maghooli K, Setarehdan SK, Nasrabadi AM. Emotion classification through nonlinear EEG analysis using machine learning methods. *International Clinical Neuroscience Journal*. 2018; 5 (4): 135–49.
5. Liu J, Meng H, Nandi A, Li M. Emotion detection from EEG recordings. *The 2016 12th International Conference on Natural Computation, Fuzzy Systems and Knowledge Discovery (ICNC-FSKD)*. IEEE. 2016; p. 1722–7.
6. Ackermann P, Kohlschein C, Bitsch JA, Wehrle K, Jeschke S. EEG-based automatic emotion recognition: Feature extraction, selection and classification methods. *2016 IEEE 18th international conference on e-health networking, applications and services (Healthcom)*. IEEE. 2016; p. 1–6.
7. Mehmood RM, Du R, Lee HJ. Optimal feature selection and deep learning ensembles method for emotion recognition from human brain EEG sensors. *IEEE Access*. 2017; (5): 14797–806.
8. Yin Z, Zhao M, Wang Y, Yang J, Zhang J. Recognition of emotions using multimodal physiological signals and an ensemble deep learning model. *Computer methods and programs in biomedicine*. 2017; (140): 93–110.
9. Min S, Lee B, Yoon S. Deep learning in bioinformatics. *Briefings in bioinformatics*. 2017; 18 (5): 851–69.
10. Page A, Shea C, Mohsenin T. Wearable seizure detection using

- convolutional neural networks with transfer learning. 2016 IEEE International Symposium on Circuits and Systems (ISCAS). IEEE. 2016; p. 1086–9.
11. Cecotti H, Graser A. Convolutional neural networks for P300 detection with application to brain-computer interfaces. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*. 2011; 33 (3): 433–45.
 12. Gao Y, Lee HJ, Mehmood RM. Deep learning of EEG signals for emotion recognition. 2015 IEEE International Conference on Multimedia & Expo Workshops (ICMEW). IEEE. 2015; p. 1–5.
 13. Tripathi S, Acharya S, Sharma RD, Mittal S, Bhattacharya S. Using Deep and Convolutional Neural Networks for Accurate Emotion Classification on DEAP Dataset. Twenty-Ninth IAAI Conference. 2017.
 14. Koelstra S, Muhl C, Soleymani M, Lee JS, Yazdani A, Ebrahimi T et al. Deap: A database for emotion analysis; using physiological signals. *IEEE transactions on affective computing*. 2012; 3 (1): 18–31.
 15. Li J, Zhang Z, He H. Hierarchical convolutional neural networks for EEG-based emotion recognition. *Cognitive Computation*. 2018; 10 (2): 368–80.
 16. Kwon YH, Shin SB, Kim SD. Electroencephalography based fusion two-dimensional (2D)-convolution neural networks (CNN) model for emotion recognition system. *Sensors*. 2018; 18 (5): 1383.
 17. Yuan L, Cao J. Patients' eeg data analysis via spectrogram image with a convolution neural network. *International Conference on Intelligent Decision Technologies*. Cham: Springer, 2017; p. 13–21.
 18. Picard RW, Vyzas E, Healey J. Toward machine emotional intelligence: Analysis of affective physiological state. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*. 2001; 23 (10): 1175–91.
 19. Shusharina NN, Borchevkin DA, Sapunov VV, Petrov VA, Patrushev MV. A Wireless Portable Platform for Physiological Potentials Registration and Processing: A Unified Approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2017; 9 (7): 1178.
 20. Jenke R, Peer A, Buss M. Feature extraction and selection for emotion recognition from EEG. *IEEE Transactions on Affective Computing*. 2014; 5 (3): 327–39.
 21. Kingma DP, Ba J. Adam: A method for stochastic optimization. arXiv:1412.6980. [Preprint]. 2014 [cited 2014 Dec 22]. Available from: <https://arxiv.org/abs/1412.6980>.

СЛУЧАЙ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСНОГО СПОСОБА ЛЕЧЕНИЯ ДЕКУБИТАЛЬНОЙ ЯЗВЫ У ПАЦИЕНТА В ХРОНИЧЕСКОМ КРИТИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ

А. В. Яковлева¹✉, А. А. Яковлев¹, М. В. Петрова^{1,2}, К. Ю. Крылов³

¹ Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия

² Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

У 76,72% пациентов, поступивших в реанимационные отделения Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (ФНКЦ РР) в хроническом критическом состоянии (ХКС), обусловленном различными поражениями головного мозга, были диагностированы декубитальные язвы (ДЯ), или пролежни, 3-й и/или 4-й стадии. Из них 33,41% пациентов было необходимо плановое прохождение этапа инвазивной реабилитации (нейрохирургическое вмешательство), противопоказанием к которому служило наличие ДЯ. В работе описано применение комплексного способа лечения ДЯ крестца 4-й стадии у пациента в ХКС, которому требовалось выполнение вентрикуло-перитонеального шунтирования. Описаны противопоказания к исключительно хирургическому способу закрытия ДЯ и результаты быстрого и успешного заживления ДЯ крестца 4-й стадии путем использования комплексного способа лечения.

Ключевые слова: декубитальная язва, пролежень, хирургическое лечение пролежней, комплексное лечение пролежней, шкала Бейтс–Дженсена

Информация о вкладе авторов: А. В. Яковлева и А. А. Яковлев — сбор и обработка материала, написание текста статьи; М. В. Петрова — руководство и редактирование статьи; К. Ю. Крылов — написание, редактирование текста статьи.

Соблюдение этических стандартов: пациент подписал информированное согласие на участие в исследовании и публикацию результатов.

✉ **Для корреспонденции:** Александра Витальевна Яковлева
г. Зеленоград, кв. 25, к. 452, г. Москва, 124498; avyakovleva@fncrr.ru

Статья получена: 28.03.2019 **Статья принята к печати:** 08.05.2019 **Опубликована онлайн:** 17.05.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.035

COMPLEX DECUBITUS ULCER THERAPY IN A PATIENT IN CHRONIC CRITICAL CONDITION: A CASE REPORT

Yakovleva AV¹✉, Yakovlev AA¹, Petrova MV^{1,2}, Krylov KYu³

¹ Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, Moscow, Russia

² Peoples Friendship University of Russia, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

76.72% of patients admitted to the ICU of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation (FRCC ICMR) in a chronic critical condition (CCC) associated with various types of damage to the brain were diagnosed with decubitus ulcers (DU), or bedsores, of 3rd and/or 4th stage. 33.41% of them were planned to undergo invasive rehabilitation procedures (neurosurgical intervention) that cannot be done while the patient has DU. This report describes a complex technique used to treat a 4th-stage sacrum DU in a CCC patient that needed ventriculoperitoneal shunting. We have covered contraindications to the exclusively surgical DU closing and the successful and rapid healing of the 4th-stage sacrum DU after application of the treatment technique.

Keywords: decubitalis ulcer, pressure ulcer, surgical treatment of pressure ulcers, a complex treatment of pressure ulcers, scale of Bates-Jensen

Author contribution: Yakovleva AV and Yakovlev AA — material/data collection and processing, article authoring; Petrova MV — general supervision, article editing; Krylov KYu — article authoring and editing.

Compliance with ethical standards: the patient gave written informed consent to participation in the study and publication of his personal data.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexandra V. Yakovleva
Zelenograd 25, str. 452, Moscow, 124498; avyakovleva@fncrr.ru

Received: 28.03.2019 **Accepted:** 08.05.2019 **Published online:** 17.05.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.035

Пролежни, или декубитальные язвы (ДЯ), — это язвенно-некротическое повреждение кожных покровов, развивающееся у ослабленных лежачих больных с нарушенной микроциркуляцией, на тех областях тела, которые подвергаются постоянному давлению, срезывающей силе и трению [1].

Снижение качества жизни у пациентов с ДЯ происходит из-за боли, проводимых процедур и увеличения продолжительности пребывания в стационаре. Пролежни являются воротами хронической инфекции, а при больших размерах пролежневых дефектов может иметь место плазмопотерия с раневым отделяемым. Кроме того, они могут способствовать преждевременной смерти пациентов. Поэтому любое вмешательство, позволяющее

предотвратить развитие ДЯ и/или способствовать лечению пациента после их возникновения, важно для снижения стоимости лечения и улучшения качества жизни [2].

Данных о частоте развития ДЯ в медицинских организациях Российской Федерации мало [1]; распространенность в европейских больницах колеблется от 8,3 до 23% и в канадских медицинских учреждениях до 26% [3].

По данным английских авторов, в медико-профилактических учреждениях по уходу пролежни образуются у 15–20% больных. По результатам исследования, проведенного в США, около 17% всех госпитализированных больных находятся в группе риска по развитию пролежней или уже имеют их [1].

В реанимационные отделения Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (ФНКЦ РР) на реабилитацию поступают пациенты в хроническом критическом состоянии (ХКС), обусловленном повреждением головного мозга. При этом 76,2% имеют ДЯ 3-й и/или 4-й стадии различных локализаций. Но данная категория пациентов имеет особенности течения патологических процессов и их лечения. Критическое состояние — это крайняя степень любой патологии, при которой необходимо искусственное замещение или поддержка жизненно важных функций организма, так как их ауторегуляция резко нарушена [4]. В свою очередь ХКС — это состояние, затрагивающее пациентов интенсивной терапии, которые пережили острую фазу заболевания, но остаются зависимыми от интенсивной терапии в течение длительного периода времени, не умирая и не выздоравливая [5].

Данных о частоте развития и специальных методах лечения ДЯ у пациентов в ХКС, обусловленном повреждением головного мозга, в отечественной и зарубежной литературе нами не найдено. В других группах пациентов при консервативном лечении с применением лекарственных и физических методов воздействия и проведением профилактических мероприятий разные авторы отмечают сроки заживления ДЯ до года и более, в результате чего затруднено своевременное проведение реабилитационных мероприятий и обеспечение соответствующего ухода за парализованными пациентами [6–8]. К известным решениям терапии пролежней без проведения одномоментного радикального оперативного лечения относят в основном применение различных фармкомпозиций в качестве составов для лечебных повязок, например биологически активная повязка для лечения длительно незаживающих ран [9]. Известен способ лечения, включающий криовоздействие аппликатором, максимально охлажденным жидким азотом до температуры 180 °С [10]. Кроме того, существует способ коррекции пролежней у спинальных больных, включающий введение в мягкие ткани по противоположным сторонам пролежня двух спиц на глубину 0,5–0,8 мм, фиксацию свободных наружных концов спиц и последующее их сближение [11].

Нами представлен клинический случай, описывающий быстрое заживление ДЯ 4-й стадии у пациента в хроническом критическом состоянии после повреждения головного мозга с применением комбинированного метода лечения [12] без радикального оперативного вмешательства (пластики дефекта).

Описание клинического случая

В реанимационное отделение ФНКЦ РР на реабилитацию был госпитализирован пациент Д., 23 года.

Диагноз: последствия сочетанной автотравмы (закрытая травма грудной клетки с ушибом правого легкого, закрытый перелом средней трети левой ключицы со смещением, закрытый перелом L4–L5 справа со смещением, закрытый перелом лонных и седалищных костей, оскольчатый перелом тела и крыла левой подвздошной кости и боковых масс крестца справа со смещением, открытый оскольчатый перелом верхней трети левой бедренной кости со смещением, закрытый перелом средней трети правой бедренной кости со смещением, травматический шок 3-й степени). Состоявшееся кровотечение из острых язв желудка и двенадцатиперстной кишки, осложнившееся постгипоксической энцефалопатией. Состояние после

катетер-ассоциированного сепсиса. ДЯ правой наружной лодыжки 3-й степени, ДЯ левой пяточной области 3-й степени, ДЯ крестца 4-й степени.

Анамнез: до поступления в ФНКЦ РР (на протяжении 11 месяцев) пациент перенес серию реконструктивных операций на костно-мышечной системе. Послеоперационный период осложнился развитием массивного кровотечения из острых язв желудка и двенадцатиперстной кишки, которое в свою очередь привело к развитию постгипоксической энцефалопатии с угнетением уровня сознания до комы. В дальнейшем у пациента был отмечен выход в ХКС с вегетативным уровнем сознания. Все это сопровождалось развитием ДЯ различной локализации в первый месяц от начала заболевания. Были сделаны две попытки (одна из них за рубежом) пластики ДЯ крестца собственными тканями, однако обе, через гнойно-некротические осложнения, привели к усугублению состояния раны.

На момент поступления состояние пациента было расценено как тяжелое. Уровень сознания — вегетативный. Дыхание через трахеостомическую канюлю. Питание через гастростому. Мочеиспускание по катетеру. Глубокий тетрапарез с повышением мышечного тонуса по спастическому типу. Сгибательные контрактуры локтевых, лучезапястных, коленных и голеностопных суставов. Белково-энергетическая недостаточность тяжелой степени. Нутриционный статус: рост — 180 см, вес — 51 кг, ИМТ — 15,74 кг/м², окружность средней трети плеча (ОП) — 17,5 см (норма 29 см), толщина кожно-жировой складки над трицепсом (ТЖКСТ) — 6 мм (норма 10,5 мм), окружность мышц средней трети плеча (ОМП) — 15,6 см (норма 23–25,5 см). Оценка по шкале Nutric score — 2 балла (низкий). Результаты лабораторных исследований: трансферрин — 52 мг/дл (норма 200 мг/дл), холинэстераза — 0,81 Ед/л, альбумин — 18 г/л.

В процессе дообследования в течение первой недели пациенту было выставлено показание к плановому проведению вентрикуло-перитонеального шунтирования (ВПШ) — выраженная гидроцефалия с перивентрикулярным отеком.

Описание ДЯ крестца: площадь — 114 см² (метод планиметрии); полный некроз толщи кожи с обширными поражениями подлежащей ткани; хорошо определяемые фиброзные рубцующиеся края; по нижнему краю определялся карман глубиной 3 см; в дне язвы — фрагменты костной ткани, рыхлая желтая субстанция площадью около 79% раневой поверхности; рана влажная; экссудат желтого цвета, равномерно распределен по ране. Ткань вокруг ДЯ бледно-серая, изъязвленный отек с уплотнением ткани до 2 см вокруг раны; грануляционная ткань тусклая, была представлена в дне и составляла около 17% от общей площади ДЯ, признаки эпителизации отсутствовали. Оценка по шкале Бейтс-Дженсена — 51 балл.

Наличие такой ДЯ стало противопоказанием к плановому проведению ВПШ; была поставлена задача ее заживления в кратчайшие сроки. С учетом анамнеза и соматического статуса пациента от радикальных хирургических методик было решено воздержаться.

Пациенту проводили комплексное лечение по запатентованной методике [12]. Выполняли ежедневную хирургическую обработку ДЯ (механический дебридинг) с некрэктомиями даже в случае размера участка некроза менее 1 см². После проведения дебридинга пациенту проводили лазеротерапию в следующем режиме: 904 нм, четыре светодиода по 18 Вт, частота импульсов — 2–5000 Гц, максимальная средняя мощность — 4 • 13,5 мВт, нагрузка —

3,5 J/cm². Воздействие проводили 1,12 мин на каждую точку аппаратом Combi 400 V (GymnaUniphy; Бельгия–Германия). Было намечено по краям раны шесть точек воздействия и непосредственно по площади ДЯ — три точки по вертикальному диаметру. После манипуляций на рану накладывали повязку Atrauman AG. Одновременно нутрициолог проводил ежедневный контроль за качественным и количественным составом питания пациента в зависимости от антропометрических и лабораторных показателей. Для оценки динамики заживления ДЯ использовали разработанную на основе шкалы Бейтс–Дженсена графическую модель S.Y.R., в которой на оси Y отражают баллы по шкале Бейтс–Дженсена с шагом в 5 единиц, а на оси X — временной интервал с шагом в 7 дней (рис. 1).

Через 7 дней проведения методики отметили положительную динамику в виде сокращения площади ДЯ до 86 см², края приобрели четкие фиксированные контуры, «карман» закрылся, участки некротической ткани стали бело-серыми, вязкими, площадь их уменьшилась до 37% от общей площади ДЯ. Экссудат приобрел серозно-геморрагический характер. По краям раны образовалась плотная рубцовая ткань, появились признаки эпителизации. Отек вокруг ДЯ уменьшился, изъязвление зарубцовывалось (рис. 2). Оценка по шкале Бейтс–Дженсена — 40 баллов. Учитывая сохраняющиеся признаки протекания активного инфекционного процесса в ДЯ, было решено не вносить изменения в состав перевязочного материала.

Через 14 дней по динамике заживления было отмечено уменьшение площади ДЯ до 39 см², некротическая ткань стала занимать не более 13% от площади раны. Количество экссудата значительно снизилось до отсутствия свободного экссудата. Оценка по шкале Бейтс–Дженсена — 36 баллов. Учитывая значимое снижение экссудации и отсутствие прогрессирования инфекционного процесса, после манипуляции на рану стали накладывать повязку Бранолинд.

Через 28 дней площадь ДЯ составила 23 см², дно выстлано грануляциями, активная краевая эпителизация, рана влажная, свободного экссудата нет. Ткань вокруг раны бледно-розовая, отека нет. Края выполнены плотной рубцовой тканью (рис. 3). Оценка по шкале Бейтс–Дженсена — 26 баллов.

