

Влияние нейрохирургического вмешательства и общей анестезии севофлураном в сочетании с фентанилом на содержание биомаркеров воспаления, церебрального повреждения и нуклеиновых кислот в ликворе пациентов с внутричерепными менингиомами: пилотное исследование

© К.А. КОНДРАТОВ¹, А.В. ФЕДОРОВ¹, Д.А. РАСПУТИНА¹, Т.А. КРУПКО¹, Р.В. РУТКОВСКИЙ¹, Н.В. ДРЯГИНА², А.А. ПЕТРОВ¹, Д.А. ГУЛЯЕВ^{1,2}, А.А. КОСТАРЕВА¹, И.А. САВВИНА^{1,2}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, 197341, Санкт-Петербург, Россия

²«Российский нейрохирургический институт им. А.Л. Поленова» — филиал ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова» Минздрава России, 191014, Санкт-Петербург, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель исследования — оценить нейроповреждение и нейровоспаление, а также диагностический потенциал циркулирующих в ликворе нуклеиновых кислот у пациентов с внутричерепными менингиомами в процессе нейрохирургического вмешательства, выполняемого в условиях общей анестезии севофлураном в сочетании с фентанилом.

Материал и методы. В исследование включены 7 пациентов с внутричерепными менингиомами. Пациентов оперировали в условиях общей анестезии севофлураном в сочетании с фентанилом. Образцы ликвора собирали интраоперационно в трех временных точках: точка 1 — через 30 мин после вводного наркоза до хирургического разреза; точка 2 — после вскрытия твердой мозговой оболочки до начала удаления опухоли; точка 3 — после удаления опухоли и ушивания раны. Уровни белковых маркеров определяли иммуноферментным методом. Анализ уровней нуклеиновых кислот проводили с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Концентрация белка S100B, а также цитокинов — интерлейкина IL-10 и фактора некроза опухоли альфа (TNF- α) не менялась в ходе операции. На этапе удаления опухоли наблюдалось повышение уровней провоспалительных цитокинов IL-6 (в 3,8 раза; $p=0,016$) и IL-8 (в 6,3 раза; $p=0,016$). В образцах ликвора определялись микроРНК-21, а также ядерная и митохондриальная ДНК, содержание которых не менялось в ходе операции.

Выводы. У пациентов с внутричерепными менингиомами, оперированных в условиях общей анестезии севофлураном в сочетании с фентанилом, не обнаружены биохимические маркеры, характерные для значительных повреждений глиального компонента ткани головного мозга. Вместе с тем у этих пациентов на этапе удаления менингиом происходил запуск провоспалительного ответа, выражающегося в повышении в ликворе концентрации цитокинов — интерлейкинов IL-6 и IL-8.

Ключевые слова: общая анестезия, севофлуран, нейрохирургия, внутричерепные менингиомы, ликвор, циркулирующие нуклеиновые кислоты, митохондриальная ДНК, микроРНК, белок S100B, нейровоспаление, цитокины TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10.

Информация об авторах:

Кондратов К.А. — <https://orcid.org/0000-0002-8302-1186>

Федоров А.В. — <https://orcid.org/0000-0002-7674-5258>

Распутина Д.А. — <https://orcid.org/0000-0002-3343-0002>

Крупко Т.А. — <https://orcid.org/0000-0002-6997-7886>

Рутковский Р.В. — <https://orcid.org/0000-0002-9208-3741>

Дрягина Н.В. — <https://orcid.org/0000-0001-8595-6666>

Петров А.А. — <https://orcid.org/0000-0001-5747-2816>

Гуляев Д.А. — <https://orcid.org/0000-0002-5509-5612>

Костарева А.А. — <https://orcid.org/0000-0002-9349-6257>

Саввина И.А. — <https://orcid.org/0000-0001-5655-510X>

Автор, ответственный за переписку: Саввина И.А. — e-mail: irinasavvina@mail.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Кондратов К.А., Федоров А.В., Распутина Д.А., Крупко Т.А., Рутковский Р.В., Дрягина Н.В., Петров А.А., Гуляев Д.А., Костарева А.А., Саввина И.А. Влияние нейрохирургического вмешательства и общей анестезии севофлураном в сочетании с фентанилом на содержание биомаркеров воспаления, церебрального повреждения и нуклеиновых кислот в ликворе пациентов с внутричерепными менингиомами: пилотное исследование. *Анестезиология и реаниматология*. 2019;3:71-78. <https://doi.org/10.17116/anaesthesiology201903171>

Influence of neurosurgical intervention and sevoflurane general anesthesia combined with fentanyl on the concentration of nucleic acids, biomarkers of inflammation and cerebral damage in cerebrospinal fluid of patients with intracranial meningioma: pilot study

K.A. KONDRATOV¹, A.V. FEDOROV¹, D.A. RASPUTINA¹, T.A. KRUPKO¹, R.V. RUTKOVSKIY¹, N.V. DRYAGINA², A.A. PETROV², D.A. GULYAEV^{1,2}, A.A. KOSTAREVA¹, I.A. SAVVINA^{1,2}

¹Almasov National Medical Research Centre, 197341, St. Petersburg, Russia;

²Polenov Russian Neurosurgical Institute — affiliate of Almasov National Medical Research Centre, 191014, St. Petersburg, Russia

ABSTRACT

Objective — to assess neuronal damage and inflammation, as well as diagnostic potential of nucleic acids in cerebrospinal fluid in patients with intracranial meningioma undergoing surgery under sevoflurane anesthesia combined with fentanyl.