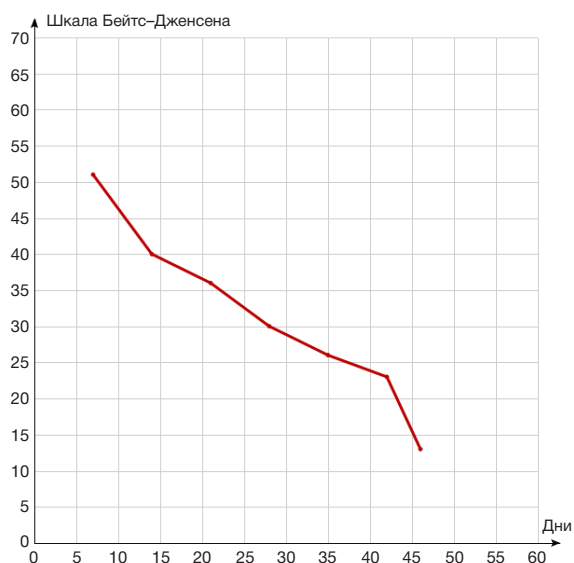


Рис. 1. Графическая модель SYR

Через 35 дней площадь ДЯ составила 8 см², дно выстлано массивными грануляциями, активная краевая эпителизация (67% от общей площади ДЯ). Оценка по шкале Бейтс–Дженсена — 23 балла.

На 46-й день наблюдали полное рубцевание ДЯ (рис. 4). Оценка по шкале Бейтс–Дженсена — 13 баллов (заживление). Нутриционный статус: вес 55 кг, ИМТ — 16,98 кг/м², ОП — 18,5 см, ТКЖСТ — 6 мм, ОМП — 16,6 см. Оценка по шкале Nutric score — 3 балла (низкий); трансферрин — 173 мг/дл, холинэстераза — 2,66 Ед/л, альбумин — 32 г/л.

Пациенту выполнили постановку ВПШ без гнойно-септических осложнений в ближайшем и отдаленном послеоперационном периоде. Реабилитационные мероприятия были дополнены занятиями в бассейне и расширением объема ЛФК за счет уменьшения спастического компонента.

Обсуждение клинического случая

Несмотря на то что у пациента по характеристикам ДЯ технически было возможно выполнение закрытия дефекта исключительно хирургическими методами, с учетом его соматического состояния и анамнеза, проведение такой пластики в этом случае с большой долей вероятности вызвало бы раневые осложнения и еще больше растянуло процесс заживления во времени.

Радикальное хирургическое лечение предлагает быстро, в сравнении с консервативной терапией, достичь заживления. Однако вероятность возникновения послеоперационных осложнений напрямую зависит от соматического состояния пациента на момент операции. В случае с ХКС, обусловленным поражением головного мозга, соматическое состояние пациента значительно отличается от «идеального» для проведения плановой операции и, по нашему опыту, практически исключает возможность благоприятного исхода в случае одномоментного хирургического закрытия ДЯ. Мы считаем, что у таких пациентов риск осложнений при проведении оперативного закрытия ДЯ крайне высок. Учитывая, что многие из этих пациентов в ближайшее время не восстановят самостоятельной мобильности в должном объеме, в результате чего время и качество контакта ДЯ с поверхностями будут ограничены лишь стандартными противопролежневыми мероприятиями, мы считаем нецелесообразным и небезопасным закрытие ДЯ



Рис. 2. Декубитальная язва крестца, 7-й день лечения



Рис. 3. Декубитальная язва крестца, 28-й день лечения



Рис. 4. Декубитальная язва крестца, 46-й день лечения

у таких пациентов исключительно хирургическими методами.

Сокращение сроков заживления пролежней у многих из пациентов в ХКС, обусловленном повреждением головного мозга, играют решающую роль в их дальнейшем реабилитационном прогрессе. Использование запатентованного комбинированного способа лечения [9] позволило в короткие сроки заживить ДЯ и выполнить необходимое плановое нейрохирургическое вмешательство.

При ХКС объем хирургической агрессии должен быть четко сопоставлен с объективными данными пациента и учитывать все обстоятельства, т. е. не только возможности предоперационной подготовки раны, но и дальнейшие ближайшие и отдаленные реабилитационные перспективы пациента.

ВЫВОДЫ

Совершенствование консервативных методов и их комбинация с современными хирургическими и физическими методами воздействия делают возможным достоверное сокращение сроков заживления ДЯ у пациентов в ХКС, обусловленном повреждением головного мозга, без рисков, которые несут в себе одномоментные хирургические вмешательства. Запатентованный метод эффективен как вариант выбора для лечения ДЯ у пациентов в ХКС, обусловленном повреждением головного мозга, при наличии противопоказаний для одномоментного хирургического закрытия ДЯ.

Литература

1. ГОСТ Р 56819-2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Надлежащая медицинская практика. Информационная модель. Профилактика пролежней (утв. и введен в действие Приказом Росстандарта от 30.11.2015 № 2089-ст). Доступно по ссылке: <http://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc&base=OTN&n=11348#018678300170008422>.
2. Pressure Sore Statistics (Decubitus Ulcer Stats) [Internet] [cited 2013 Mar 11]. Available from: <http://decubitusulcervictims.com/pressure-sore-statistics>.
3. McInnes E, Jammali-Blasi A, Bell-Syer SEM, Dumville JS, Middleton V, Cullum N. Support surfaces for pressure ulcer prevention. The Cochrane Database of Systematic Reviews (9): CD001735.
4. Зильбер А. П. Этюды критической медицины. М.: МЕД-пресс-информ, 2006.
5. Girard K, Raffin TA. The chronically critically ill: to save or let die? *Respir Care*. 1985; (30): 339–47.
6. Басков А. В. Хирургическое лечение пролежней у больных со спинномозговой травмой. *Вопросы нейрохирургии*. 2000; (1): 7–10.
7. Гаркави А. В., Елизаров П. М. Некоторые особенности течения пролежневой болезни у спинальных больных. *Современные подходы в диагностике и лечении патологии позвоночника и спинного мозга*. М., 1993.
8. Рябуха Н. П., Касумов Р. Д., Давыдов Е. А., Мусихин В. Н. К вопросу о лечении пролежней при позвоночно-спинномозговой травме. *Сборник статей*. Екатеринбург, 1995; с. 120–125.
9. Баиндурашвили А. Г., Каран А. В., Бразоль М. А., Цветаев Е. В.,

- Митрофанова Е. В., Мельников М. Р., авторы; Федеральное государственное учреждение «Научно-исследовательский детский ортопедический институт имени Г. И. Турнера» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Комитет по здравоохранению администрации Санкт-Петербурга Государственное учреждение здравоохранения «Детская городская больница №1», патентообладатели. Биологически активная повязка для лечения длительно не заживающих ран (трофические язвы, пролежни, глубокие дермальные ожоги). Патент РФ № 2450833 23.12.2010.
10. Глухов А. А., Аралова М. В., авторы; Глухов А. А., Аралова М. В., патентообладатель. Способ лечения больных с трофическими язвами. Патент РФ № 2578382 05.06.2014.
11. Чирков А. А., автор; Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы Московский клинический научно-практический центр А. С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы, патентообладатель. Способ коррекции пролежней у пациентов с спинальными болезнями. Патент РФ № 2620019 05.10.2015.
12. Гречко А. В., Данилец В. В., Ребров К. С., Сидоров И. Б., Шайбаков А. А., Щелкунова И. Г., Яковлев А. А., авторы; Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», патентообладатель. Способ комплексного лечения пролежней у пациентов с длительной иммобилизацией. Патент РФ № 2661084 21.07.2017.

References

1. GOST R 56819-2015. Nacionalnyj standart Rossijskoj Federacii. Nadlezhashchaya medicinskaya praktika. Infologicheskaya model. Profilaktika prolezhnej (utv. i vveden v dejstvie Priказом Rosstandarta ot 30.11.2015 № 2089-st) Available from:

<http://www.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc&base=OTN&n=11348#018678300170008422>.

2. Pressure Sore Statistics (Decubitus Ulcer Stats) [Internet] [cited 2013 Mar 11]. Available from: <http://decubitusulcervictims.com/>

- pressure-sore-statistics.
3. McInnes E, Jammali-Blasi A, Bell-Syer SEM, Dumville JS, Middleton V, Cullum N. Support surfaces for pressure ulcer prevention. The Cochrane Database of Systematic Reviews (9): CD001735.
 4. Zilber AP. Etyudy kriticheskoy mediciny. M.: MED-press-inform, 2006.
 5. Girard K, Raffin TA. The chronically critically ill: to save or let die? *Respir Care*. 1985; (30): 339–47.
 6. Baskov AB. Xirurgicheskoe lechenie prolezhnej u bolnyx so spinomozgovoju travmoju. *Zhurn. Voprosy nejroxirurgii*. 2000; (1): 7–10.
 7. Garkavi AB, Elizarov PM. Nekotorye osobennosti tehnicheskogo lecheniya prolezhnevo go processa u spinalnyx bolnyx. *Sovremennye podxody v diagnostike i lechenie patologii pozvonochnika i spinnogo mozga*. M., 1993.
 8. Ryabuxa NP, Kasumov RD, Davydov EA, Musixin VN. K voprosu o lechenii prolezhnej pri pozvonochno-spinomozgovoju travme. *Sbornik statej*. Ekaterinburg, 1995; s. 120–125.
 9. Baindurashvili AG, Kagan AV, Brazol MA, Tsvetaev EV, Mitrofanova EV, Melnikov MR, inventor; Federal State Budgetary Institution The Turner scientific research institute for children's orthopedics under the Ministry of Health of the Russian Federation, Komitet po zdravookhraneniyu administratsii Sankt-Peterburga Gosudarstvennoe uchrezhdenie zdravookhraneniya «Detskaya gorodskaya bolnitsa №1», assignee. Biologicheskii aktivnaya povyazka dlya lecheniya dlitelno ne zazhivayushhikh ran (troficheskie yazvy, prolezhni, glubokie dermal'nye ozhogi). Patent RF № 2450833. 2010 Dec 23.
 10. Glukhov AA, Aralova MV, inventor; Glukhov AA, Aralova MV, assignee. Sposob kompleksnogo lecheniya prolezhnej u patsientov s dlitel'noj immobilizatsiej. Patent RF № 2578382. 2014 Jun 05.
 11. Chirkov AA, inventor; The Loginov Moscow Clinical Scientific Center is State Institution funded by Moscow Health Department, assignee. Sposob korrektsii prolezhnej u spinal'nykh bol'nykh. Patent RF № 2620019. 2015 Oct 05.
 12. Grechko AV, Danilets VV, Rebrov KS, Sidorov IB, SHajbak AA, Shhelkunova IG, Yakovlev AA, inventor; Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, assignee. Sposob kompleksnogo lecheniya prolezhnej u patsientov s dlitel'noj immobilizatsiej. Patent RF № 2661084. 2017 Jul 21.

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ОРГАНИЗАЦИИ МЕДИЦИНСКОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ ТРАНЗИТОРНУЮ ИШЕМИЧЕСКУЮ АТАКУ

Е. В. Костенко , М. А. Энеева, В. Г. Кравченко

Московский научно-практический центр медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины, Москва, Россия

Повышение эффективности реабилитационных мероприятий у пациентов, перенесших транзиторную ишемическую атаку (ТИА), с учетом особенностей основного и ведущих сопутствующих заболеваний остается актуальной задачей. Целью исследования было на основании изучения особенностей когнитивных и эмоциональных нарушений обосновать значение психокоррекции в комплексе реабилитационных мероприятий у пациентов, перенесших ТИА. Была изучена и проанализирована заболеваемость у 351 пациента, перенесшего ТИА. Средний возраст обследованных пациентов составил $58,6 \pm 2,2$ года. Для сбора информации проводили выкопировку данных из медицинских карт амбулаторных больных (форма 0,25/у) и медицинских карт стационарных больных (форма 003/у), в том числе данных опроса пациентов по Анкете медико-социальной характеристики пациентов, учитывали также данные шкал MMSE, HADS. Выявлено, что второе место по уровню заболеваемости у пациентов, перенесших ТИА, после заболеваний сердечно-сосудистой системы занимают психические расстройства, распространенность которых составила 186,8 случая на 100 пациентов. Важное место в программах медико-социальной реабилитации пациентов, перенесших ТИА, должна занимать коррекция психических расстройств с участием психотерапевта, медицинского психолога в составе мультидисциплинарной бригады.

Ключевые слова: транзиторная ишемическая атака, нейропсихологические расстройства, когнитивные нарушения, эмоциональные расстройства, медицинская реабилитация

Информация о вкладе авторов: Е. В. Костенко — концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, внесение принципиальных изменений в текст статьи; М. А. Энеева — дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи; В. Г. Кравченко — анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Московского научно-практического центра медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины (протокол № 7 от 21 июня 2017 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Елена Владимировна Костенко
ул. Бауманская, д. 70, г. Москва, 105007; ekostenko58@mail.ru

Статья получена: 24.05.2019 **Статья принята к печати:** 07.06.2019 **Опубликована онлайн:** 08.06.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.038

PROBLEMS OF MEDICAL REHABILITATION IN PATIENTS AFTER A TRANSIENT ISCHEMIC ATTACK

Kostenko EV , Eneeva MA, Kravchenko VG

Moscow Centre for Research and Practice in Medical Rehabilitation, Restorative and Sports Medicine, Moscow, Russia

The efficacy of rehabilitation in post-TIA patients still remains a clinical challenge, considering the combined burden of the primary disease and comorbidities. The aim of this study was to provide a rationale for introducing psychological counseling into post-TIA rehabilitation programs after studying the presentations of cognitive and emotional impairments developed after this cerebrovascular event. We analyzed in- and outpatient medical records of 351 participants (the mean age was 58.6 ± 2.2 years) who had experienced a TIA. Data was collected from forms 0.25/y and 003/y, medical/social questionnaires and also included MMSE and HADS scores. We found that CI and MD ranked second after cardiovascular diseases among the comorbidities in post-TIA patients (186.8 cases per 100 patients). We conclude that rehabilitation of post-TIA patients should involve a multidisciplinary team of experts including a psychotherapist or a clinical psychologist who will provide psychological counselling.

Keywords: transient ischemic attack, neuropsychological disorders, cognitive impairment, mood disorders, medical rehabilitation

Author contribution: Kostenko EV — study conception and design, data analysis and interpretation, manuscript revision; Eneeva MA — study design, data analysis and interpretation, manuscript draft; Kravchenko VG — data analysis and interpretation, manuscript draft.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Moscow Centre for Research and Practice in Medical Rehabilitation, Restorative and Sports Medicine (Protocol № 7 dated June 21, 2017).

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena V. Kostenko
Baumanskaya 70, Moscow, 105007; ekostenko58@mail.ru

Received: 24.05.2019 **Accepted:** 07.06.2019 **Published online:** 08.06.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.038

Транзиторные ишемические атаки (ТИА) являются одним из видов острого цереброваскулярного синдрома и не сопровождаются стойкими клинко-неврологическими проявлениями, характерными для очагового повреждения головного мозга. В связи с кратковременностью симптомов, с одной стороны, пациенты не всегда придают им должное значение, что приводит к позднему обращению за медицинской помощью; с другой стороны, из-за быстрого и полного регресса врачи не оценивают кратковременно развившиеся симптомы как ТИА [1].

Клиническое и прогностическое значение ТИА состоит в том, что они могут быть предвестником более серьезного острого сосудистого события. Перенесшие ТИА пациенты

имеют более высокий риск развития инфаркта миокарда (ИМ), мозгового инсульта или смерти в течение 5 лет после перенесенной атаки [1–4]. Важны не только глобальные события, маркером которых могут служить ТИА, но и нефатальные изменения, такие как когнитивные нарушения (КН) и эмоциональные расстройства, на взаимосвязь развития которых после перенесенных ТИА указывают немногочисленные зарубежные и отечественные исследования [5, 6].

Так, после изучения когнитивных функций у пациентов с артериальной гипертензией, перенесших ТИА, выявлены наличие КН и их взаимосвязь с морфологическими изменениями головного мозга, обусловленные течением

артериальной гипертензии. Однако до манифестации острого цереброваскулярного события (ТИА) КН не имели клиничко-функциональной значимости для пациента [5]. При изучении причин возникновения КН у пациентов, перенесших ТИА, наибольшая частота их встречаемости выявлена у мужчин [6]. И отечественные, и зарубежные авторы, изучавшие структурно-морфологические изменения вещества головного мозга у пациентов с ТИА и КН, обнаружили признаки атрофии головного мозга с преимущественной локализацией в области таламуса, гипоталамуса, зубчатой извилины [5–7]. Эти авторы указывают на атрофию ткани головного мозга как причину когнитивных и эмоциональных расстройств, возникающих у данной группы пациентов.

КН выявляют почти у 40% пациентов, перенесших ТИА [4]. Представляет интерес изучение выраженности и особенностей клинических характеристик когнитивных и эмоциональных нарушений у пациентов, перенесших ТИА, их прогностической значимости и влияния на повседневное функционирование пациентов.

ТИА приводят к микроструктурным изменениям, что вызывает подкорково-корковую дезинтеграцию, при этом моторная функция не страдает, но развиваются нейропсихологические нарушения, что имеет не меньшее значение для эффективного функционирования пациента, чем моторные нарушения, возникающие при инсульте. Нарушения когнитивных функций, с помощью которых осуществляется процесс рационального познания мира и обеспечивается целенаправленное взаимодействие с ним, усугубляются эмоциональными расстройствами [7].

Повышение эффективности реабилитационных мероприятий и снижение риска повторного сосудистого события у перенесших ТИА пациентов возможны посредством оптимизации организации медицинской реабилитации с учетом особенностей ведущих неврологических и психических расстройств, сопровождающих перенесенную ТИА, структуры сопутствующих заболеваний, социально-гигиенических характеристик пациентов. Такая оптимизация позволит индивидуализировать программы коррекции имеющихся расстройств.

Целью исследования было на основании изучения особенностей когнитивных и эмоциональных нарушений обосновать значение психокоррекции в комплексе реабилитационных мероприятий у пациентов, перенесших ТИА.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Изучение развития когнитивных и эмоциональных нарушений у пациентов, перенесших ТИА, проводили на основании анализа медицинских карт амбулаторных больных (форма 0,25/у) и медицинских карт стационарных больных (форма 003/у), дополненных данными опроса пациентов по Анкете медико-социальной характеристики пациентов. Была изучена и проанализирована заболеваемость у 351 пациента, перенесшего ТИА. Средний возраст обследованных женщин составил $59,6 \pm 2,3$ года, мужчин — $57,6 \pm 2,2$ года (в целом $58,6 \pm 2,2$ года).

Для выявления и оценки тяжести КН у перенесших ТИА пациентов учитывали содержащиеся в медицинской документации данные, полученные с помощью Краткой шкалы оценки психического статуса (КШОПС, Mini Mental State Examination, MMSE) [8]. Для выявления и оценки тяжести эмоциональных нарушений — данные, полученные с помощью госпитальной шкалы тревоги и депрессии

(HADS) [9] для выявления и оценки тяжести депрессии и тревоги в условиях общемедицинской практики.

Из всех пациентов-женщин 46,7% были работающими пенсионерами. В целом большая часть пациентов имели среднее специальное (47,0%; $n = 165$) и высшее (35,3%; $n = 124$) образование. Большинство обследованных имели низкую удовлетворенность местом работы (62,1%; $n = 218$). Каждый пятый пациент был вдов или не состоял в браке (19,9%; $n = 70$); среди них преобладали женщины. Было установлено, что 79,7% ($n = 280$) пациентов проживают в семье; 5,6% пациентов ($n = 20$) имеют родственников, но проживают отдельно; 14,7% ($n = 51$) одиноки. Стойкую утрату трудоспособности имели 73 пациента (20,8%), большинство из них — 58 (79,4%) имели инвалидность III группы по общему заболеванию и только у 15 пациентов (20,6%) была II группа инвалидности.

Результаты изучения первичной медицинской документации заносили в специально разработанную выборочную карту изучения заболеваемости пациентов, перенесших ТИА, и статистически обрабатывали с использованием программ Excel (Microsoft; США) и Statistica 8.0 (StatSoft Inc; США), 2010 г. Описательная статистика при нормальном распределении признака (в соответствии с результатами теста Колмогорова–Смирнова) была представлена в виде среднего значения и средней ошибки средней арифметической ($M \pm m$), а также в виде медианы (Me). Описательная статистика качественных признаков была представлена также в виде абсолютных и относительных частот (%). Достоверность различий определяли с помощью t -теста Стьюдента и методов непараметрической статистики (критерий χ^2). Для выявления взаимосвязи двух признаков применяли непараметрический корреляционный анализ по Спирмену. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ структуры заболеваемости проводили в соответствии с действующей Международной статистической классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем (МКБ 10-го пересмотра). Ранговое распределение сопутствующих заболеваний по классам болезней позволило установить, что 1-е место занимают болезни системы кровообращения (32,6%), 2-е — психические расстройства (31,5%) и 3-е — болезни эндокринной системы (15,5%). На указанные три места приходится 79,6% всей выявленной патологии. Внутренняя структура класса болезней системы кровообращения представлена в табл. 1.

Выявлено, что 312 (89%) пациентов имели сочетанные болезни системы кровообращения различной степени тяжести. Сочетание двух и более заболеваний системы кровообращения наблюдали у 130 (37,0%) пациентов, перенесших ТИА.

Второе место по уровню заболеваемости у пациентов, перенесших ТИА, после заболеваний сердечно-сосудистой системы занимали психические расстройства, распространенность которых составила 186,8 случаев на 100 пациентов (табл. 2).

Структура психических заболеваний у пациентов, перенесших ТИА, представлена на рис. 1.

Органическое тревожное расстройство было выявлено у 72,9% из 351 пациента. КН возникали у 31,1% пациентов и были представлены: умеренными когнитивными нарушениями (19,9%), деменцией легкой степени (7,7%), деменцией средней степени (3,4%). Депрессивные

расстройства были выявлены у 17,7% пациентов, среди них доклиническое тревожное расстройство составило 12,5%, депрессивное расстройство легкой степени выраженности — 3,4%, средней степени выраженности — 1,7%.

Примерно каждый второй пациент (45,7%) при этом имел два заболевания данного класса: сочетание КН с депрессивным расстройством, депрессивного и тревожного расстройств. Наиболее часто КН выявляли у пациентов в возрасте старше 60 лет, гендерных различий обнаружено не было. Эмоциональные расстройства чаще диагностировали у женщин в возрасте 50–59 лет, депрессивное расстройство чаще встречалось у мужчин старше 70 лет.

Эмоциональные расстройства характеризовались сниженным фоном настроения, подавленностью, внутренней напряженностью, беспокойством, тревожностью. У большинства пациентов выявляли снижение продуктивности и целенаправленности интеллектуальной деятельности, низкую мотивацию к возвращению к трудовой деятельности и социально-средовым отношениям, нарушение концентрации активного внимания, низкий уровень активности и побуждений к выполнению программы медицинской реабилитации.

В результате проведенного корреляционного анализа была выявлена сильная положительная зависимость между КН и повторностью острого цереброваскулярного

Таблица 1. Структура класса болезней системы кровообращения у пациентов, перенесших ТИА

Заболевание	Число случаев	
	Абс.	%
ЦВБ	312	89,0
ГБ	241	68,7
Атеросклероз	185	73,7
ИБС:	141	56,2
Кардиосклероз с нарушением сердечного ритма	82	58,2
Постинфарктный кардиосклероз	37	26,2
Кардиосклероз без нарушения сердечного ритма	22	15,6
Стеноз брахиоцефальных артерий	20	14,2

Таблица 2. Распространенность психических расстройств у пациентов, перенесших ТИА

Заболевание	Абс.	%
Когнитивные нарушения:	109	31,1
УКН*	70	19,9
Деменция легкой степени	27	7,7
Деменция средней степени	12	3,4
Органическое тревожное расстройство	256	72,9
Депрессивные расстройства:	62	17,7
Доклиническое депрессивное расстройство	44	12,5
Депрессивное расстройство легкой степени	12	3,4
Депрессивное расстройство средней степени	6	1,7
Органическое эмоционально-лабильное расстройство	58	16,5
Всего:	656	186,8

Примечание: УКН* — умеренные когнитивные нарушения.

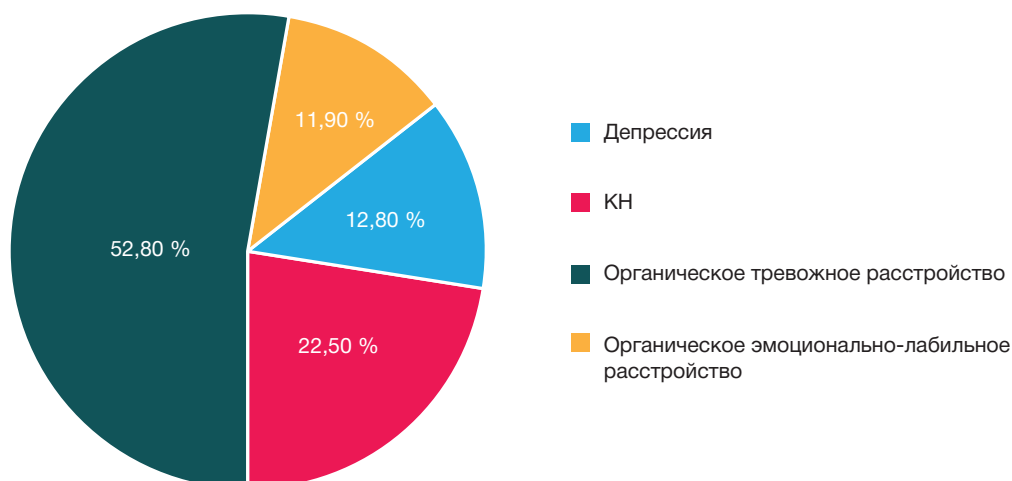


Рис. 1. Структура психических расстройств среди перенесших ТИА пациентов

события (ТИА, ИИ, ГИ) ($r = 0,724$; $p < 0,05$), а также между депрессивным расстройством и повторностью острого цереброваскулярного события (ТИА, ИИ, ГИ) ($r = 0,736$; $p < 0,05$).

Было выявлено, что сочетание психических расстройств с заболеваниями сердечно-сосудистой системы встречается в различных вариантах у 213 пациентов (60,7%). Среди пациентов изученной группы у 161 (75,6%) выявлена гипертоническая болезнь (ГБ) различной стадии (табл. 3–5). Установлена прямая, сильная и достоверная корреляционная взаимосвязь между выраженностью КН и наличием у пациентов ГБ ($r = 0,95$; $p < 0,05$), тяжестью эмоциональных расстройств и ГБ ($r = 0,95$; $p < 0,05$).

Сочетание нейропсихологических расстройств с ишемической болезнью сердца (ИБС) было констатировано у 101 пациента (47,4%), причем ИМ имел место в 21 случае (20,8% пациентов с ИБС) (табл. 6). Была проанализирована взаимосвязь между наличием когнитивных и эмоциональных нарушений и ИБС без ИМ и с ИМ. При анализе сочетанности ИБС с КН была выявлена сильная положительная корреляционная взаимосвязь ($r = 0,87$; $p < 0,05$); в сочетании с ИМ взаимосвязь имела аналогичные

характеристики взаимосвязи ($r = 0,97$; $p < 0,05$). При анализе сочетанности ИБС с ЭР также была выявлена сильная положительная достоверная корреляционная связь ($r = 0,93$; $p < 0,05$). При этом связь депрессивных расстройств и ИБС с ИМ более выражена, чем с ИБС без ИМ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ряде работ у 70–80% пациентов с острыми и хроническими формами ЦВБ были выявлены сосудистые КН различной степени выраженности [10, 11]. Именно «малые» инсульты часто являются причиной развития КН и каждый пациент, перенесший ТИА или инсульт, должен быть обследован для выявления спектра когнитивной дисфункции [12]. Нейропсихологические расстройства, часто имеющие субклинические проявления, у пациентов с сосудистыми заболеваниями головного мозга могут вызывать нарушения в эмоциональной сфере, быть причиной поведенческих и адаптационных расстройств [12]. КН — признак неблагоприятного течения ЦВБ и один из показателей низкого церебрального резерва,

Таблица 3. Распространенность нейропсихических расстройств (когнитивных, эмоциональных) у перенесших ТИА пациентов, страдающих ГБ

Когнитивные нарушения	Число случаев (абс.)	Число случаев сочетания с ГБ
УКН	70	58
Деменция легкой степени	27	22
Деменция умеренной степени	12	12
ЭР*:		
Доклиническое депрессивное расстройство	44	38
Депрессивное расстройство легкой степени	12	8
Депрессивное расстройство средней степени	6	5

Примечание: ЭР* — эмоциональные расстройства.

Таблица 4. Распространенность нейропсихических расстройств (когнитивных, эмоциональных) у перенесших ТИА пациентов, страдающих ГБ

КН \ ГБ	1-я стадия		2-я стадия		3-я стадия		Всего
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
УКН	38	54,3	12	17,1	8	11,4	58
Деменция легкой степени	5	18,5	10	37	7	26	22
Деменция средней степени	1	8,3	2	16,7	9	75	12
Всего:	44		24		24		92

Таблица 5. Тяжесть ГБ у перенесших ТИА пациентов, имеющих эмоциональные расстройства

КН \ ГБ	1-я стадия		2-я стадия		3-я стадия		Итого
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	
Доклинические ЭР	30	68,4	5	11,4	3	6,8	38
Депрессия легкой степени	3	25	4	33,3	1	8,3	8
Депрессия средней степени	0	0	1	16,7	4	66,7	5
Всего:	33		9		8		51

Таблица 6. Распространенность сочетания КН, ЭР и ИБС у перенесших ТИА пациентов

Когнитивные нарушения	Число случаев (абс.)	Число случаев сочетаний КН и ИБС (абс. / %)		Число случаев сочетаний КН и ИБС с ИМ (абс. / %)	
УКН	70	18	25,7	5	7,1
Деменция легкой степени	27	8	29,6	3	11,1
Деменция умеренной степени	12	4	33,3	2	16,7
ЭР:					
Доклиническое депрессивное расстройство	44	32	72,7	8	18,2
Депрессия легкой степени	12	6	50	5	41,7
Депрессия средней степени	6	4	66,7	2	33,3

что является фактором, повышающим риск повторного сосудистого события у пациентов с КН [11].

В зарубежной и отечественной литературе представлены в основном данные о КН и ЭР, возникшие в различные сроки после перенесенного инсульта, при этом среди обследованных пациентов могли быть и пациенты, перенесшие ТИА. Специальных широкомасштабных исследований нейропсихологических расстройств у пациентов, перенесших ТИА, не проводили и имеются лишь отдельные сообщения на эту тему, описывающие работу с небольшими когортами обследованных пациентов (менее 100) [13, 14].

У перенесших ТИА пациентов ЭР могут оказать влияние на течение заболевания и стать причиной повторного инсульта или затруднять проведение лечебно-реабилитационных мероприятий [15]. Эмоциональные нарушения оценивали с помощью госпитальной шкалы тревоги и депрессии (HADS) и сделали предположение о том, что центральное место в программе реабилитации пациентов, перенесших ТИА, должна занимать психологическая реабилитация. По мнению некоторых авторов, развитие тревоги и депрессии у пациентов после ТИА вызвано сосудистым поражением и психологической реакцией, поэтому структурированная мультидисциплинарная многофакторная программа коррекции факторов риска, включающая управление факторами сосудистого риска, может быть ассоциирована со снижением показателей HADS и более низкой распространенностью депрессивных симптомов через год после сосудистого события [16]. Ранее было проведено исследование психосоциальной реакции пациентов на перенесенную ТИА. Несмотря на индивидуализированный характер ответов, из них разработали шесть видов реакции пациентов: глубокое беспокойство о будущих неопределенностях/нарушении нормальной жизни, потеря доверия, разочарование, расценивание ТИА как сигнал тревоги, чувство утраты и грусти, а также

смущение. Выявленные субъективные реакции на ТИА могут быть использованы для индивидуализации управления, адаптации и реабилитации пациента после ТИА. Это означает умение преобразовывать копинг-стратегии пациента для увеличения эффективности реабилитационной программы [17].

Ряд авторов также высказываются о возможности появления КН у пациентов после ТИА или малого инсульта [5, 18, 19]. Показано, что через девять месяцев после перенесенной ТИА треть пациентов имеет КН, мешающие им в повседневной жизни [20].

Таким образом, выявление ЭР и КН у перенесших ТИА пациентов может быть использовано при составлении индивидуальных программ медико-социальной реабилитации.

ВЫВОДЫ

Показано, что КН и ЭР занимают второе место в структуре сопутствующих заболеваний у пациентов, перенесших ТИА, уступая заболеваниям сердечно-сосудистой системы, и составляют 186,8 случаев на 100 пациентов. Сочетание психических расстройств с болезнями системы кровообращения встречается в 60,7% случаев у перенесших ТИА пациентов. Установлена прямая сильная и достоверная корреляционная связь между степенью выраженности КН и наличием у пациентов ГБ ($r = 0,95$; $p < 0,05$), выраженностью эмоциональных расстройств и ГБ ($r = 0,95$; $p < 0,05$), а также со стадией ГБ. Сочетание нейропсихологических расстройств с ИБС у перенесших ТИА пациентов было выявлено в 47,4% случаях. Таким образом, структурирование персонализированной программы медицинской реабилитации пациентов, перенесших ТИА, должно носить мультидисциплинарный и многофакторный характер с учетом особенностей основного и ведущих сопутствующих заболеваний, среди которых значимое место занимают нейропсихологические расстройства.