Material and methods. There were 7 patients with intracranial meningioma. Patients were operated under sevoflurane general anesthesia combined with fentanyl. There were 3 intraoperative samples of cerebrospinal fluid: 1) 30 min after induction of anesthesia before surgical incision, 2) after opening dura mater before removal of tumor, 3) after removal of tumor and wound closure. Concentration of protein markers was determined by using of immunoenzyme assay. Real-time polymerase chain reaction was applied to analyze nucleic acid level.

Results. Concentrations of S100B protein, IL10 and TNF- α cytokines did not change throughout surgery. Removal of tumor was followed by augmentation of concentration of proinflammatory cytokines IL6 (3.8 times, $p=0.016$) and IL8 (6.3 times, $p=0.016$). Concentrations of microRNA-21, nuclear DNA and mitochondrial DNA in cerebrospinal fluid did not change throughout surgery.

Conclusion. Patients with intracranial meningioma undergoing surgery under sevoflurane general anesthesia combined with fentanyl showed no biochemical signs of substantial glial cell injury. However, removal of meningioma was associated with the development of proinflammatory response manifested by increased concentration of IL6 and IL8 in cerebrospinal fluid.

Keywords: general anesthesia, sevoflurane, neurosurgery, intracranial meningioma, cerebrospinal fluid, circulating nucleic acids, mitochondrial DNA, microRNA, S100B protein, neuroinflammation, TNF α , IL6, IL8, IL10 cytokines.

Information about the authors:

Kondratov K.A. — <https://orcid.org/0000-0002-8302-118>

Fedorov A.V. — <https://orcid.org/0000-0002-7674-5258>

Rasputina D.A. — <https://orcid.org/0000-0002-3343-0002>

Krupko T.A. — <https://orcid.org/0000-0002-6997-7886>

Rutkovskiy R.V. — <https://orcid.org/0000-0002-9208-3741>

Dryagina N.V. — <https://orcid.org/0000-0001-8595-6666>

Petrov A.A. — <https://orcid.org/0000-0001-5747-2816>

Gulyaev D.A. — <https://orcid.org/0000-0002-5509-5612>

Kostareva A.A. — <https://orcid.org/0000-0002-9349-6257>

Savvina I.A. — e-mail: irinasavvina@mail.ru

Corresponding author: Savvina I.A. — e-mail: irinasavvina@mail.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Kondratov KA, Fedorov AV, Rasputina DA, Krupko TA, Rutkovskiy RV, Dryagina NV, Petrov AA, Gulyaev DA, Kostareva AA, Savvina IA. Influence of neurosurgical intervention and sevoflurane general anesthesia combined with fentanyl on the concentration of nucleic acids, biomarkers of inflammation and cerebral damage in cerebrospinal fluid of patients with intracranial meningioma: pilot study. *Russian Journal of Anaesthesiology and Reanimatology = Anesteziologiya i Reanimatologiya*. 2019;3:71-78. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/anaesthesiology201903171>

Обширные хирургические вмешательства в условиях общей анестезии могут сопровождаться развитием асептического воспаления [1, 2]. Появление асептической системной воспалительной реакции представляется важным фактором, определяющим послеоперационный прогноз у пациентов. В частности, модуляция нейровоспаления может выступать в качестве регулятора развития послеоперационных осложнений с формированием нового, дополнительного неврологического дефицита [3, 4]. Вероятный сценарий развития воспалительной реакции может зависеть как от типа хирургического вмешательства, так и от вида анестезии [5—10]. Молекулярные механизмы действия общих анестетиков, несмотря на их широкое

клиническое применение, до сих пор остаются не до конца расшифрованными [11, 12]. Благодаря успешному применению методов молекулярной биологии сделан большой шаг вперед в понимании фармакологии внутривенных анестетиков [13]. При этом действие ингаляционных анестетиков на молекулярном и клеточном уровнях все еще недостаточно изучено.

В этой связи актуальными являются вопросы ранней диагностики развития асептического воспаления и расшифровка молекулярных механизмов его регуляции в условиях нейрохирургического вмешательства при прямом многофакторном воздействии на мозговое вещество. Прояснение этих процессов будет способствовать пониманию

возможных механизмов церебропротекции в условиях общей ингаляционной анестезии.

Про- и противовоспалительные цитокины являются общепринятыми маркерами воспалительной реакции. Маркерами повреждения ткани обычно служат белки, специфичные для оперируемого органа. Кроме этого, на самых ранних сроках после повреждения тканей клеточные нуклеиновые кислоты также могут появляться в физиологических жидкостях. Таким образом, эти биомолекулы, присутствующие в физиологических жидкостях, представляют собой дополнительный класс биомаркеров и потенциальных регуляторов патологических процессов. Тканеспецифичность экспрессии и наличие в физиологических жидкостях в стабильной форме делают разные типы микроРНК перспективными диагностическими маркерами [14]. Известно, что уровень микроРНК-21 повышается при травматическом повреждении головного мозга [15]. Циркулирующая ядерная ДНК (ядНК) и в большей степени митохондриальная ДНК (мтДНК) могут выступать в качестве индукторов асептической воспалительной реакции [16, 17]. В частности, известна роль циркулирующей в ликворе мтДНК в активации каскада иммунного ответа при оптикомиелите (болезни Девика) [18].

До настоящего времени неизвестны точные механизмы активации системного воспалительного ответа у пациентов нейрохирургического профиля. Не до конца ясна роль хирургической травмы мозга и действия различных общих анестетиков в процессе активации системного воспаления. В литературе отсутствуют данные о динамике изменения уровней циркулирующих ДНК, микроРНК, а также белковых маркеров повреждения нейроглии и воспалительного ответа в ликворе в ходе нейрохирургической операции у больных с внутричерепными менингиомами в условиях общей анестезии севофлураном.