Литература

1. Учиям Ш. Транзиторные ишемические атаки. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016; 224 с.
2. Джеймс Ф. Тул. Сосудистые заболевания головного мозга. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007; 612 с.
3. Amarenco P. One-Year Risk of Stroke after Transient Ischemic Attack or Minor Stroke. *N Engl J Med.* 2016; 374 (16): 1533–42. DOI: 10/1056/NEJMoa1412981.
4. Стаховская Л. В. Транзиторная ишемическая атака. Фарматека. Клинические рекомендации. 2017; (2): 34–45.
5. Полтавцева О. В. Когнитивные нарушения у пациентов с артериальной гипертензией и транзиторной ишемической атакой. Сибирский медицинский журнал. 2014; 29 (1): 39–43.
6. Bivard A, Lillicrap T, Maréchal B. Transient Ischemic Attack Result in Delayed Brain Atrophy and Cognitive Decline. *Stroke.* 2018; 49 (2): 384–90.
7. Лобзин С. В., Лобзин В. Ю., Амурова Т. Р., Мирзаева Л. М., Никишина О. А., Никифорова Л. Г. и др. Дискуссионные вопросы диагностики и патогенетической терапии хронической церебральной ишемии с когнитивными нарушениями. Медицинский алфавит. Неврология и психиатрия. 2018; 1 (1): 5–14.
8. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. «Mini-mental state»: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research.* 1975; 12 (3): 189–98.
9. Zigmond AS, Snaith RP. The Hospital Anxiety and Depression scale. *Acta Psychiatr Scand.* 1983; (67): 361–70.
10. Захаров В. В., Вахнина Н. В. Инсульт и когнитивные нарушения. Журнал неврологии и психиатрии им. Н. Н. Корсакова (прил. Инсульт). 2008; (22): 6–21.
11. Дамулин И. В. Сосудистая деменция: патогенез, диагностика и лечение. Фарматека. 2010; (7): 13–8.
12. Hachinski V. World Stroke Day 2008: «Little strokes, Big Trouble». *Stroke.* 2008; 39 (9): 2407–8.
13. Малеина А. Ю., Колоколов О. В., Лукна Е. В. Роль транзиторной ишемической атаки в возникновении когнитивных нарушений (обзор). Саратовский научно-медицинский журнал. 2016; 12 (2): 273–7.
14. Гудкова В. В., Шанина Т. В., Петрова Е. А., Стаховская Л. В. Транзиторная ишемическая атака-мультидисциплинарная проблема. Неврология. Нейропсихиатрия. Психосоматика. 2012; (3): 20–4.
15. Spurgeon L, James G, Sackley C. The Hospital Anxiety and Depression Scale: a pilot study to examine its latent structure and the link between psychological state and symptom severity in transient ischaemic attack patients. *Psychol Health Med.* 2016; 21 (5): 632–8.
16. Ihle-Hansen H, Thommessen B, Fagerland MW, Oksengård AR, Wyller TB, Engedal K, et al. Effect on anxiety and depression of a multifactorial risk factor intervention program after stroke and TIA: a randomized controlled trial. *Aging Ment Health.* 2014; 18 (5): 540–6.
17. Spurgeon L, James G, Sackley C. Subjective experiences of transient ischaemic attack: a repertory grid approach. *Disabil Rehabil.* 2013; 35 (26): 2205–12.
18. Boss HM, Van Schaik SM, Deijl IA, de Melker EC, van den Berg BT,

Scherder EJ, et al. A randomised controlled trial of aerobic exercise after transient ischaemic attack or minor stroke to prevent cognitive decline: the MoveIT study protocol. *BMJ. Open.* 2014; 4 (12): e007065.

19. Boss HM, Van Schaik SM, Deijle IA, de Melker EC, van den Berg BT, Scherder EJ, et al. Safety and feasibility of post-stroke care and

exercise after minor ischemic stroke or transient ischemic attack: MotiveS & MoveIT. *NeuroRehabilitation.* 2014; 34 (3): 401–7.

20. Kjörk E, Blomstrand C, Carlsson G, Lundgren-Nilsson Å, Gustafsson C. Daily life consequences, cognitive impairment, and fatigue after transient ischemic attack. *Acta Neurologica Scandinavica.* 2016; 133 (2): 103.

References

1. Uchijam Sh. Tranzitornye ishemicheskie ataki. M.: GJeOTAR-Media, 2016; 224 s. Russian.
2. Dzhejms F Tul. Sosudistye zabolevaniya golovnogo mozga. M.: GJeOTAR-Media, 2007; 612 s. Russian.
3. Amarenco P. One-Year Risk of Stroke after Transient Ischemic Attack or Minor Stroke. *N Engl J Med.* 2016; 374 (16): 1533–42. DOI: 10/1056/NEJMoa1412981.
4. Stahovskaya LV. Tranzitornaja ishemicheskaja ataka. Farmateka. Klinicheskie rekomendacii. 2017; (2): 34–45. Russian.
5. Poltavceva OV. Kognitivnye narusheniya u pacientov s arterial'noj gipertenzij i tranzitornoj ishemicheskaj atakoj. *Sibirskij medicinskij zhurnal.* 2014; 29 (1): 39–43. Russian.
6. Bivard A, Lillcrap T, Maréchal B. Transient Ischemic Attack Result in Delayed Brain Atrophy and Cognitive Decline. *Stroke.* 2018; 49 (2): 384–90.
7. Lobzin SV, Lobzin VYu, Amurova TR, Mirzaeva LM, Nikishina OA, Nikiforova LG, i dr. Diskussionnye voprosy diagnostiki i patogeneticheskaj terapii hronicheskaj cerebral'noj ishemii s kognitivnymi narushenijami. *Medicinskij alfavit. Nevrologija i psihiatrija.* 2018; 1 (1): 5–14. Russian.
8. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. «Mini-mental state»: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research.* 1975; 12 (3): 189–98.
9. Zigmond AS, Snaith RP. The Hospital Anxiety and Depression scale. *Acta Psychiatr Scand.* 1983; (67): 361–70.
10. Zaxarov VV, Vaxnina NV. Insul't i kognitivnye narusheniya. *Zhurnal nevrologii i psihiatrii im. N. N. Korsakova (pril. Insul't).* 2008; (22): 6–21. Russian.
11. Damulin IV. Sosudistaja demencija: patogeneza, diagnostika i lechenie. Farmateka. 2010; (7): 13–8. Russian.
12. Hachinski V. World Stroke Day 2008: «Little strokes, Big Trouble». *Stroke.* 2008; 39 (9): 2407–8.
13. Maleina AYU, Kolokolov OV, Lukna EV. Rol' tranzitornoj ishemicheskaj ataki v vozniknovenii kognitivnyh narushenij (obzor). *Saratovskij nauchno-medicinskij zhurnal.* 2016; 12 (2): 273–7. Russian.
14. Gudkova VV, Shanina TV, Petrova EA, Stahovskaya LV. Tranzitornaja ishemicheskaja ataka-mul'tidisciplinarnaja problema. *Nevrologija. Nejropsihiatrija. Psihosomatika.* 2012; (3): 20–4. Russian.
15. Spurgeon L, James G, Sackley C. The Hospital Anxiety and Depression Scale: a pilot study to examine its latent structure and the link between psychological state and symptom severity in transient ischaemic attack patients. *Psychol Health Med.* 2016; 21 (5): 632–8.
16. Ihle-Hansen H, Thommessen B, Fagerland MW, Oksengård AR, Wyller TB, Engedal K, et al. Effect on anxiety and depression of a multifactorial risk factor intervention program after stroke and TIA: a randomized controlled trial. *Aging Ment Health.* 2014; 18 (5): 540–6.
17. Spurgeon L, James G, Sackley C. Subjective experiences of transient ischaemic attack: a repertory grid approach. *Disabil Rehabil.* 2013; 35 (26): 2205–12.
18. Boss HM, Van Schaik SM, Deijle IA, de Melker EC, van den Berg BT, Scherder EJ, et al. A randomised controlled trial of aerobic exercise after transient ischaemic attack or minor stroke to prevent cognitive decline: the MoveIT study protocol. *BMJ. Open.* 2014; 4 (12): e007065.
19. Boss HM, Van Schaik SM, Deijle IA, de Melker EC, van den Berg BT, Scherder EJ, et al. Safety and feasibility of post-stroke care and exercise after minor ischemic stroke or transient ischemic attack: MotiveS & MoveIT. *NeuroRehabilitation.* 2014; 34 (3): 401–7.
20. Kjörk E, Blomstrand C, Carlsson G, Lundgren-Nilsson Å, Gustafsson C. Daily life consequences, cognitive impairment, and fatigue after transient ischemic attack. *Acta Neurologica Scandinavica.* 2016; 133 (2): 103.

ДИНАМИКА СЕКРЕТОРНОГО IGA У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ СРЕДНЕЙ ТЯЖЕСТИ

Т. И. Сашкина, Г. С. Рунова, А. И. Абдуллаева, А. Ю. Божедомов ✉, И. В. Салдусова, О. В. Зайченко, Д. К. Фасхутдинов, С. И. Соколова
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Хронический генерализованный пародонтит (ХГП) широко распространен во всем мире. У больных снижается качество жизни, поэтому лечение данного заболевания является актуальной проблемой стоматологии. В настоящий момент терапию ХГП в Российской Федерации проводят по стандарту, не учитывающему важнейшую составляющую пародонта — мукозный барьер. Его состояние зависит от многих факторов, в том числе уровня секреторного иммуноглобулина А (s-IgA). Целью исследования было оценить состояние мукозного барьера для обоснования применения методов терапии, позволяющих восстановить его эффективность. В качестве инструмента для оценки эффективности слизистого барьера мы использовали уровень s-IgA, который определяли методом иммуноферментного анализа. Мы показали, что в ротовой жидкости у больных ХГП уровень s-IgA значительно снижен по сравнению со здоровыми. Проведенная стандартная терапия повышает его уровень, но он остается достоверно ниже, чем у здоровых ($54,6 \pm 30,5$ мкг/мл; $151,2 \pm 105,2$ мкг/мл соответственно). Увеличение проницаемости слизистого барьера приводит к появлению s-IgA в сыворотке периферической крови, причем его концентрация возрастает после проведенной терапии с $0,21 \pm 0,28$ мкг/мл до $0,35 \pm 0,47$ мкг/мл, что свидетельствует о значительных нарушениях целостности мукозного барьера у больных ХГП и о необходимости учитывать эти нарушения при проведении терапевтических мероприятий.

Ключевые слова: хронический генерализованный пародонтит, мукозный барьер, s-IgA

Информация о вкладе авторов: Т. И. Сашкина и Г. С. Рунова — планирование исследования, обработка полученных данных, редактирование рукописи; А. И. Абдуллаева — сбор данных, написание черновика рукописи; А. Ю. Божедомов — обработка полученных данных, статистическая обработка данных, редактирование рукописи; И. В. Салдусова, О. В. Зайченко, Д. К. Фасхутдинов и С. И. Соколова — обработка полученных данных, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Московского государственного медико-стоматологического университета (протокол № 23 от 26 мая 2011 г.), все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и публикацию результатов.

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Юрьевич Божедомов
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; alecso_84@mail.ru

Статья получена: 19.05.2019 **Статья принята к печати:** 04.06.2019 **Опубликована онлайн:** 14.06.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.039

DYNAMICS OF SECRETORY IGA IN PATIENTS WITH GENERALIZED CHRONIC PERIODONTITIS

Sashkina TI, Runova GS, Abdullaeva AI, Bozhedomov AYU ✉, Saldusova IV, Zaychenko OV, Faskhutdinov DK, Sokolova SI

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Generalized chronic periodontitis (GCP) is a widespread disease. It has a serious negative impact on the quality of a patient's life, posing a challenge to dentists all over the world. At present, standard therapy regimens for GCP adopted in the Russian Federation do not account for the mucosal barrier state, which is determined by a number of various factors, including the levels of secretory immunoglobulin A (sIgA). In our study, we attempted to assess the functional state of the mucosal barrier in patients with GCP and to provide a rationale for using immunotherapy aimed at restoring the effective barrier function of the oral mucosa. sIgA concentrations, which served as an indicator of the mucosal barrier state, were measured with ELISA. We found that patients with GCP had significantly lower sIgA concentrations in the oral fluid in comparison with healthy individuals. Although therapeutic procedures did help to increase sIgA levels, they still were much lower after therapy than in healthy volunteers (54.6 ± 30.5 µg/ml vs 151.2 ± 105.2 µg/ml). Increased permeability of the mucosal barrier caused sIgA to leak into the peripheral blood serum, where its concentration grew from 0.21 ± 0.28 µg/ml to 0.35 ± 0.47 µg/ml during the treatment course, suggesting damage to the mucosal integrity. This fact needs to be accounted for when treating patients with GCP.

Keywords: generalized chronic periodontitis, mucosal barrier, sIgA

Author contribution: Sashkina TI, Runova GS — study design, data processing, manuscript revision; Abdullaeva AI — data acquisition, manuscript draft preparation; Bozhedomov AYU — data processing, statistical analysis, manuscript revision; Saldusova IV, Zaychenko OV, Faskhutdinov DK, Sokolova SI — data processing, manuscript revision.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Moscow State University of Medicine and Dentistry (Protocol № 23 dated May 26, 2011). The patients gave informed consent to participation in the study and publication of its results.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey Yu. Bozhedomov
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; alecso_84@mail.ru

Received: 19.05.2019 **Accepted:** 04.06.2019 **Published online:** 14.06.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.039

Важнейшее значение в развитии воспалительных процессов в тканях пародонта имеет мукозный барьер. Его функциональное состояние определяют многие специфические и неспецифические гуморальные и клеточные факторы. Эпителий мукозного барьера постоянно обновляется, его заменяют новые молодые клетки, поэтому факторы, определяющие регенерацию, имеют существенное значение для его состоятельности. При пародонтите нарушены целостность тканей

пародонта, их кровоснабжение; возникает инфильтрация клетками — участниками патологического процесса, включающими клетки иммунной системы организма и пародонтопатогенные бактерии, что приводит к нарушению целостности мукозного барьера, снижению его эффективности и пролонгированию воспаления. Одной из важнейших составляющих мукозного барьера является секреторный иммуноглобулин А (s-IgA), который синтезируется в лимфоидной ткани, ассоциированной

со слюнными железами и лимфоцитами, находящимися под эпителием слизистой оболочки в *lamina propria*. К факторам, замедляющим восстановление тканей пародонта, относятся следующие: гипоксия, дисбаланс иммунной системы, изменения функциональной активности нейтрофилов, повышение концентрации провоспалительных цитокинов, изменение уровня s-IgA, что особенно отчетливо прослеживается при его заболеваниях. Определяя уровень s-IgA при патологии тканей пародонта, можно оценить состояние барьерных свойств слизистой оболочки полости рта. Это актуально для стоматологии и других медицинских специальностей, связанных с изучением состояния слизистых оболочек. Из публикаций последних лет следует, что при врожденной или приобретенной предрасположенности к ХГП отмечают снижение местного иммунитета, в первую очередь s-IgA, и одним из важных направлений терапии является введение в ее состав иммуномодуляторов [1–7]. Целью работы было оценить динамику s-IgA у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) как показателя состояния мукозного барьера для обоснования применения целевых методов терапии.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

На базе кафедры патологической физиологии и клинической патофизиологии РНИМУ им. Н. И. Пирогова было обследовано 178 пациентов с ХГП. Из них была выделена группа с пародонтитом средней степени тяжести в возрасте от 37 до 52 лет. Степень тяжести пародонтита диагностировали согласно критериям Стоматологической ассоциации России (СТАР, 2012). Концентрацию s-IgA определяли в ротовой жидкости 25 больных. Контролем служили 23 образца ротовой жидкости здоровых добровольцев в возрасте от 25 до 49 лет.

Критерии включения пациентов в исследование: сознательное участие в исследовании, подтвержденное добровольным (письменным) согласием; отсутствие соматической патологии стадии декомпенсации; отсутствие тяжелых окклюзионных нарушений; сохранность зубного ряда с наличием одиночных коронок и отсутствие съемных ортопедических конструкций.

Критерии исключения: наличие других воспалительных или дегенеративных заболеваний полости рта; системные воспалительные и аутоиммунные заболевания, тяжелые хронические заболевания в фазе декомпенсации; профессиональные вредности, профессиональные заболевания в стадии декомпенсации; наличие тяжелых обменных нарушений (сахарный диабет, ожирение, подагра и т. д.); наличие острых воспалительных заболеваний (ОРВИ, пневмония, бронхит и т. п.); беременность, климактерический синдром; курение, алкогольная и наркотическая зависимость; несогласие с условиями исследования.

Всем пациентам основной группы был осуществлен стандартный объем терапии, рекомендованный СТАР для лечения ХГП средней степени тяжести: санировали полость рта антисептиками (хлоргексидином, мирамистином, триклозаном); устраняли местные факторы, раздражающие ткани пародонта (санация десневых карманов, удаление зубного камня); назначали антибиотикотерапию (метронидазол местно в виде аппликаций, инстилляций). Курс лечения в среднем составлял 10–14 дней.

Уровень s-IgA определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) в ротовой жидкости и в сыворотке

периферической крови до и после стандартного лечения. Для определения s-IgA использовали моноклональные антитела, специфичные к секреторному компоненту иммуноглобулина (Seramun Diagnostica GmbH; ФРГ). Слюну получали натошак или не ранее чем через час после приема пищи.

Статистический анализ полученных данных проводили, применяя критерий Стьюдента для сравнения выборок с нормальным распределением. Нормальность распределения выборки определяли при помощи теста Шапиро–Уилка. При значении критерия более 0,05 считали, что выборка соответствует нормальному распределению. Определяли дисперсию выборок до и после лечения. При ее равенстве в группах рассчитывали средние величины (M), стандартное отклонение средней величины (σ) и сравнивали расчетные значения данных критериев с табличными, считая что уровень статистической значимости p в соответствии со стандартом для медико-биологических исследований должен быть равным менее 0,05. Данные представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm \sigma$).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ *Statistica v10.0* (StatSoft; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Секреторный иммуноглобулин А вырабатывают плазматические клетки, являющиеся результатом дифференцировки В-лимфоцитов, ассоциированных с большими и малыми слюнными железами, а также находящиеся в *lamina propria* слизистой оболочки полости рта. Затем он поступает в те полости, которые покрыты этими слизистыми оболочками. Поэтому s-IgA не должен присутствовать в периферической крови. Мы сделали предположение, что нарушение целостности слизистых оболочек приводит к появлению s-IgA в сыворотке крови.

Анализ полученных нами результатов показал, что s-IgA определяется в сыворотке и в ротовой жидкости пациентов с ХГП. В ротовой жидкости больных уровень s-IgA был статистически значимо ниже, чем у здоровых добровольцев как до, так и после лечения по стандартной схеме. Уровень s-IgA в сыворотке крови у больных до лечения составлял $0,21 \pm 0,28$ мкг/мл, что превышало показатели здоровых людей ($0,11 \pm 0,06$ мкг/мл).

В ротовой жидкости больных уровень s-IgA составлял до лечения $36,5 \pm 28,6$ мкг/мл, после лечения $54,6 \pm 30,5$ мкг/мл, что значимо ниже ($p < 0,05$), чем в группе здоровых добровольцев ($151,2 \pm 105,2$ мкг/мл). В сыворотке у больных ХГП s-IgA был обнаружен как до, так и после проведенной терапии. После лечения отмечен рост его концентрации с $0,21 \pm 0,28$ до $0,35 \pm 0,47$ мкг/мл. Это нетипично, но, учитывая, что уровень s-IgA в ротовой жидкости в ходе терапии увеличился на 52%, а в сыворотке крови на 50%, полученный результат можно объяснить тем, что восстановления слизистого барьера не произошло, его проницаемость осталась повышенной. Поэтому обнаружено примерно одинаковое увеличение уровня s-IgA в ротовой жидкости и в сыворотке крови пациентов (рис. 1 и 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Следует отметить, что уровень s-IgA по сравнению с исходным возрос на 51%, однако это увеличение составило



Рис. 1. Концентрация s-IgA в ротовой жидкости у больных ХГП до и после традиционного лечения (** — $p < 0,05$)



Рис. 2. Концентрация s-IgA в сыворотке у больных ХГП до и после традиционного лечения

всего 35% от контрольных значений, что, по-видимому, недостаточно для эффективной защиты тканей пародонта при наличии других предрасполагающих факторов и не может обеспечить их регенерацию и стабильность. Такие условия способствуют усилению колонизации тканей микроорганизмами, так как у этой категории больных наблюдаются нарушения не только адаптивного, но и врожденного иммунитета, обусловленного лизоцимом, интерферонами, лактоферрином и другими факторами (рис. 3) [8].

Наше предположение, что при ХГП нарушен мукозный барьер для IgA подтверждают данные, полученные при определении s-IgA в сыворотке крови пациентов. Оно показало повышение его уровня после проведения стандартного лечения. Увеличение уровня s-IgA в ротовой жидкости можно объяснить тем, что стандартное лечение предполагает обязательное использование антимикробных препаратов, проведение процедур профессиональной гигиены, что приводит к снижению микробной нагрузки на ткани пародонта. Уменьшение количества микроорганизмов высвобождает s-IgA, поскольку он меньше расходуется, но не наблюдается увеличение его синтеза (рис. 4).

Кроме того, проведенное исследование показало, что терапия по стандартной схеме приводит к временному улучшению состояния тканей пародонта, которое мы объясняем снижением микробной нагрузки на них вследствие применения антимикробных препаратов и процедур профессиональной гигиены. Восстановления слизистого барьера, по-видимому, не происходит,

поскольку его проницаемость сохраняется повышенной и после лечения. Этот вывод мы сделали в связи с тем, что после терапии происходит увеличение уровня s-IgA как в ротовой жидкости, так и в сыворотке крови. Поэтому, несмотря на положительную динамику пародонтальных индексов и признаков воспаления (уменьшение отека, кровоточивости, снижение болевых ощущений, исчезновение частично или полностью субъективных проявлений дискомфорта в ротовой полости), необходимо искать способы повышения эффективности лечения хронических воспалительных заболеваний пародонта, учитывающих все механизмы патологии, в том числе нарушение целостности мукозного барьера.

ВЫВОДЫ

Стандартная схема лечения ХГП, включающая проведение процедур профессиональной гигиены, назначение антимикробных препаратов и противовоспалительной терапии, не воздействует на состояние мукозного барьера, который в большой степени определяет возможность альтерации и регенерации тканей пародонта. Это видно из повышения концентрации s-IgA в крови больных с ХГП после лечения. При нарушении его целостности факторы патогенности микроорганизмов поражают ткани пародонта, что приводит к их ремоделированию и рефрактерным к терапии изменениям. Для повышения эффективности лечения воспалительных заболеваний пародонта необходим комплексный подход, учитывающий все механизмы патологии.

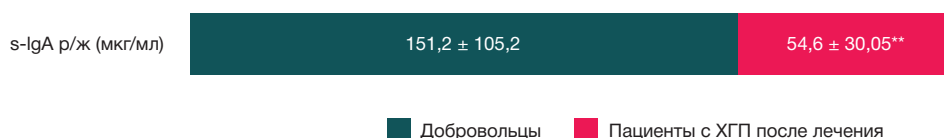


Рис. 3. Сравнение показателей концентрации s-IgA в ротовой жидкости у больных ХГП после традиционного лечения и у здоровых добровольцев (** — $p < 0,05$)



Рис. 4. Сравнение показателей концентрации s-IgA в сыворотке крови у больных ХГП после традиционного лечения и у здоровых добровольцев (** — $p < 0,05$)

Литература

1. Сашкина Т. И., Воложин А. И., Атаканова З. А., Шевченко Т. В. Повышение местного иммунитета в полости рта с помощью жевательных таблеток Колострум (молозиво новозеландских коров). *Cathedra. Стоматологическое образование*. 2007; 6 (3): 30–3.
2. Хоружая Р. Е., Хоружий М. Е., Исаков С. В. Состояние слизистой оболочки полости рта и тканей пародонтального комплекса у пациентов кардиологического профиля. *Вестник неотложной и восстановительной медицины*. 2011; 12 (2): 287–90.
3. Ким М. И. Воспалительные заболевания пародонта как проявление системной дисфункции эндотелия. *Крымский терапевтический журнал*. 2012; (2): 38–40.
4. Дмитриева Л. А., редактор. *Пародонтит. Учебное пособие*. М.: МЕДпрессИнформ, 2007; 25 с.
5. Шатохин А. И. Пародонтопатии при ВИЧ-инфекции как прогностический показатель иммуносупрессии. *Пародонтология*. 2012; 17 (3): 3–6.
6. Strobel S. Oral tolerance, systemic immunoregulation and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; (958): 47–58.
7. Sugawara S, Uehara A, Tamai R, Takada H. Innate immune responses in oral mucosa. *J Endotoxin Res*. 2002; 8 (6): 465–8.
8. Чурилов Л. П., Васильев А. Г. Патофизиология иммунной системы. СПб.: Фолиант, 2014; 664 с.

References

1. Sashkina TI, Volozhin AI, Atakanova ZA, Shevchenko TV. Povyshenie mestnogo immuniteta v polosti rta s pomoshh'ju zhevatel'nyh tabletok Kolostrum (moloziwo novozelandskih korov). *Cathedra. Stomatologicheskoe obrazovanie*. 2007; 6 (3): 30–3. Russian.
2. Horuzhaya RE, Horuzhij ME, Isakov SV. Sostojanie slizistoj obolochki polosti rta i tkanej parodontal'nogo kompleksa u pacientov kardiologicheskogo profilja. *Vestnik neotlozhnoj i vosstanovitel'noj mediciny*. 2011; 12 (2): 287–90. Russian.
3. Kim MI. Vospalitel'nye zabolevaniya parodonta kak projavlenie sistemnoj disfunkcii jendotelija. *Krims'kij terapevtichnij zhurnal*. 2012; (2): 38–40. Russian.
4. Dmitrieva LA, redaktor. *Parodontit. Uchebnoe posobie*. M.: MEDpresInform, 2007; 25 s. Russian.
5. Shatohin AI. Parodontopatii pri VICH-infekcii kak prognosticheskij pokazatel' immunosupressii. *Parodontologija*. 2012; 17 (3): 3–6. Russian.
6. Strobel S. Oral tolerance, systemic immunoregulation and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; (958): 47–58.
7. Sugawara S, Uehara A, Tamai R, Takada H. Innate immune responses in oral mucosa. *J Endotoxin Res*. 2002; 8 (6): 465–8.
8. Churilov LP, Vasilyev AG. *Patofiziologija immunnoj sistemy*. SPb.: Foliant, 2014; 664 s. Russian.

ГИПОГРАВИТАЦИЯ КАК ФАКТОР РИСКА ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ ВНУТРИГЛАЗНОГО ДАВЛЕНИЯ

М. А. Вальях¹✉, Д. В. Кац¹, Н. Г. Глазко², М. В. Баранов³¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия² Городская клиническая больница № 15 имени О. М. Филатова, Москва, Россия³ Научно-исследовательский институт космической медицины, Москва, Россия

Космическая медицина давно занимается исследованием воздействия условий измененной гравитации на организм человека. За последнее время все больше внимания исследователи уделяют изменениям со стороны органа зрения. В первую очередь, это связано с увеличением жалоб космонавтов на недостаточную остроту зрения во время и после окончания космических полетов. Среди наиболее важных изменений у них было обнаружено повышение внутриглазного давления (ВГД) — наиболее опасная патология, нередко приводящая к необратимой слепоте за счет поражения зрительного нерва. Целью исследования было выяснить влияние измененной гравитации на офталмотонус. Для этого 48 здоровых мужчин, средний возраст которых не превышал 22 года, были разделены на две равные по численности группы: группу контроля и группу, в которой моделировали условия гипогравитации путем помещения испытуемых в ортостатическое положение на время всего эксперимента (21 сутки). Измерение ВГД проводили в четырех контрольных точках эксперимента с помощью тонометра Маклакова. Была использована Z-аппроксимация T-критерия Уилкоксона. Среднее увеличение ВГД в группе моделирования гипогравитации составило $3,42 \pm 0,03$ мм рт. ст. ($p < 0,01$). Стоит отметить, что данные изменения носили транзиторный характер и после окончания воздействия условий измененной гравитации показатели вернулись к исходным значениям.

Ключевые слова: ортостатическое положение тела, гипогравитация, космический полет, внутриглазное давление

Благодарности: доценту кафедры офтальмологии имени академика А. П. Нестерова лечебного факультета, кандидату медицинских наук Кацу Д. В. из РНИМУ имени Н. И. Пирогова за редакцию статьи; заместителю директора, кандидату медицинских наук Баранову М. В. из НИИ космической медицины за помощь в подборе испытуемых; врачу-офтальмологу Глазко Н. Г. из ГКБ № 15 имени О. М. Филатова за обработку полученных данных.

Информация о вкладе авторов: М. А. Вальях — анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи; Н. Г. Глазко — обработка полученных данных; М. В. Баранов — подбор испытуемых; Д. В. Кац — редактирование текста статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 150 от 14 декабря 2015 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Максим Андреевич Вальях
ул. Вешняковская, д. 23, г. Москва, 111539; maxvalyakh@gmail.com

Статья получена: 03.06.2019 **Статья принята к печати:** 17.06.2019 **Опубликована онлайн:** 19.06.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.041

HYPOGRAVITY AS A RISK FACTOR FOR INCREASED INTRAOCULAR PRESSURE

Valyakh MA¹✉, Kats DV¹, Glazko NG², Baranov MV³¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia² Filatov City Clinical Hospital № 15, Moscow, Russia³ Research Institute for Space Medicine, Moscow, Russia

Space medicine has long studied the impact of reduced gravity on the human body. Increasing complaints of insufficient visual acuity during and after space flights have been recently drawing a lot of attention to the effects of hypogravity on astronauts' vision. Abnormally high intraocular pressure (IOP) is one of the most clinically important changes occurring during space missions. It is a serious condition that often causes irreversible damage to the optic nerve and blindness. The aim of this study was to explore the effect of reduced gravity on IOP. The study recruited 48 young healthy men with the mean age of 22 years, who formed 2 equally sized groups. In the experimental group, hypogravity was simulated by placing the subjects into the orthostatic position for 21 days. IOP was measured at 4 time points using a Maklakov tonometer. Z-approximation of the Wilcoxon T test was applied. The average increase in IOP in the experimental group was 3.42 ± 0.03 mmHg ($p < 0.01$). The changes were, however, transient, and IOP levels went back to normal right after the exposure to hypogravity conditions was terminated.

Keywords: orthostatic body position, hypogravity, space flight, intraocular pressure

Acknowledgement: the authors thank Kats DV, Cand. Sci (Med), Assistant Professor at the Department of Ophthalmology of Pirogov Russian National Research Medical University, for revising the manuscript; Baranov MV Cand. Sci (Med), Vice Principal of Research Institute for Space Medicine, for helping with the recruitment process; Glazko NG, ophthalmologist at Filatov City Clinical Hospital No. 15, for his assistance with data analysis.

Author contribution: Valyakh MA — literature analysis, data acquisition, analysis and interpretation, manuscript preparation; Glazko NG — data analysis; Baranov MV — recruitment of participants; Kats DV — manuscript revision.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol № 150 dated December 14, 2015).

✉ **Correspondence should be addressed:** Maxim A. Valyakh
Veshniakovskaya 23, Moscow, 111539; maxvalyakh@gmail.com

Received: 03.06.2019 **Accepted:** 17.06.2019 **Published online:** 19.06.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.041

Влияние измененной гравитации на организм человека во время космических экспедиций изучают достаточно давно. Однако внимание изменениям со стороны органа зрения у космонавтов стали уделять только в последнее время. В частности, были зафиксированы подъемы внутриглазного давления (ВГД) в условиях измененной гравитации, а

именно в условиях сниженной гравитационной силы — гипогравитации. Данный вид гравитации обнаружен на Луне и предположительно на других планетах нашей Солнечной системы [1–5].

Первые данные о повышении ВГД во время космических полетов были получены с помощью ручного

аппланационного тонометра: было зафиксировано увеличение ВГД на 20–25% в течение первого часа от начала экспедиции [6].

Рядом других исследователей с помощью аппланационного тонометра Топо-реп был выявлен подъем уровня ВГД больше, чем у половины астронавтов во время орбитального полета [7].

Учитывая данные зарубежных коллег об изменениях со стороны органа зрения во время космических полетов, а также возросшую частоту космических экспедиций в последнее время и то, что увеличение ВГД может приводить к необратимому повреждению нервных волокон диска зрительного нерва (ДЗН), вызывая тем самым снижение зрения и/или слепоту, было принято решение о проведении клинического эксперимента с целью выявления взаимосвязи между гипогравитацией и уровнем офтальмотонуса. Стоит отметить, что помимо повышения уровня ВГД были зафиксированы и другие изменения со стороны органа зрения в процессе проведения исследований иностранными учеными, однако ни одно из них не было столь значимо, как увеличение уровня офтальмотонуса.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Данное исследование проводили в июле 2016 г. на базе кафедры офтальмологии лечебного факультета им. академика А. П. Нестерова РНИМУ им. Н. И. Пирогова, в ГКБ № 15 им. О. М. Филатова при участии ФГБУ ФНКЦ ФМБА России в НИИ космической медицины.

Для участия в эксперименте были отобраны 48 участников (96 глаз) молодого возраста. Критерии включения в исследование: 1) мужчины в возрасте 18–35 лет; 2) хорошая физическая подготовка; 3) нормальная рефракция глаза — эметропия или миопия слабой или средней степени (до –6 диоптрий). Критерии исключения: 1) наличие острых офтальмологических заболеваний; 2) наличие дистрофии роговицы; 3) миопия высокой степени (от –6 диоптрий и выше); 4) наличие в анамнезе операций на роговице; 5) наличие иных соматических патологий; 6) иной возраст и пол. Все участники были разделены на две равные группы путем открытой сравнительной рандомизации (метод конвертов).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы *Statistica* 8.0 (StatSoft Inc.; США). Приводимые параметры, имеющие нормальное распределение, представлены в формате: $M \pm m$, где M — среднее значение, m — ошибка среднего значения. Для попарного сравнения двух независимых выборок применяли Z -аппроксимацию U -критерия Манна–Уитни, для повторных внутригрупповых сравнений — Z -аппроксимацию T -критерия Уилкоксона. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным $< 0,05$.