Цель исследования — оценить нейрповреждение и нейровоспаление, а также диагностический потенциал циркулирующих в ликворе нуклеиновых кислот у пациентов с внутричерепными менингиомами в процессе нейрохирургического вмешательства, выполняемого в условиях общей анестезии севофлураном в сочетании с фентанилом.

Материал и методы

Характеристика пациентов

В проспективное пилотное обсервационное одноцентровое исследование включены 7 пациентов (2 мужчины и 5 женщин) в возрасте от 42 до 65 лет с внутричерепными менингиомами, оперированные одной нейрохирургической бригадой в период с июня по ноябрь 2017 г. на базе нейрохирургического отделения №5 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России. Критериями включения в исследование были следующие признаки: 1) наличие внутричерепной менингиомы с гистологическим подтверждением на постоянных препаратах; 2) возраст пациентов от 40 до 65 лет; 3) наличие информированного согласия. Критерии исключения: 1) пациенты, страдающие аутоиммунными, нейродегенеративными заболеваниями, злокачественными новообразованиями; 2) беременные. Общая характеристика пациентов представлена в **таблице**.

Всех пациентов, при наличии в истории болезни заключения нейрохирургического диагностического комплекса, перед операцией осматривал анестезиолог. Больные с внутричерепной гипертензией в исследуемую группу

не входили. Все пациенты оперированы в плановом порядке. Риск анестезии и операции определен как для пациентов с III степенью тяжести состояния по классификации ASA. Хронические заболевания, имевшиеся у некоторых включенных в исследование пациентов, были вне обострения по клиническим и лабораторным данным, представленным в истории болезни. Оперативное вмешательство проводилось на 2—4-е сутки от даты госпитализации. Ни у одного пациента не было послеоперационных осложнений.

Анестезия

Премедикация включала бензодиазепиновый анксиолитик фенорелаксан 1,0 мл внутримышечно вечером накануне операции и утром в день операции. При поступлении в операционную гемодинамический мониторинг включал неинвазивное измерение артериального давления (АД) (систолическое, диастолическое, среднее), частоты сердечных сокращений (ЧСС), уровня насыщения крови кислородом (SpO₂) с использованием модульного монитора пациента («Philips» — IntelliVue) MX 800, «Royal Philips», Нидерланды), а также проводили мониторинг периферической температуры и нейромышечной проводимости (ТОФ). После установки периферической венозной линии и инфузии 0,9% раствора натрия хлорида в периферическую вену начинали индукцию анестезии севофлураном через маску наркозно-дыхательного аппарата MAQUET FLOW-i (MAQUET, Германия) 8,0 об% до достижения 1 минимальной альвеолярной концентрации (МАК). По достижении 1 МАК внутривенно болюсно вводили фентанил 5,0 мкг на 1 кг массы тела, во всех случаях без использования миорелаксантов при показателях ТОФ «0» выполняли интубацию трахеи без технических трудностей оротрахеальной методикой. Поддержание анестезии осуществлялось методом низкочастотной ингаляционной анестезии севофлураном 3,6—4,2 об% (1 МАК) в сочетании с микроструйным введением фентанила 2,5—4,0 мкг на 1 кг массы тела в 1 ч. Миорелаксанты не использовались. Анестезиологическая бригада была одна и та же во всех описываемых наблюдениях.

Забор ликвора

Забор ликвора осуществлялся на следующих этапах:

- 1) точка 1 (т1) — люмбальный ликвор через 30 мин после вводного наркоза до хирургического разреза;
- 2) точка 2 (т2) — цистернальный ликвор после вскрытия твердой мозговой оболочки (ТМО) на этапе доступа до начала удаления опухоли (примерно через 40 мин после точки 1);
- 3) точка 3 (т3) — люмбальный ликвор после удаления опухоли и ушивания раны (примерно через 90 мин после точки 2).

После укладки пациента в соответствующее положение на операционном столе (4 больных оперировали в положении «на боку») лечащий врач-нейрохирург выполнял люмбальную пункцию в асептических условиях в типичном месте. Ни у одного пациента не было ликворного блока. Больных, которых оперировали в положении «на спине» (3 пациента), до начала операции укладывали в положение «на боку» для забора пробы ликвора. В т1 люмбальный ликвор в количестве 2,0 мл получали при истечении его каплями под контролем иглы с мандреном в пробирки с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА). Далее нейрохирург, выполнявший люмбальную пункцию, устанавливал люмбальный дренажный катетер через просвет иглы для получения пробы ликвора в т3. После окончания операции и забо-

Характеристика обследованных пациентов Characteristics of patients

Диагноз	Пол	Возраст, годы	Степень радикальности удаления опухоли	Вид общей анестезии	Длительность операции, мин	Результат гистологического исследования	Сопутствующая патология	Лекарственные препараты, принимаемые пациентом
Менингиома крыльев клиновидной кости справа	Ж	48	Simpson IV	Севофлуран + фентанил	120	Менингиома Grade I	ОНМК, ГБ II, хронический холецистит	Индапамид, энап, амлодипин
Парасагитальная менингиома ВСС	Ж	42	Simpson II	Севофлуран + фентанил	210	Менингиома Grade I	Нет	Финлепсин
Менингиома ПЧЯ	Ж	54	Simpson II	Севофлуран + фентанил	180	Менингиома (WHO Grade I)	Нет	Нет
Птериональная менингиома слепа	Ж	59	Simpson I	Севофлуран + фентанил	155	Менингиома Grade I	Миома матки, хронический гастрит	Липримар
Менингиома крыльев клиновидной кости	Ж	65	Simpson III	Севофлуран + фентанил	210	Менинготелиоматозная менингиома WHO Grade I	ДУЗ, ГБ II, ЯБДПК	Лозап
Параселлярная менингиома	М	44	Simpson II	Севофлуран + фентанил	210	Менингиома Grade I	Хронический гастрит	Нет
Менингиома площадки клиновидной кости, буторка и диафрагмы турецкого седла	М	45	Simpson II	Севофлуран + фентанил	130	Менинготелиоматозная менингиома Grade I	Нет	Нет