В 1-й группе были созданы условия, имитирующие нахождение в гипогравитации. Таких условий достигали

за счет помещения испытуемых в ортостатическое положение, т. е. с углом наклона головного конца тела $+9,6^\circ$ относительно горизонтальной оси на дневной период и горизонтального положения в ночной период. Такое положение испытуемых в пространстве сохраняли в течение 21 суток. Обследуемые находились в помещениях, где была создана полная изоляция от внешних раздражающих факторов: повышена звукоизоляция, плотно закрыты окна. В помещении с испытуемыми могли находиться только представители медицинского персонала, участвующие в эксперименте; родственники и/или друзья не допускали. В строго регламентированное время было разрешено пользоваться телефоном и компьютером, читать. Обследования, процедуры личной гигиены, а также прием пищи в течение 21 дня наблюдения можно было проводить тоже в горизонтальном положении, не вставая с кровати.

Во 2-й группе, которая получила название «контроль», отсутствовали ограничения положения в пространстве, в ночной период (с 23:00 до 8:00) обследуемые находились в горизонтальном положении. Наблюдение длилось в течение 21 суток, регламент проведения обследований совпадал с регламентом в другой группе. Испытуемые имели право свободно перемещаться по территории, где проходил эксперимент, видаться с родственниками и друзьями, не находились в условиях повышенной изоляции от внешних раздражающих факторов (звукоизоляция была стандартная, окна не закрыты) (табл. 1).

Во время исследования были определены четыре основные точки: 1) первая точка, носившая название исходного измерения и/или фона — перед началом эксперимента (за день до помещения испытуемых в соответствующие условия); 2) вторая точка — на 11-е сутки эксперимента; 3) третья — на 21-е сутки; 4) четвертая точка — на первые сутки после окончания эксперимента (следующий день после прекращения нахождения в соответствующих условиях).

Для выявления изменений со стороны гидродинамики глаза всем испытуемым проводили измерение ВГД в установленные временные точки в утренние часы, когда повышение уровня ВГД достигает максимальных значений.

Помимо данного исследования всем пациентам проводили прямую офтальмоскопию в установленные контрольные точки, а также компьютерную периметрию до начала эксперимента и по его окончании с целью выявления возможных повреждений волокон зрительного нерва.

Измерение уровня ВГД

Исследование проводили с помощью аппланационного тонометра Маклакова (ПАО «Красногвардеец»; Россия), используя груз 10 г. Полученные данные были оценены с помощью переводной линейки Нестерова–Егорова и

Таблица 1. Общая характеристика групп исследования

Группы	Признак		
	Количество пациентов/глаз	Положение испытуемых в пространстве	Средний возраст со средней ошибкой (лет)
1-я группа: модель гипогравитации	24/48	Чередование ортостатического положения с углом наклона тела $+9,6^\circ$ в дневной период и горизонтального положения на ночной период (1–21 сутки наблюдения)	$21,75 \pm 3,83$
2-я группа: контроль	24/48	Без ограничений в пространстве (1–21 сутки наблюдения)	$21,21 \pm 2,54$

представлены в значениях, равных показателям истинного (определяет действительный уровень офталмотонуса и общепринятого в мировой офтальмологической практике) ВГД (P_0 , мм рт. ст.). Нормальный уровень истинного ВГД (P_0) при измерении ВГД тонометром Маклакова весом 10 г достигает 10–22 мм рт. ст.

Прямая офтальмоскопия

Исследование глазного дна проводили при помощи электронного офтальмоскопа ВХα, регистрационный номер ФС № 2005/1022 (NEITZ; Япония). Измерения проводили на узких зрачках без использования капель, вызывающих медикаментозный мидриаз во время эксперимента, и в состоянии медикаментозного мидриаза до начала эксперимента и на первые сутки после его окончания.

Компьютерная периметрия

Оценку полей зрения проводили методом статической периметрии на приборе Humphrey Field Analyzer II 750i (Zeiss; Германия), регистрационный номер ФСЗ № 2008/02964. При анализе полученных данных учитывали показатели достоверности проведенного исследования: число ложноположительных и ложноотрицательных ответов, данные о потере фиксации взора.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При анализе данных, полученных в ходе эксперимента, в 1-й группе (группа «модель гипогравитации») отмечается статистически значимое повышение уровня офталмотонуса у всех испытуемых, которое было

зафиксировано во время измерения ВГД на 11-е сутки, равное $3,33 \pm 0,08$ мм рт. ст. На 21-е сутки эксперимента было отмечено продолжение увеличения уровня ВГД ($3,42 \pm 0,03$ мм рт. ст.) по сравнению с данными, полученными до начала эксперимента. Однако стоит отметить, что на первые сутки после окончания эксперимента значения ВГД вернулись к значениям, соотносимым со значениями, полученными до начала эксперимента (табл. 2).

При оценке результатов прямой офтальмоскопии на протяжении всего эксперимента ни у одного испытуемого не было зафиксировано отклонений от нормы. Диск зрительного нерва (ДЗН) — бледно-розовый, экскавация физиологическая (0,3–0,4), сосудистый пучок в центре, ход и калибр сосудов не изменен, макулярная область без особенностей, на периферии зон дистрофии и/или разрывов нет.

По данным компьютерной периметрии, грубых нарушений в виде абсолютных скотом или значительного увеличения слепого пятна при анализе показателей испытуемых в этой группе выявлено не было.

В группе «контроль» никаких изменений уровня ВГД во время эксперимента и по его окончании не было зафиксировано. Значения у всех испытуемых были в пределах нормы на протяжении всего исследования (табл. 3). Так же как и в первой группе при оценке данных прямой офтальмоскопии и компьютерной периметрии, отклонений от нормы зафиксировано не было.

Статистический анализ изменений ВГД, зафиксированных в исследуемых группах с помощью *U*-критерия Манна–Уитни для двух несвязанных совокупностей, позволил определить следующее: для групп «модель гипогравитации» и «контроль» $U_{\text{эмп.}} = 0$, тогда как $U_{\text{кр.}} = 834$ ($p < 0,01$), что говорит о статистической достоверности и значимости полученных результатов.

Таблица 2. Исследование ВГД в группе «модель гипогравитации»

Срок исследования	Параметр	
	Среднее ВГД со средней ошибкой, мм рт. ст.	
Исходное	$15,75 \pm 0,72$	
11-е сутки	$19,08 \pm 0,64$	
	Δ исходное — 11-е сутки эксперимента	$3,33 \pm 0,08$ $p < 0,01$
21-е сутки	$19,17 \pm 0,69$	
	Δ исходное — 21-е сутки эксперимента	$3,42 \pm 0,03$ $p < 0,01$
Первые сутки после выхода испытуемых из эксперимента	$15,67 \pm 0,62$	
	Δ исходное — 1-е сутки после окончания эксперимента	$0,08 \pm 0,1$ $p > 0,05$

Таблица 3. Исследование ВГД в группе «контроль»

Срок исследования	Параметр	
	Среднее ВГД со средней ошибкой, мм рт. ст.	
Исходное	$15,75 \pm 0,72$	
11-е сутки	$15,79 \pm 0,73$	
	Δ исходное — 11-е сутки эксперимента	$0,04 \pm 0,01$ $p > 0,05$
21-е сутки	$15,71 \pm 0,71$	
	Δ исходное — 21-е сутки эксперимента	$0,04 \pm 0,01$ $p > 0,05$
Первые сутки после выхода испытуемых из эксперимента	$15,77 \pm 0,71$	
	Δ исходное — 1-е сутки после окончания эксперимента	$0,02 \pm 0,01$ $p > 0,05$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гипогравитация оказывает влияние на офтальмотонус, приводя к повышению ВГД. Во время клинического эксперимента были получены статистически достоверные и значимые результаты повышения ВГД. Среднее увеличение данного показателя составило $3,42 \pm 0,03$ мм рт. ст. Однако можно предположить, что влияние гипогравитации на офтальмотонус носит транзиторный характер, так как уже в первые сутки после окончания эксперимента происходит восстановление уровня ВГД.

Данные изменения можно объяснить тем, что во время нахождения в условиях моделирования гипогравитации в организме испытуемых происходит перераспределение жидкости, сопровождающееся увеличением кровенаполнения структур и органов головы и шеи, в том числе сосудистой оболочки глаза. Эти изменения могут приводить к уменьшению внутриглазного объема, а соответственно к увеличению ВГД. В дальнейшем при адаптации организма к условиям, имитирующим космический полет, развивается гипогидратация путем снижения реабсорбции жидкости и электролитов в почечных канальцах, усиления клубочковой фильтрации, и в несколько раз возрастает диурез и выведение осмотических активных веществ, что приводит

к нормализации ВГД [8]. Другое возможное объяснение данных изменений заключается в том, что в результате перераспределения жидкости в организме испытуемых происходит повышение выработки внутриглазной жидкости и затруднение ее оттока через дренажную систему глаза [9].

ВЫВОДЫ

1. При анализе показателей офтальмотонуса во время эксперимента по моделированию гипогравитации были получены статистически достоверные и значимые результаты о повышении уровня ВГД в период с момента начала эксперимента и до 21 суток исследования ($p < 0,01$). 2. Изменения ВГД в условиях гипогравитации носит транзиторный характер, после окончания воздействия данных условий уровень офтальмотонуса возвращается к исходным показателям. 3. По данным прямой офтальмоскопии, никаких изменений на глазном дне, в частности на ДЗН, у испытуемых во время нахождения в условиях моделирования гипогравитации не происходит. 4. По результатам компьютерной периметрии в ходе эксперимента по созданию измененных условий гравитации значимых изменений зафиксировано не было.

Литература

1. Rastegar N, Eckart P, Mertz M. Radiation — induced cataract in astronauts and cosmonauts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2002; (240): 534–47.
2. Thomas H, Mader C, Robert OD, Anastas F. Optic Disc Edema, Globale Flattening, Choroidal Folds, and Hyperopic Shifts Observed in Astronauts after Long — duration Space Flight. *American Academy of Ophthalmology Published by Elsevier Inc*. 2011; 2058–70.
3. Chylack BE, Peterson LE, Feiveson AH, et al. NASA study of cataract in astronauts (NASA). Report 1: Cross — sectional study of the relationship of exposure to space radiation and risk of lens opacity. *Radiat Res*. 2009; (172): 10–20.
4. Cucinotta FA, Manuel FK, Jones J, et al. Space radiation and cataracts in astronauts. *RADIAT Res*. 2001; 460–6.
5. Frey MA. Radiation health: mechanism of radiation — induced cataracts in astronauts. *Aviat Space Environ Med*. 2009; 575–6.
6. Draeger J. Tonometry under microgravity conditions. *Norderney Symposium on Scientific Results of the German Spacelab Mission D1*. 1986; 503–9.
7. Mekjavic PJ, Eiken O, Mekjavic IB. Visual function after prolonged bed rest. *J Gravit Physiol*. 2002; (9): 31–2.
8. Kergoat H, Lovasik JV. Seven-degree head-down tilt reduces choroidal pulsatile ocular blood flow. *Aviation, Space and Environmental Medicine*. 2005; 76 (10): 930–5.
9. Mader TH, Gibson GR, Pass AF, et al. Optic disc edema globe flattening, choroidal folds, and hyperopic shifts observed in astronauts after long-duration space flight. *Ophthalmology*. 2011; (118): 2058–69.

References

1. Rastegar N, Eckart P, Mertz M. Radiation — induced cataract in astronauts and cosmonauts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2002; (240): 534–47.
2. Thomas H, Mader C, Robert OD, Anastas F. Optic Disc Edema, Globale Flattening, Choroidal Folds, and Hyperopic Shifts Observed in Astronauts after Long — duration Space Flight. *American Academy of Ophthalmology Published by Elsevier Inc*. 2011; 2058–70.
3. Chylack BE, Peterson LE, Feiveson AH, et al. NASA study of cataract in astronauts (NASA). Report 1: Cross — sectional study of the relationship of exposure to space radiation and risk of lens opacity. *Radiat Res*. 2009; (172): 10–20.
4. Cucinotta FA, Manuel FK, Jones J, et al. Space radiation and cataracts in astronauts. *RADIAT Res*. 2001; 460–6.
5. Frey MA. Radiation health: mechanism of radiation — induced cataracts in astronauts. *Aviat Space Environ Med*. 2009; 575–6.
6. Draeger J. Tonometry under microgravity conditions. *Norderney Symposium on Scientific Results of the German Spacelab Mission D1*. 1986; 503–9.
7. Mekjavic PJ, Eiken O, Mekjavic IB. Visual function after prolonged bed rest. *J Gravit Physiol*. 2002; (9): 31–2.
8. Kergoat H, Lovasik JV. Seven-degree head-down tilt reduces choroidal pulsatile ocular blood flow. *Aviation, Space and Environmental Medicine*. 2005; 76 (10): 930–5.
9. Mader TH, Gibson GR, Pass AF, et al. Optic disc edema globe flattening, choroidal folds, and hyperopic shifts observed in astronauts after long-duration space flight. *Ophthalmology*. 2011; (118): 2058–69.

БИОНИЧЕСКИЙ ГЛАЗ: ВОЗМОЖНОСТИ ЭПИРЕТИНАЛЬНОЙ ПРОТЕЗНОЙ СИСТЕМЫ ARGUS II В ЗРИТЕЛЬНОЙ И СОЦИАЛЬНОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ СЛЕПЫХ ПАЦИЕНТОВ С ТЕРМИНАЛЬНОЙ СТАДИЕЙ ПИГМЕНТНОГО РЕТИНИТА

Х. П. Тахчиди¹, Г. Ф. Качалина², Н. Х. Тахчиди², Р. А. Маноян², П. В. Глизница¹✉

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² Научно-клинический центр оториноларингологии ФМБА, Москва, Россия

При пигментном ретините происходит гибель наружных слоев сетчатки, сопровождающаяся значительными нарушениями зрительных функций вплоть до слепоты. Сохранность внутренних слоев сетчатки при данной патологии позволила разработать специальные устройства, использующие прямую электрическую стимуляцию для получения зрительного восприятия. В работе представлены результаты впервые проведенных в Российской Федерации двух операций по имплантации эпиретинальной протезной системы Argus II. Обе операции прошли успешно, осложнения отсутствовали на протяжении всего периода наблюдения. После прохождения трех курсов реабилитации пациенты приобрели навыки перемещения внутри помещения и на открытых пространствах, способны определять локализацию высококонтрастных мелких предметов, контуры больших предметов, силуэты людей.

Ключевые слова: бionic eye, искусственное зрение, эпиретинальный протез, имплантат, Argus II, пигментный ретинит, абитрофия сетчатки

Информация о вкладе авторов: Х. П. Тахчиди — планирование исследования, анализ литературы, проведение хирургических операций, анализ и интерпретация данных; Г. Ф. Качалина — планирование исследования, анализ литературы, анализ и интерпретация данных; Н. Х. Тахчиди — подготовка рукописи, анализ литературы; Р. А. Маноян — курация, участие в реабилитации, сбор данных; П. В. Глизница — курация, участие в реабилитации, сбор данных, подготовка рукописи.

Соблюдение этических стандартов: клиническое исследование медицинского изделия «Система ретинальной имплантации Argus II с принадлежностями» одобрено этическим комитетом ФГБУ НКЦО ФМБА России (протокол № 5/2017 от 14 июня 2017 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и публикацию результатов.

✉ **Для корреспонденции:** Павел Викторович Глизница
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117513; gliznitsa@icloud.com

Статья получена: 04.06.2019 **Статья принята к печати:** 19.06.2019 **Опубликована онлайн:** 25.06.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.042

A BIONIC EYE: PERFORMANCE OF THE ARGUS II RETINAL PROSTHESIS IN LOW-VISION AND SOCIAL REHABILITATION OF PATIENTS WITH END-STAGE RETINITIS PIGMENTOSA

Takhchidi KhP¹, Kachalina GF², Takhchidi NK², Manoyan RA², Gliznitsa PV¹✉

¹ Pirogov Russian National Medical Research University, Moscow, Russia

² Scientific Clinical Center of Otorhinolaryngology, FMBA of Russia, Moscow, Russia

The death of outer retinal layers occurring in retinitis pigmentosa causes severe visual impairment and often leads to total blindness. Inner retinal layers are spared, though, which provides a possibility of inducing visual perception by direct electrical stimulation of intact retinal cells. This article presents clinical outcomes of two patients who were the first in Russia to have received the Argus II Retinal Prosthesis System. Both implantations were successful. No complications were reported throughout the entire follow-up period. Upon completing 3 rehabilitation sessions, the patients were able to navigate indoors and outdoors, locate small high-contrast objects, discern contours of large objects and people's silhouettes.

Keywords: bionic eye, artificial vision, retinal prosthesis, implant, Argus II, retinitis pigmentosa, retinal abiotrophy

Author contribution: Takhchidi KhP — study design, literature analysis, implantation surgery, data analysis and interpretation; Kachalina GF — study design, literature analysis, data analysis and interpretation; Takhchidi NK — manuscript preparation, literature analysis; Manoyan RA — follow-up observation, rehabilitation sessions, data collection; Gliznitsa PV — follow-up observation, rehabilitation sessions, data collection, manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: this clinical trial of the Argus II Retinal Prosthesis System was approved by the Ethics Committee of the National Research Clinical Center for Otorhinolaryngology (Protocol № 5/2017 dated June 14, 2017). The patients gave informed consent to participation in the trial and publication of their personal data.