Примечание. ВСС — верхний сагитальный синус; ПЧЯ — передняя черепная ямка; ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, ГБ II — гипертоническая болезнь II стадии, ДУЗ — диффузно-узловой зуб, ЯБДПК — язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки.

ра ликвора в т3 дренажный катетер удалялся в операционной. В т2 собирали центральный цистернальный ликвор, который оператор нейрохирург получал из визуализированных ликворных цистерн в количестве 0,5 мл. Не позднее, чем через 30 мин после получения пробирки с образцами ликвора центрифугировали 2 раза при 1600 g в течение 10 мин. Супернатант после 2-го центрифугирования разделяли на аликвоты по 200 мкл и помещали на хранение при -80°C . Методика сбора, маркировки, аликвотирования и заморозки образцов ликвора была универсальной для всех клинических наблюдений.

Оценка концентрации белковых маркеров

Концентрацию маркера повреждения нейроглии S100B в ликворе определяли иммуноферментным методом на анализаторе планшетного типа Personal Lab («Adaltis», Италия) с помощью набора CanAg S100 EIA («Fujirebio Diagnostics», Швеция) согласно инструкции, прилагаемой производителем. Данный набор позволяет суммарно измерять 2 изоформы белка — S100A1B и S100BВ. Диапазон измеряемых концентраций составляет от 50 до 3250 нг/л. Аликвотированные пробы ликвора перед исследованием размораживали в течение ночи в холодильнике.

Концентрацию интерлейкинов IL-6, IL-8, IL-10 и фактора некроза опухоли (TNF- α) в ликворе определяли на иммунохемилюминесцентном анализаторе Immulite 1000 (DPC, США) с помощью наборов производителя («Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd», Великобритания) согласно прилагаемым инструкциям. Чувствительность метода для IL-6 и IL-8 составляет 2 пг/мл, для IL-10 — 1 пг/мл, для TNF- α — 1,7 пг/мл. Аликвотированные пробы ликвора перед исследованием размораживали при комнатной температуре.

Выделение ДНК и РНК

Перед выделением нуклеиновых кислот размороженную аликвоту ликвора центрифугировали при 3000 g 10 мин. В дальнейшей работе использовали супернатант. Общую ДНК выделяли из 80 мкл ликвора с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit («Qiagen», США), согласно рекомендациям производителя по методике, описанной ранее [19]. В буфер для выделения добавляли синтетическую ДНК (последовательность mw2060) [20] в количестве 10 нг на образец и тРНК *E. coli* в количестве 1,8 мкг на образец. ДНК снимали с колонки в 100 мкл буфера АЕ. Общую РНК выделяли из 40 мкл ликвора с помощью набора miRNeasy MiniKit («Qiagen», США) согласно рекомендациям производителя. В буфер для выделения добавляли синтетическую РНК (последовательность cel-miR-39), конечная концентрация 5 фМ на образец и тРНК *E. coli* в количестве 2,7 мкг на образец. РНК снимали с колонки в 100 мкл деионизированной воды, обработанной диэтилпиноксикарбонатом. Полученные растворы РНК и ДНК хранили при температуре -80°C .

Количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени

Анализ уровней ДНК и микроРНК проводили с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Обратную транскрипцию и амплификацию в реальном времени выполняли по описанным ранее методикам [21], используя аппараты Veriti 96-Well Thermal Cycler model 9902 («Life Technologies», США) и 7500 Real-Time PCR System («Life Technologies», США). Детекцию добавочной синтетической РНК последовательности cel-miR-39, а также зрелой микроРНК-21-5p выполняли с помощью наборов гидролизных зондов с праймерами 000200 и 000397 соответственно («Life Technologies», США) и реактива TaqMan Universal PCR Master Mix («Life Technologies», США). В реакцию обратной транскрипции объемом 5 мкл вносили 1,66 мкл раствора РНК. В реакцию амплификации объемом 20 мкл вносили 2,4 мкл продукта обратной транскрипции. Детекцию добавочной синтетической ДНК последовательности mw2060, высококопийного повтора Alu (маркер яДНК) и гена субъединицы цитохромоксидазы 3 (маркер мтДНК) выполняли с помощью праймеров mw2060_F 5'-GTGCTGACCCATCCGAG-3', mw2060_R 5'-GCTTGTCGGGTATAACT-3', Alu_F 5'-GTGGCTCACGCCTGTAATC-3', Alu_R 5'-CAGGCTGGAGTGCAGTGG-3', CO3_F5 5'-CTTCTGGCCACAGCACTTAAAC-3', CO3_R5: 5'-GCTGGTGTTAGGGTCTTTGTTTT-3' и реактива qPCRmix-HS SYBR+ROX master mix («Evrogen», Россия). Препараты ДНК разбавляли в 10 раз водным раствором тРНК *E. coli* (10 нг/мкл). В реакцию амплификации объемом 25 мкл вносили 5 мкл разбавленного раствора ДНК. Нормализацию циклов квантификации Cq проводили, как описано ранее [22]. Для этого использовали результаты амплификации добавочных синтетических последовательностей cel-miR-39 и mw2060. Относительные количества исследуемых нуклеиновых кислот определяли как $2^{(Cq_{max} - Cq)}$, где Cq — значение цикла квантификации исследуемой мишени в конкретном образце, Cq_{max} — максимальное значение цикла квантификации исследуемой мишени во всех образцах.

Статистический анализ

Статистический анализ результатов и визуализацию данных выполняли с помощью программного пакета R версии 3.4.2. Для анализа различий уровней исследуемых мишеней между группами образцов до и после хирургического вмешательства использовали непараметрический парный критерий Вилкоксона. Статистически значимым считали $p < 0,05$.

Результаты

Определение циркулирующих в ликворе белковых маркеров повреждения головного мозга и воспаления

Для оценки развития повреждения головного мозга и нейровоспалительного ответа в ходе нейрохирургического вмешательства в условиях общей ингаляционной анестезии севофлураном в ликворе определены уровни регуляторов воспалительного ответа: TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, а также маркера повреждения нейроглии S100B [23]. В образцах ликвора, полученных в ходе нейрохирургического вмешательства, не обнаружено статистически значимых изменений уровней S100B (рис. 1, а). Уровень противовоспалительного цитокина IL-10 был ниже предела обнаружения тест системы во всех, кроме одного, образцах ликвора. В т2 по сравнению с т1, т.е. на этапе действия общей ане-

стезии (но до начала хирургического приема), уровни провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8 не менялись. В т3 по сравнению с т2, т.е. на этапе хирургического вмешательства с удалением опухоли, наблюдалось повышение уровней IL-6 и IL-8 в 3,8 раза ($p=0,016$) и 6,3 раза ($p=0,016$) соответственно (см. рис. 1, б, в). Уровни провоспалительного цитокина TNF- α не менялись в ходе операции (см. рис. 1, г).

Определение циркулирующих в ликворе ДНК и микроРНК

Экспрессирующаяся в клетках мозга микроРНК-21 определялась во всех образцах ликвора как до, так и после удаления опухоли. В ходе нейрохирургического вмешательства не обнаружено статистически значимых изменений уровней микроРНК-21 ($p=0,078$) (рис. 2, а). Для повышения чувствительности обнаружения малых количеств яДНК в качестве мишени выбрана высокоповторяющаяся в геноме последовательность. Данная мишень определялась в 5 из 7 образцов ликвора до хирургического разреза и во всех образцах ликвора после удаления опухоли. МтДНК определялась во всех образцах ликвора как до, так и после удаления опухоли. В ходе нейрохирургического вмешательства не обнаружено статистически значимых изменений уровней яДНК ($p=0,297$) (см. рис. 2, б) и мтДНК ($p=0,375$) (см. рис. 2, в).

Обсуждение

В настоящей работе для количественного измерения уровней циркулирующих нуклеиновых кислот применяли метод ПЦР в реальном времени. Образцы ликвора могут содержать ингибиторы ПЦР. По этой причине перед количественным измерением нуклеиновых кислот требуется проверка наличия ингибирования и при необходимости разбавление образца (в случае высококопийной мишени) или специфичное удаление ингибитора, например, посредством обработки гепариназой [24]. В данной работе, чтобы избежать ингибирования полимераз примесями, ПЦР реакции не перегружали препаратами циркулирующей в ликворе ДНК и РНК. Отсутствие ингибирования контролировали с помощью определения добавочных последовательностей. Подобраны такие разведения выделенных из ликвора ДНК и РНК, при которых добавочные последовательности ДНК (mw2060) и РНК (cel-miR-39) определялись во всех образцах, и разница между максимальным и минимальным значениями циклов квантификации не превышала 2. Результаты амплификации добавочных последовательностей использовали для нормализации результатов амплификации эндогенных циркулирующих нуклеиновых кислот, как это описано в разделе Материал и методы.

Следует отметить, что все пациенты, включенные в данное исследование, имели доброкачественные внутримозговые немозговые опухоли — менингиомы (Grade I), матрикс которых расположен на твердой мозговой оболочке. По этой причине на этапе хирургического доступа и собственно удаления опухоли макроскопическое хирургическое повреждение головного мозга было минимальным. Поэтому сравнение данных в т2 и т1 фактически позволяет изучать эффект от действия общей анестезии севофлураном, а сравнение в т3 и т2 — эффект от нейрохирургического вмешательства на фоне общей анестезии.

Наблюдаемая в настоящей работе неизменность уровней белка S100B в ликворе свидетельствует об отсутствии значительных повреждений мозгового вещества в резуль-