✉ **Correspondence should be addressed:** Pavel V. Gliznitsa
Ostrovintyanova 1, Moscow, 117513; gliznitsa@icloud.com

Received: 04.06.2019 **Accepted:** 19.06.2019 **Published online:** 25.06.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.042

Пигментный ретинит — группа наследственных заболеваний, характеризующихся дистрофическим поражением пигментного эпителия и фоторецепторов с развитием выраженных нарушений зрения: сужением поля зрения, нарушением темновой адаптации, снижением остроты зрения вплоть до полной слепоты [1]. При пигментном ретините в патологический процесс не вовлечены внутренние слои сетчатки: биполярные

и ганглиозные клетки, слой нервных волокон [2, 3]. Сохранение внутренних слоев позволило разработать специальные устройства, позволяющие проводить прямую электрическую стимуляцию сетчатки с целью достижения зрительного восприятия [4, 5]. На сегодняшний день существует около десяти проектов ретинальных протезов на разных этапах развития, разработанных в разных странах.

Эпиретинальная протезная система Argus II является наиболее клинически востребованной из аналогов: успешно установлено более 350 протезов, система имеет одобрение для использования в коммерческой деятельности Европейского союза и для «гуманитарного использования» от Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) США [6, 7]. Система состоит из внешнего модуля (очки со встроенной камерой и видеопроцессором) и имплантируемого модуля (эписклеральный бандаж с электроникой и эпиретинальный электродный массив с 60 электродами, фиксируемый на сетчатке). Получая изображение с помощью встроенной в оправу камеры, видеопроцессор преобразует данные в специальные сигналы с последующей передачей на эпиретинальный протез и вызывает электрическую стимуляцию клеток сетчатки, что приводит к зрительному восприятию в виде узоров вспышек (фосфенов) [8]. В идеальном случае в протезе сетчатки один электрод должен активировать только соседние клетки и вызывать небольшие круглые светоощущения, что важно для восприятия формы наблюдаемых объектов [9].

Целью работы было оценить результаты использования эпиретинальной протезной системы Argus II для зрительной и социальной реабилитации слепых пациентов с терминальной стадией пигментного ретинита.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе Научно-исследовательского центра офтальмологии РНИМУ им. Н. И. Пирогова, Научно-клинического центра оториноларингологии ФМБА России. В рамках клинических исследований из 20 кандидатов было отобрано два пациента с пигментным ретинитом, которым впервые в России была выполнена хирургическая имплантация эпиретинального протеза Argus II (Second Sight Inc.; США). Первая операция состоялась 30 июня 2017 г., вторая 4 декабря 2017 г.

Критерии отбора пациентов для имплантации Argus II: терминальная стадия пигментного ретинита; отсутствие предметного зрения; острота зрения — неправильная светопроекция; наличие зрительных функций в анамнезе; возраст пациента старше 25 лет. Критерии исключения из исследования: наличие помутнений роговицы в оптической зоне; наличие заболеваний диска зрительного нерва; наличие хориоидальной неоваскуляризации; аксиальная длина глаза меньше 20,5 мм и больше 26 мм.

Случай № 1

Пациент У., 58 лет. Поступил в клинику с диагнозом «OU — пигментный ретинит, терминальная стадия». Острота зрения на оба глаза — $(1/\infty)$ pr. l. incertae. По данным электрофизиологического исследования, состояние проводящей системы правого глаза (OD) было определено как более перспективное для имплантации.

Результаты обследования перед операцией OD: острота зрения — $(1/\infty)$ pr. l. incertae, внутриглазное давление — 16 мм рт. ст. По данным биомикроскопии, передняя поверхность глаза без особенностей. В центральных отделах хрусталика были обнаружены начальные помутнения. Глазное дно: диск зрительного нерва (ДЗН) — бледный, восковидный, границы четкие; сосуды резко

сужены; макула сохранена с периферийным кольцом депигментации, макулярный рефлекс отсутствовал; периваскулярное скопление пигмента в виде «костных телец» в середине периферии вместе с атрофией сетчатки (рис. 1А).

По данным оптической когерентной томографии сетчатки (ОКТ), проведенной с помощью «Spectralis OCT» в режимах Cross Line (Heidelberg Engineering, Inc.; Германия), была выявлена атрофия сетчатки, особенно выраженная в наружных слоях. Результаты электрофизиологического исследования: порог электрической чувствительности (ПЭЧ) — 800 мкА, а электрическая лабильность — 60 Гц.

Хирургическую операцию проводили согласно протоколу, предоставленному компанией — производителем эпиретинальной системы. Время операции составило 5 ч. Оперативное вмешательство включало следующие этапы: экстракцию хрусталика с имплантацией интраокулярной линзы; фиксацию эписклеральной части протеза по экватору глазного яблока под прямыми мышцами; субтотальную витрэктомию; имплантацию интраокулярной части протеза с фиксацией чипа с электродами в макулярной зоне при помощи ретинального «гвоздя»; герметизацию раны склеры и конъюнктивы.

Случай № 2

Пациентка З., 56 лет. Поступила в клинику с диагнозом «OU — пигментный ретинит, терминальная стадия». Острота зрения на оба глаза — $(1/\infty)$ pr. l. incertae. При проведении ОКТ сетчатки пациентка была способна периодически фиксировать правым глазом. В связи с этим, действуя согласно рекомендациям компании-производителя, для оперативного вмешательства был выбран левый глаз.

Результаты обследования перед операцией OS: острота зрения — $(1/\infty)$ pr. l. incertae, внутриглазное давление — 17 мм рт. ст. По данным биомикроскопии: передняя поверхность глаза без особенностей, в центральных отделах хрусталика наблюдали начальные помутнения. Глазное дно: ДЗН — бледный, восковидный, границы четкие; сосуды резко сужены; макула сохранена с периферийным кольцом депигментации, макулярный рефлекс отсутствовал; периваскулярное скопление пигмента в виде «костных телец» в середине периферии вместе с атрофией сетчатки (рис. 2А). По данным ОКТ, проведенной с помощью «Spectralis OCT» в режимах Cross Line, была выявлена атрофия сетчатки, особенно выраженная в наружных слоях. Результаты электрофизиологического исследования: ПЭЧ — 500 мкА, а электрическая лабильность — 75 Гц.

Хирургическую операцию проводили согласно протоколу, описанному выше. Время операции составило 4 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оба пациента прошли три курса реабилитации, включающих формирование навыков использования устройства внутри помещения и на открытом пространстве. Зрительные функции оценивали с помощью трех объективных тестов, проводимых в затемненной комнате с использованием программного обеспечения и сенсорного экрана (рис. 3), разработанных компанией-производителем: 1) в ходе теста «решетчатая острота зрения» на экране перед пациентом появляются черно-белые линии разной толщины в разных направлениях, и пациент должен правильно указать направление линий; 2) в ходе теста

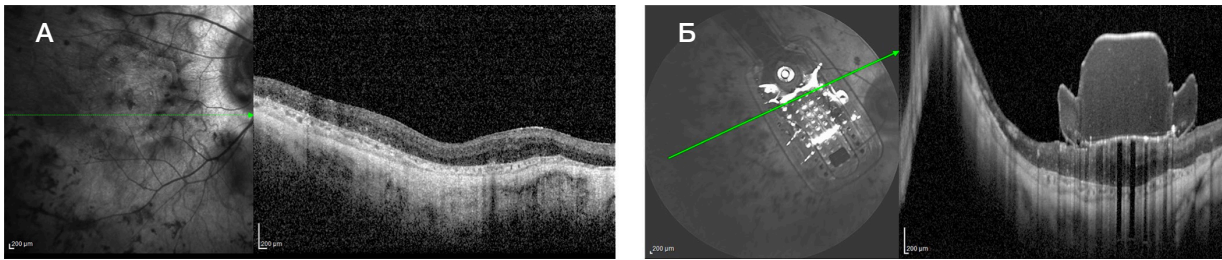


Рис. 1. ОКТ-скан правого глаза пациента У. до (А) и после (Б) имплантации Argus II демонстрирует правильное расположение и плотное прилегание имплантата на сетчатке

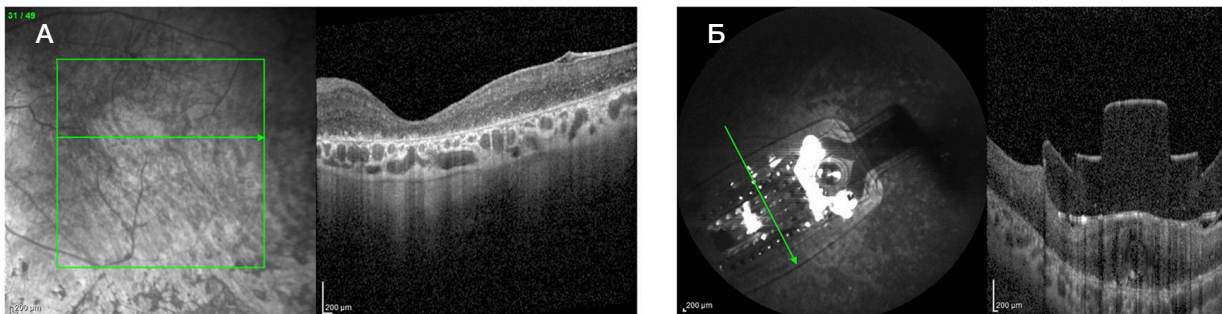


Рис. 2. ОКТ-скан левого глаза пациентки З. до (А) и после (Б) имплантации Argus II демонстрирует правильное расположение и плотное прилегание имплантата на сетчатке

«направление движения» на черном экране передвигается белая линия разной толщины в разных направлениях, и пациент должен правильно распознать направление движения линий; 3) в ходе теста «локализация квадрата» в разных частях черного экрана появляются квадраты белого цвета разного размера, и пациенту необходимо пальцем правильно указать расположение квадрата на сенсорном экране.

В случае № 1 хирургическая операция, ранний и поздний послеоперационные периоды прошли без осложнений, консервативная терапия соответствовала рекомендациям компании-производителя. Через две недели после операции наблюдали заживление раны первичным натяжением; отделяемое и признаки воспаления отсутствовали; эписклеральная часть протеза была фиксирована, сохраняла заданное положение; подвижность глазного яблока была в полном объеме; склеральная и конъюнктивальные раны герметичны, внутриглазное давление, измеренное тонометром Icare® PRO (iCare PRO; Финляндия), составляло 17–18 мм рт. ст.; роговица прозрачная; влага передней камеры прозрачная, камера глубокая; интраокулярная линза центрирована, в правильном положении; массив с электродами был фиксирован, плотно прилежал к сетчатке на всем протяжении (рис. 1Б).

Первое включение системы состоялось планово через 2 недели после хирургического вмешательства. В ходе диагностического подключения было выявлено, что все 60 электродов имеют проводимость. По данным ОКТ, наблюдали плотное прилегание электродного массива к сетчатке на всем протяжении. Для каждого из 60 электродов определили значения электрического сопротивления. На основании показаний приборов и обратной связи с пациентом были определены пороги стимуляции, вызывающие зрительные восприятия. Значения порогов стимуляции электродов находились в допустимом диапазоне, что позволило использовать все 60 электродов для получения зрительного восприятия (рис. 4А).

При активации системы пациент отмечал появление зрительного восприятия в виде вспышек света (фосфенов) различных форм и цветов. В рамках реабилитации пациент прошел первую сессию обучения пользованию системой через месяц после операции. В ходе первой сессии проходило обучение базовым принципам использования эпиретинальной протезной системы Argus II. Через два месяца, во время второй сессии внимание было сконцентрировано на приобретении пациентом навыков ориентирования внутри помещения; после этого обучения пациент был способен определять локализацию высококонтрастных мелких предметов, контуры больших предметов, силуэты людей и другие (рис. 5А). На шестом месяце после оперативного вмешательства пациент прошел третий курс реабилитации. По результатам компьютерных тестов, сохранялась положительная динамика зрительных функций. Пациент стал способен ориентироваться и самостоятельно передвигаться не только в помещении, но и на открытой местности. При прохождении компьютерных тестов для оценки зрительных функций пациент показал лучшие результаты с использованием системы Argus II, чем без нее (рис. 6).

В случае № 2 хирургическая операция, ранний и поздний послеоперационные периоды прошли без осложнений, консервативная терапия соответствовала рекомендациям компании-производителя. Через две недели после

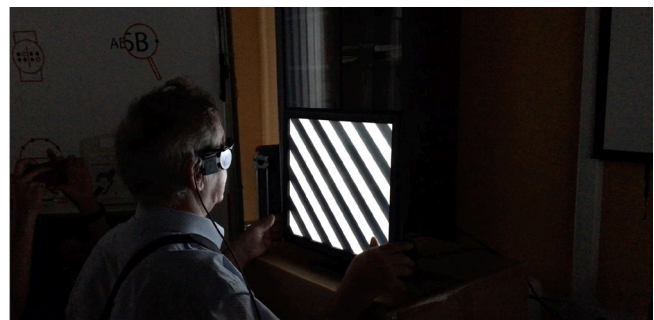


Рис. 3. Пациент У. во время прохождения теста «решетчатая острота зрения»

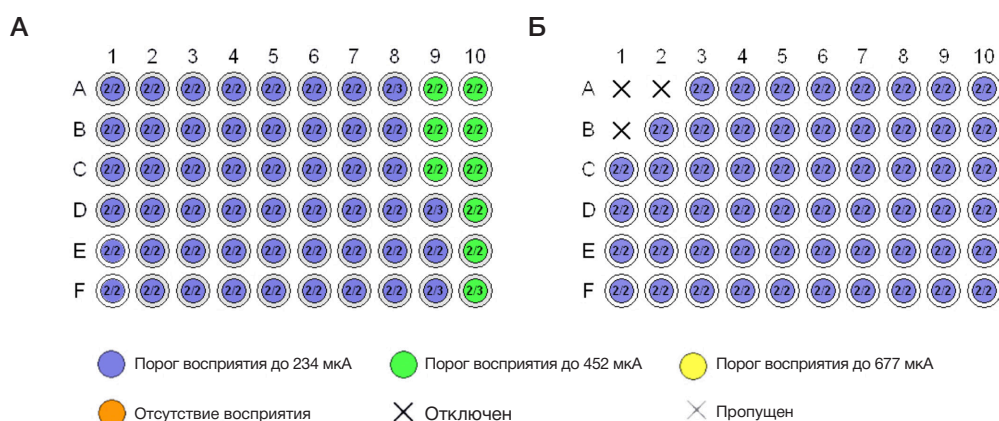


Рис. 4. Карты стимуляции имплантатов, демонстрирующие пороги восприятия для каждого из 60 электродов имплантата пациента У. (А) и пациентки З. (Б)



Рис. 5. Пациент У. смог самостоятельно определить, что перед ним зеркало, и распознать свое отражение в нем (А). Пациентка З. на первом сеансе подключения системы после операции смогла точно посчитать количество людей, стоящих перед ней (Б)

операции наблюдали заживление раны первичным натяжением, отделяемое и признаки воспаления отсутствовали; эписклеральная часть протеза оставалась фиксированной, сохраняла заданное положение; подвижность глазного яблока была в полном объеме; склеральная и конъюнктивальные раны герметичны, внутриглазное давление, измеренное тонометром Icare® PRO (iCare; Финляндия), составляло 16–17 мм рт. ст.; роговица — прозрачная; влага передней камеры — прозрачная, камера — глубокая; интраокулярная линза центрирована и находилась в правильном положении; массив с электродами был фиксирован, плотно прилегал к сетчатке на всем протяжении (рис. 2Б).

Первое включение системы провели планово через 2 недели после хирургического вмешательства. В ходе диагностического подключения было выявлено, что все 60 электродов имеют проводимость. По данным ОКТ, электродный массив плотно прилегал к сетчатке на всем протяжении. Для каждого из 60 электродов были определены значения электрического сопротивления. На основании показаний приборов и обратной связи с пациентом были установлены пороги стимуляции, вызывающие зрительные восприятия. Показания трех электродов находились за пределами допустимых значений, что позволило стимулировать 57 электродов (рис. 4Б). При активации системы пациентка отмечала появление зрительного восприятия в виде вспышек различных цветов, сразу после подключения она могла различать силуэты людей (рис. 5Б).

В рамках реабилитации в ходе первой сессии пациентка прошла обучение базовым принципам использования эпиретинальной протезной системы Argus II. Второй курс реабилитации проводили на шестом месяце после операции, в рамках которого у пациентки формировали навык ориентирования внутри помещения,

обучали определять локализацию высококонтрастных мелких предметов, контуры больших предметов, силуэты людей и др. При прохождении компьютерных тестов для оценки зрительных функций пациентка показала лучшие результаты с использованием системы Argus II, чем без нее (рис. 7).