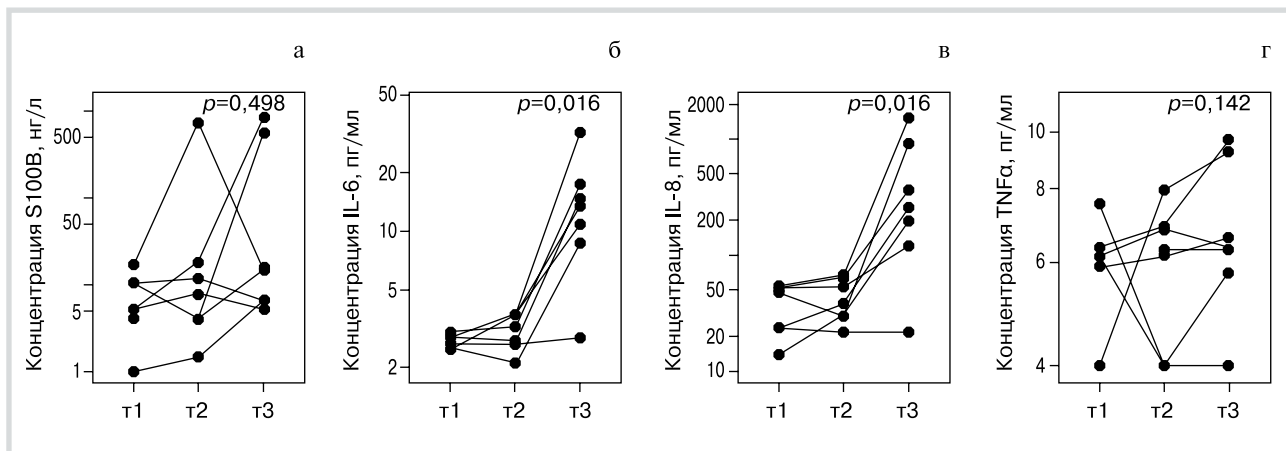


Рис. 1. Концентрация циркулирующих в ликворе белков: маркера повреждения головного мозга (S100B) (а) и регуляторов воспалительного ответа IL-6 (б), IL-8 (в), TNF-α (г).

Этапы забора образцов: t1 — люмбальный ликвор через 30 мин после вводного наркоза до хирургического разреза; t2 — цистернальный ликвор после вскрытия твердой мозговой оболочки до удаления опухоли; t3 — люмбальный ликвор после удаления опухоли и ушивания раны. t1 — точка 1; t2 — точка 2; t3 — точка 3.

Fig. 1. Concentrations of proteins circulating in cerebrospinal fluid: brain damage marker (S100B) (A) and regulators of inflammatory response IL6 (B), IL8 (C), TNF-α (D).

Stages of sampling: (t1) — lumbar cerebrospinal fluid collection 30 min after induction of anesthesia before surgical incision, (t2) — cisternal cerebrospinal fluid collection after opening dura mater before removal of tumor, (t3) — lumbar cerebrospinal fluid collection after removal of tumor and wound closure.

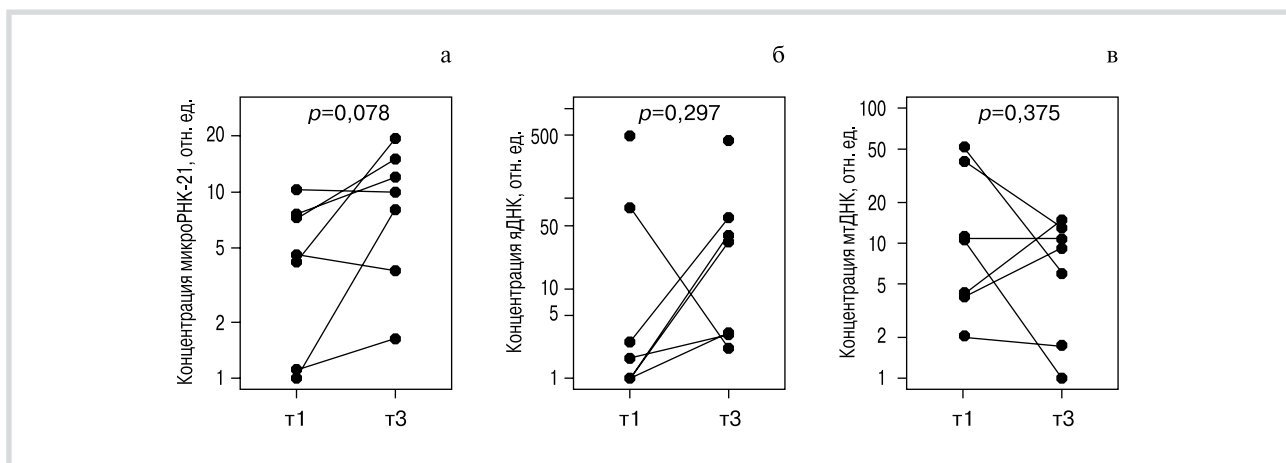


Рис. 2. Концентрация циркулирующих в ликворе нуклеиновых кислот: микроРНК-21 (а), ядерной ДНК (ядНК) (б), митохондриальной ДНК (мтДНК) (в).

Этапы забора образцов: t1 — люмбальный ликвор через 30 минут после вводного наркоза до хирургического разреза; t2 — цистернальный ликвор после вскрытия твердой мозговой оболочки до удаления опухоли; t3 — люмбальный ликвор после удаления опухоли и ушивания раны. t1 — точка 1; t2 — точка 2; t3 — точка 3.

Fig. 2. Concentrations of nucleic acids circulating in cerebrospinal fluid: microRNA-21 (A), nuclear DNA (nDNA) (B), mitochondrial DNA (mtDNA) (C).

Stages of sampling: (t1) — lumbar cerebrospinal fluid collection 30 min after induction of anesthesia before surgical incision, (t2) — cisternal cerebrospinal fluid collection after opening dura mater before removal of tumor, (t3) — lumbar cerebrospinal fluid collection after removal of tumor and wound closure.

тате совместного действия общей анестезии севофлураном и нейрохирургического вмешательства, направленного на удаление менингиом. В образцах ликвора определены яДНК и мтДНК, уровни которых не меняются в ходе операции. Одной из основных причин появления в физиологических жидкостях яДНК является ее выход из погибших клеток. При этом мтДНК может появляться во внеклеточном пространстве также и в результате секреции активи-

рованными клетками. Отсутствие значительных повреждений головного мозга может объяснять выявленную неизменность уровней яДНК и мтДНК, а также микроРНК-21.

Полученные данные о повышении уровней провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8 в ликворе указывают на то, что в ходе нейрохирургического вмешательства в условиях общей ингаляционной анестезии севофлураном в сочетании с фентанилом на этапе удаления опухоли про-

исходит запуск провоспалительного звена нейровоспалительного ответа. Поскольку при этом уровни нуклеиновых кислот в ликворе не меняются, можно сделать вывод, что при данном типе операций циркулирующие нуклеиновые кислоты не являются причиной развивающегося воспаления и не могут быть маркером такой реакции. Полученные данные дополняют результаты предыдущих исследований об индукции нейровоспалительного ответа при различных хирургических вмешательствах, включая интракраниальные при лечении назальной ликвореи [6] и при установке люмбального дренажа [25], а также в хирургии костей и суставов [5, 26, 27], аортального клапана [28], хирургии органов малого таза [29]. Описанные в настоящей работе методики могут быть использованы для изучения иммуномодулирующего действия общих анестетиков, а также для определения регуляторной и диагностической роли циркулирующих в ликворе нуклеиновых кислот при развитии воспалительных реакций в ходе различных типов нейрохирургического вмешательства.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Toft P, Tonnesen E. The systemic inflammatory response to anaesthesia and surgery. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2008;19(5-6):349-353.
- Schneemilch C, Schilling T, Bank U. Effects of general anesthesia on inflammation. *Best Practice & Research. Clinical Anaesthesiology*. 2004;18(5):493-507.
- Terrando N, Monaco C, Ma D, Foxwell BM, Feldmann M, Maze M. Tumor necrosis factor- α triggers a cytokine cascade yielding postoperative cognitive decline. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107:20518-20522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014557107>
- Umholtz M, Nader ND. Anesthetic immunomodulation of the neuroinflammation in postoperative cognitive dysfunction. *Immunological investigations*. 2017;46(8):805-815. <https://doi.org/10.1080/08820139.2017.1373898>
- Берлинский В.В., Налеев А.А., Кузнецова О.В. Особенности течения послеоперационного периода в зависимости от метода общей анестезии. *Анестезиология и реаниматология*. 2012;1:24-27. Berlinskiy VV, Naleev AA, Kuznetsova OV. Features of the postoperative period depending on the method of general anesthesia. *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 2012;1:24-27. (In Russ.).
- Балькова Е.В., Хачатурова Э.А., Селова Г.Н. Состояние центральной гемодинамики при различных видах анестезии при лапароскопических операциях по поводу рака толстой кишки у пожилых больных. *Анестезиология и реаниматология*. 2012;2:19-22. Balykova EV, Khachaturova EA, Selova GN. The state of central hemodynamics in various types of anesthesia in laparoscopic surgery for colon cancer in elderly patients. *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 2012;2:19-22. (In Russ.).
- Борисов К.Ю., Мороз В.В., Гребенчиков О.А., Плотников Е.Ю., Левиков Д.И., Черпаков Р.А., Лихванцев В.В. Влияние пропофола на анестетическое preconditionирование миокарда севофлураном в эксперименте. *Общая реаниматология*. 2013;9(4):30-35. Borisov KYu, Moroz VV, Grebenchikov OA, Plotnikov EYu, Levikov DI, Cherpakov RA, Likhvantsev VV. The influence of the anaesthetic propofol on myocardial preconditioning by sevoflurane in the experiment. *Obschaya reanimatologiya*. 2013;9(4):30-35. (In Russ.).
- Неймарк М.И., Шмелев В.В. Динамика маркеров нейронального повреждения при различных видах общей анестезии каротидной эндакротомии. *Вестник интенсивной терапии*. 2012;5:40. Neimark MI, Schmelev VV. Dynamics of neuronal injury markers in various types of General anesthesia of carotid endarterectomy. *Vestnik intensivnoy terapii*. 2012;5:40. (In Russ.).
- Саввина И.А., Костарева А.А., Федоров А.В., Рутковский Р.В., Распутина Д.А., Малхозова А.М. Роль общих анестетиков в модуляции системного воспалительного ответа в периоперационном периоде. *Трансляционная медицина*. 2017;4(5):28-37. Savvina IA, Kostareva AA, Fedorov AV, Rutkovskiy RV, Rasputina DA, Malkhovza AM. The role of general anesthetics in the modulation of systemic inflammatory response in the perioperative period. *Translyatsionnaya medicina*. 2017;4(5):28-37. (In Russ.).
- Blum F, Zuo Z. Volatile anesthetics-induced neuroinflammatory and anti-inflammatory responses. *Medical Gas Research*. 2013;3(1):16. <https://doi.org/10.1186/2045-9912-3-16>
- Mishima Y, Ushijima K. Volatile Anesthetics and Neuroprotection. In: Uchino H, Ushijima K, Ikeda Y, eds. *Neuroanesthesia and Cerebrospinal Protection*. Tokyo: Springer; 2015: 83-92.
- Inoue S, Kawaguchi M. Intravenous Anesthetics and Neuroprotection. In: Uchino H., Ushijima K., Ikeda Y, eds. *Neuroanesthesia and Cerebrospinal Protection*. Tokyo: Springer; 2015: 93-101.
- Yue ZY, Dong H, Wang YF, Liu Y, Song CY, Yang WC, Qian H, Lu SJ, Chang FF. Propofol prevents neuronal mtDNA deletion and cerebral damage due to ischemia/reperfusion injury in rats. *Brain Research*. 2015;1594:108-114. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.016>
- Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2011;80(2):193-208. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.11.004>
- Harrison EB, Hochfelder CG, Lamberty BG, Meays BM, Morse BM, Kelson ML, Fox HS, Yelamanchili SV. Traumatic brain injury increases levels of miR-21 in extracellular vesicles: implications for neuroinflammation. *FEBS Open Bio*. 2016; 6(8):835-846. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12092>
- Zhang Q, Raof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010;464:104-107. <https://doi.org/10.1038/nature08780>
- Bhagirath V.C., Dwivedi D.J., Liaw P.C. Comparison of the proinflammatory and procoagulant properties of nuclear, mitochondrial, and bacterial DNA. *Shock*. 2015;44(3):265-271. <https://doi.org/10.1097/shk.0000000000000397>
- Yamashita K, Kinoshita M, Miyamoto K, Namba A, Shimizu M, Kodata T, Sugimoto T, Mori Y, Yoshioka Y, Nakatsuji Y, Kumanogoh A, Kusunoki S, Mochizuki H, Okuno T. Cerebrospinal fluid mitochondrial DNA in neuromyelitis optica spectrum disorder. *Journal of Neuroinflammation*. 2018;15(1):125. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1162-0>
- Baysa A, Fedorov A, Kondratov K, Ruusalepp A, Minasian S, Galagudza M, Popov M, Kurapeev D, Yakovlev A, Valen G, Kostareva A, Vaage J, Stensloekken KO. Release of mitochondrial and nuclear DNA during on-pump heart surgery: kinetics and relation to extracellular vesicles. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2018. [Epub ahead of print]. <https://doi.org/10.1007/s12265-018-9848-3>