После прохождения основных курсов реабилитации оба пациента в домашних условиях ведут полностью самостоятельный образ жизни: определяют местоположение столовых приборов, бытовой техники, свободно перемещаются из комнаты в комнату и т. д. С использованием системы Argus II пациенты самостоятельно передвигаются на общественном транспорте, совершают пешие прогулки, осуществляют походы в магазин. Для обеспечения безопасности пациентов на новых или дальних маршрутах их всегда сопровождают. Что касается социального аспекта жизни, то пациент У. выступает с собственной шоу-программой фокусов в городах России (рис. 8А), пациентка З. участвовала на неделе моды в г. Москва (рис. 8Б); оба пациента периодически участвуют на конференциях, посвященных решению проблем реабилитации слепых пациентов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По литературным данным, при анализе результатов пятилетнего мультицентрового исследования пациентов с пигментным ретинитом после хирургической имплантации Argus II были получены следующие результаты: 100% пациентов, которым была проведена имплантация эпиретинального протеза Argus II, при активации системы имели зрительное восприятие; 96% пациентов проходили тест на определение положения высококонтрастной цели на экране компьютера (тест «локализация квадрата») лучше с включенной системой, чем без нее; 57%

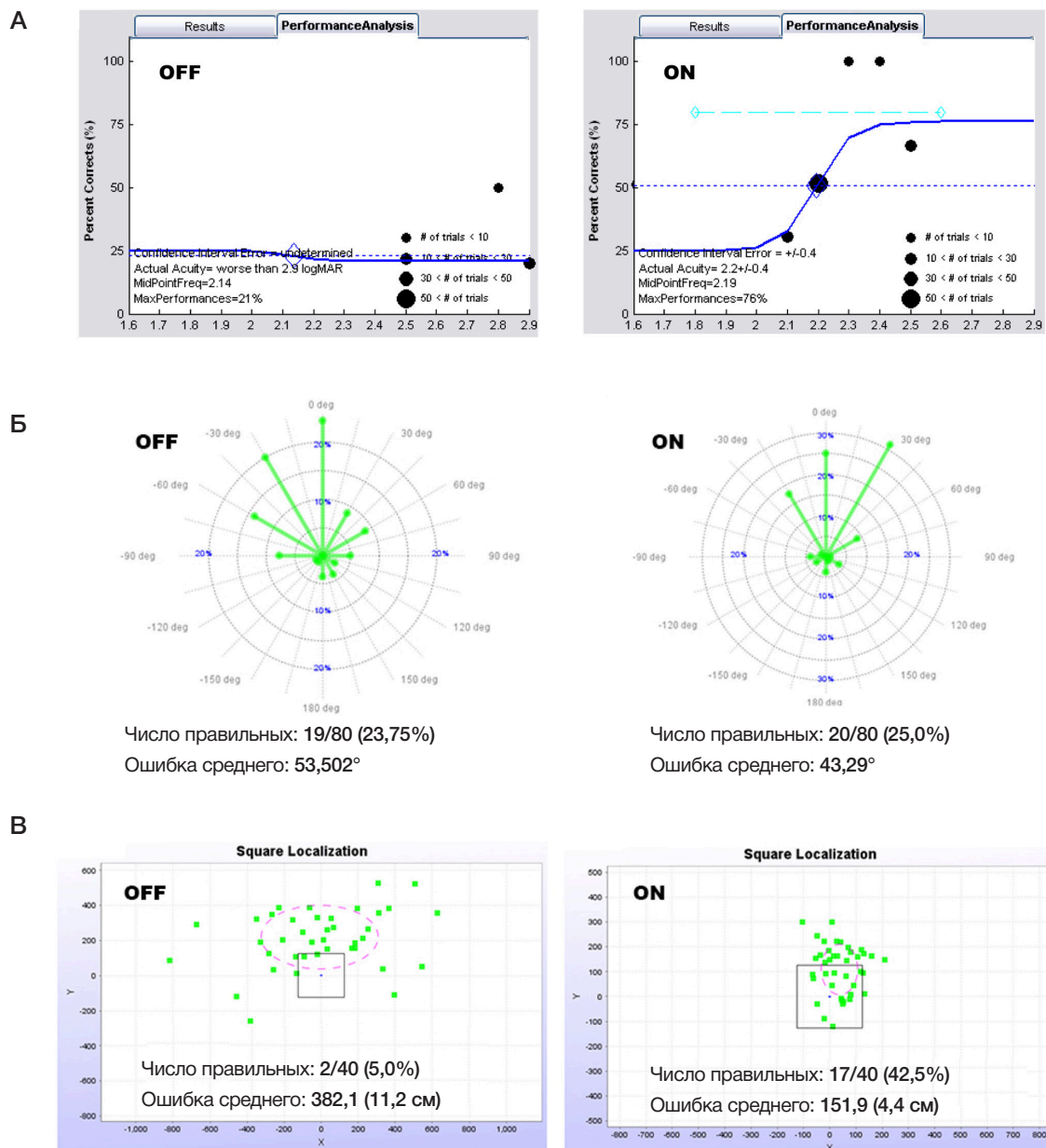


Рис. 6. Результаты объективных компьютерных тестов для оценки зрительных функций пациента У. без использования (OFF) и с использованием (ON) эпиретинальной протезной системы Argus II: тест «решетчатая острота зрения» (А); тест «направление движения» (Б); тест «локализация квадрата» (В)

пациентов проходили тест на определение направления движения высококонтрастной линии лучше с системой, чем без нее; 23% пациентов получали измеримую решетчатую остроту зрения с системой, в то время как без системы ее не имели; среднестатистическое количество работоспособных электродов после проведения операции соответствовало 43 [10, 11]. Оба наших пациента в каждом из трех тестов показали результаты с использованием системы Argus II выше, чем без нее, входя, таким образом, в группу пациентов с наилучшими результатами. Стоит также отметить отсутствие у наших пациентов каких-либо осложнений в ходе операции и в послеоперационном периоде, сохранность всех 60 проводящих путей эпиретинального протеза после хирургической имплантации, наличие зрительного восприятия при активации всех 60 электродов первого пациента и 57 из 60 электродов второй пациентки (три электрода были отключены в связи с тем, что не вызывали зрительного восприятия при допустимых значениях электрической

стимуляции). Кроме того, если учесть, что только 23% пациентов имели измеримую решетчатую остроту зрения больше, чем 2,9 LogMAR ($Vis = 0,001$), а решетчатая острота зрения пациента У. составляла 2,2 LogMAR ($Vis = 0,006$) (рис. 6А), мы достигли одного из самых высоких результатов среди всех пациентов после хирургической имплантации системы Argus II [8, 12].

Значительные изменения в социальной жизни пациентов, на наш взгляд, обусловлены огромным желанием со стороны пациентов снова «видеть», что вылилось в ежедневную многочасовую работу с системой Argus II. Повышение публичности пациентов во многом обеспечено большим вниманием к уникальной технологии, которая позволила видеть по-новому слепым пациентам.

Выводы

Использование эпиретинальной протезной системы Argus II эффективно способствовало социальной и зрительной

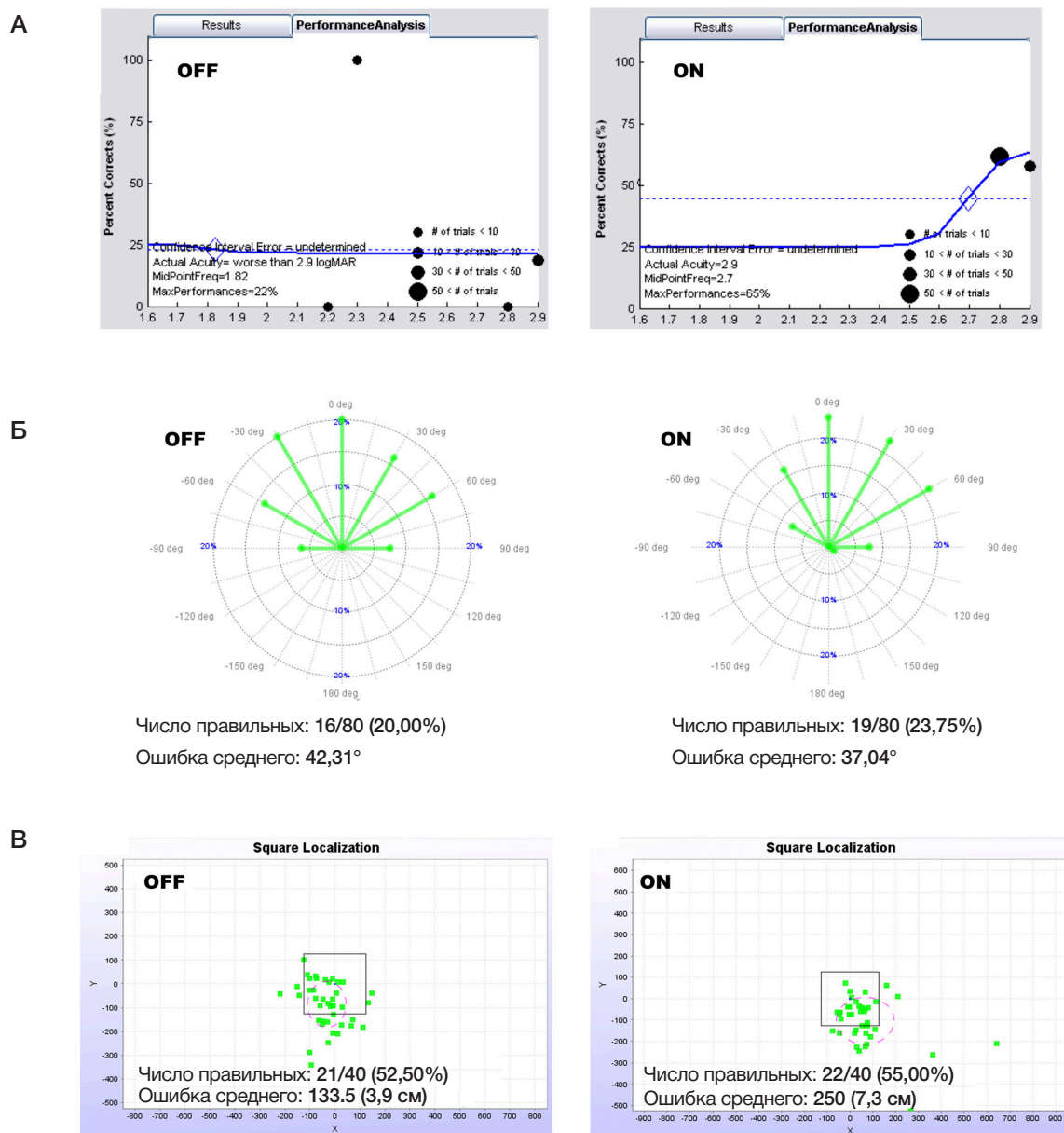


Рис. 7. Результаты объективных компьютерных тестов пациентки З. для оценки зрительных функций без использования (OFF) и с использованием (ON) эпиретинальной протезной системы Argus II: тест «решетчатая острота зрения» (А); тест «направление движения» (Б); тест «локализация квадрата» (В)



Рис. 8. Пациент Y. на сцене во время выступления с собственной программой фокусов (А) в г. Челябинск; пациентка З. на московской неделе моды (Б)

реабилитации слепых пациентов с терминальной стадией пигментного ретинита. Оба пациента с помощью эпиретинальной протезной системы Argus II приобрели способность ориентироваться внутри помещения и на открытом пространстве, довольны полученным

результатом, отмечают значительное повышение уровня самостоятельности, а вследствие этого и качества жизни. Успешное применение эпиретинальной протезной системы Argus II в зрительной реабилитации слепых пациентов с пигментным ретинитом демонстрирует: 1) возможность

взаимодействия интерфейса эпиретинальный протез — сетчатка с последующей передачей искусственной зрительной информации в корковый анализатор зрения головного мозга; 2) возможность восприятия корой головного мозга этой информации в качестве зрительной информации в ответ на электрическую стимуляцию

нейронов сетчатки электродами эпиретинального протеза; 3) возможность использования пациентами с терминальной стадией пигментного ретинита полученной зрительной информации для повышения самостоятельности и социальной адаптации, приводящие к улучшению качества жизни.

Литература

1. Grüsser O-J, Hagner M. On the history of deformation phosphores and the idea of internal light generated in the eye for the purpose of vision. History of Ophthalmology book series. ACOI. 1990; (3): 57–85.
2. Loewenstein JI, Montezuma SR, Rizzo JF. Outer retinal degeneration: an electronic retinal prosthesis as a treatment strategy. Arch Ophthalmol. 2004; 122 (4): 587–96.
3. Brelen ME, Duret F, Gerard B, Delbeke J, Veraart C. Creating a meaningful visual perception in blind volunteers by optic nerve stimulation. J Neural Eng. 2005; (2): 22–8.
4. Ghodasra DH, Chen A, Arevalo JF, et al. Worldwide Argus II implantation: recommendations to optimize patient outcomes. BMC Ophthalmol. 2016; 16 (1): 52.
5. Humayun MS, de Juan E, Jr, Dagnelie G, Greenberg RJ, Propst RH, Phillips DH. Visual perception elicited by electrical stimulation of retina in blind humans. Arch Ophthalmol. 1996; 114 (1): 40–6.
6. Mills JO, Jalil A, Stanga PE. Electronic retinal implants and artificial vision: journey and present. Eye (Lond). 2017 Oct; 31 (10): 1383–98.
7. Yue L, Weiland JD, Roska B, Humayun MS. Retinal stimulation strategies to restore vision: Fundamentals and systems. Prog Retin Eye Res. 2016 Jul; 53: 21–47.
8. da Cruz L, Dorn JD, Humayun MS, Dagnelie G, Handa J, Barale P-O, et al. Five-Year Safety and Performance Results from the Argus II Retinal Prosthesis System Clinical Trial. Ophthalmology. 2016 Oct; 123 (10): 2248–54.
9. Chader GJ, Weiland J, Humayun MS. Artificial vision: needs, functioning, and testing of a retinal electronic prosthesis. Prog Brain Res. 2009; (175): 317–32.
10. Tran BK, Wolfensberger TJ. Retina-Implant Interaction after 16 Months Follow-up in a Patient with an Argus II Prosthesis. Klin Monbl Augenheilkd. 2017 Apr; 234 (4): 538–40.
11. de Balthasar C, Patel S, Roy A, et al. Factors affecting perceptual thresholds in epiretinal prostheses. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49 (6): 2303–14.
12. Besch D, Sachs H, Szurman P, et al. Extraocular surgery for implantation of an active subretinal visual prosthesis with external connections: feasibility and outcome in seven patients. Br J Ophthalmol. 2008; (92): 1361–8.

References

1. Grüsser O-J, Hagner M. On the history of deformation phosphores and the idea of internal light generated in the eye for the purpose of vision. History of Ophthalmology book series. ACOI. 1990; (3): 57–85.
2. Loewenstein JI, Montezuma SR, Rizzo JF. Outer retinal degeneration: an electronic retinal prosthesis as a treatment strategy. Arch Ophthalmol. 2004; 122 (4): 587–96.
3. Brelen ME, Duret F, Gerard B, Delbeke J, Veraart C. Creating a meaningful visual perception in blind volunteers by optic nerve stimulation. J Neural Eng. 2005; (2): 22–8.
4. Ghodasra DH, Chen A, Arevalo JF, et al. Worldwide Argus II implantation: recommendations to optimize patient outcomes. BMC Ophthalmol. 2016; 16 (1): 52.
5. Humayun MS, de Juan E, Jr, Dagnelie G, Greenberg RJ, Propst RH, Phillips DH. Visual perception elicited by electrical stimulation of retina in blind humans. Arch Ophthalmol. 1996; 114 (1): 40–6.
6. Mills JO, Jalil A, Stanga PE. Electronic retinal implants and artificial vision: journey and present. Eye (Lond). 2017 Oct; 31 (10): 1383–98.
7. Yue L, Weiland JD, Roska B, Humayun MS. Retinal stimulation strategies to restore vision: Fundamentals and systems. Prog Retin Eye Res. 2016 Jul; 53: 21–47.
8. da Cruz L, Dorn JD, Humayun MS, Dagnelie G, Handa J, Barale P-O, et al. Five-Year Safety and Performance Results from the Argus II Retinal Prosthesis System Clinical Trial. Ophthalmology. 2016 Oct; 123 (10): 2248–54.
9. Chader GJ, Weiland J, Humayun MS. Artificial vision: needs, functioning, and testing of a retinal electronic prosthesis. Prog Brain Res. 2009; (175): 317–32.
10. Tran BK, Wolfensberger TJ. Retina-Implant Interaction after 16 Months Follow-up in a Patient with an Argus II Prosthesis. Klin Monbl Augenheilkd. 2017 Apr; 234 (4): 538–40.
11. de Balthasar C, Patel S, Roy A, et al. Factors affecting perceptual thresholds in epiretinal prostheses. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49 (6): 2303–14.
12. Besch D, Sachs H, Szurman P, et al. Extraocular surgery for implantation of an active subretinal visual prosthesis with external connections: feasibility and outcome in seven patients. Br J Ophthalmol. 2008; (92): 1361–8.