Заключение

В образцах ликвора определены ядерная и митохондриальная ДНК. Уровни ядерной и митохондриальной ДНК, а также биохимического маркера (S100B), характерного для значительных повреждений глиального компонента ткани головного мозга, не меняются в ходе нейрохирургического вмешательства по удалению менингиомы в условиях общей ингаляционной анестезии севофлураном в сочетании с фентанилом. При этом на этапе удаления менингиомы происходит запуск провоспалительного ответа в виде повышения в ликворе уровней цитокинов — интерлейкинов IL-6 и IL-8.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения РФ в рамках государственного задания (проект АААА-А18-118042390102-9).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.

20. Ellefsen S, Stenslokken KO, Sandvik GK, Kristensen TA, Nilsson GE. Improved normalization of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction data using an external RNA control. *Analytical Biochemistry*. 2008;376(1):83-93. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.01.028>
21. Кондратов К.А., Мельник О.В., Петрова Т.А., Федоров А.В., Никитина И.Л., Артемьева И.Ю., Первунина Т.М., Бабенко А.Ю., Костарева А.А., Шляхто Е.В. Уровни циркулирующей микроРНК-21-5p у детей с сахарным диабетом 1-го типа. *Артериальная гипертензия*. 2017;23(6):597-603. <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2017-23-6-597-603>
22. Федоров А.В., Минасян С.М., Костарева А.А., Галагудза М.М., Курапеев Д.И. Повышение уровня микроРНК-208a в цельной крови после ишемии-реперфузии миокарда у крыс. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2012;2:66-71. <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2017-23-6-597-603>
23. Uchino H, Chijiwa M, Ogihara Y, Elmer E. Molecular Mechanisms of Brain Ischemia and Its Protection. In: Uchino H, Ushijima K, Ikeda Y, eds. *Neuroanesthesia and Cerebrospinal Protection*. Tokyo: Springer, 2015;39-51.
24. Кондратов К, Курапеев Д, Попов М, Сидорова М, Минасян С, Галагудза М, Костарева А, Федоров А. Heparinase treatment of heparin-contaminated plasma from coronary artery bypass grafting patients enables reliable quantification of microRNAs. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2016;8:9-14. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.03.001>
25. Berger M, Ponnusamy V, Greene N, Cooter M, Nadler JW, Friedman A, McDonagh DL, Laskowitz DT, Newman MF, Shaw LM, Warner DS, Mathew JP, James ML; MAD-PIA Investigators. The effect of propofol vs. isoflurane anesthesia on postoperative changes in cerebrospinal fluid cytokine levels: results from a randomized trial. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:1528. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01528>
26. Bromander S, Anckarsater R, Kristiansson M, Blennow K, Zetterberg H, Anckarsater H, Wass CE. Changes in serum and cerebrospinal fluid cytokines in response to non-neurological surgery: an observational study. *Journal of Neuroinflammation*. 2012;9:242. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-242>
27. Hirsch J, Vacas S, Terrando N, Yuan M, Sands LP, Kramer J, Bozic K, Maze MM, Leung JM. Perioperative cerebrospinal fluid and plasma inflammatory markers after orthopedic surgery. *Journal of Neuroinflammation*. 2016;13(1):211.
28. Reinsfelt B, Westerlind A, Blennow K, Zetterberg H, Ricksten SE. Open-heart surgery increases cerebrospinal fluid levels of Alzheimer-associated amyloid beta. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 2013;57(1):82-88.
29. Pikwer A, Castegren M, Namdar S, Blennow K, Zetterberg H, Mattsson N. Effects of surgery and propofol-remifentanyl total intravenous anesthesia on cerebrospinal fluid biomarkers of inflammation, Alzheimer's disease, and neuronal injury in humans: a cohort study. *Journal of Neuroinflammation*. 2017;14(1):193. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0950-2>

Поступила 28.12.18

Received 28.12.18

Принята к печати 03.04.19

Accepted 03.04.19