

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

ОБЩЕРОССИЙСКАЯ
ОБЩЕСТВЕННАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ «НАУЧНО-
ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
СПЕЦИАЛИСТОВ
ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций.

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 63

1 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Е Ж Е М Е С Я Ч Н Ы Й Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й Ж У Р Н А Л

ЯНВАРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

ОАО «Издательство "Медицина"»
115088, Москва, Новоостроповская ул.,
д. 5, строение 14

Телефон редакции:

8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л. А. Шанкина

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел. 8-903-724-40-29

Ответственность за достоверность
информации, содержащейся в рекламных
материалах, несут рекламодатели

Художественный редактор

Е. М. Архипова

Переводчик *В. С. Нечаев*

Корректор *В. С. Смирнова*

Технический редактор *Л. В. Зюкина*

Сдано в набор 10.12.2017.

Подписано в печать 29.12.2017.

Формат 60 × 88¹/₈.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Усл. печ. л. 8,33.

Уч.-изд. л. 9,67.

Заказ 180002.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого издania не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Журнал представлен в базе данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ) и в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstracts of Microbiology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (Print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental Literature, National Library of Medicine PubMed, OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Abstracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's International Periodicals Directory.

Отпечатано в ООО "ПОЛИ ПРИНТ
СЕРВИС", 119049, г. Москва,
Калужская пл., д. 1, корп. 2

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.aks.ru,

www.pressa-ef.ru

Подписка на электронную версию:

elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клини. лаб. диагностика.
2018. № 1. 1–64.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор В. Н. ТИТОВ

А. Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В. В. ДОЛГОВ, Г. Н. ЗУБРИХИНА, А. А. ИВАНОВ, С. А. ЛУГОВСКАЯ, А. Ю. МИРОНОВ (зам. главного редактора), В. Т. МОРОЗОВА, Л. М. ПИМЕНОВА (ответственный секретарь), Л. М. СКУИНЬ, А. А. ТОТОЛЯН, И. П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.Н. АРИПОВ (*Ташкент*), Т.В. ВАВИЛОВА (*Санкт-Петербург*), I. WATSON (*Великобритания, Ливерпуль*), А.Ж. ГИЛЬМАНОВ (*Уфа*), Д.А. ГРИЩЕНКО (*Красноярск*), В.С. ГУДУМАК (*Кишинёв*), Н.Г. ДАШКОВА (*Москва*), В.А. ДЕЕВ (*Киев*), Т.И. ДОЛГИХ (*Омск*), С.А. ЕЛЬЧАНИНОВА (*Барнаул*), А.В. ИНДУТНЫЙ (*Омск*), А. KALLNER (*Швеция, Стокгольм*), А.И. КАРПИЩЕНКО (*Санкт-Петербург*), К.П. КАШКИН (*Москва*), Г.И. КОЗИНЕЦ (*Москва*), А.В. КОЗЛОВ (*Санкт-Петербург*), В.Г. КОЛБ (*Минск*), Г.В. КОРШУНОВ (*Саратов*), Г.М. КОСТИН (*Минск*), А.Г. КОЧЕТОВ (*Москва*), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (*Москва*), Г.Г. ЛУНЕВА (*Киев*), А.Р. МАВЗЮТОВ (*Уфа*), В.Н. МАЛАХОВ (*Москва*), Д.Д. МЕНЬШИКОВ (*Москва*), В.И. НИГУЛЯНУ (*Кишинёв*), Е.Н. ОВАНЕСОВ (*Москва*), Ю.В. ПЕРВУШИН (*Ставрополь*), И.В. ПИКАЛОВ (*Новосибирск*), Ю.П. РЕЗНИКОВ (*Москва*), Д.Б. САПРЫГИН (*Москва*), С.Н. СУПЛОТОВ (*Тюмень*), О.А. ТАРАСЕНКО (*Москва*), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (*Москва*), А.Б. УТЕШЕВ (*Алматы*), Л.А. ХОРОВСКАЯ (*Санкт-Петербург*), С.В. ЦВИРЕНКО (*Екатеринбург*), А.Н. ШИБАНОВ (*Москва*), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (*Санкт-Петербург*), Г.А. ЯРОВАЯ (*Москва*)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO
"MEDITSINA"

THE ALL-RUSSIAN
ORGANIZATION
"THEORETICAL AND
PRACTICAL SOCIETY
OF SPECIALISTS
OF LABORATORY
MEDICINE"

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 63
1 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

JANUARY

The Journal is founded in 1955.

**Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"**

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:
8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

ADVERTISING DEPARTMENT

Phone: 8-495-678-64-84

**The responsibility for credibility of
information contained in advertising materials
is accounted for advertisers**

Art editor *E.M. Arkhipova*

Translator *V.S. Nechaev*

Proof-reader *V.S. Smirnova*

Layout editor *L.V. Zyukina*

E-mail: oao-medsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

All rights reserved. Any part of this edition can not be entered computer memory nor be reproduced with any other mode without preliminary permission of editor in written form.

The Journal is presented in data base of the Russian index of scientific quotation (RiNZ) and in following I&R editions: Abstracts of Micology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental Literature, National Library of Medicine PubMed, OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Abstracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's International Periodicals Directory.

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief V. N. TITOV

A. B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRICHINA, A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, A.Yu. MIRONOV (assistant editor-in-chief), V.T. MOROZOVA, L.M. PIMENOVA (executive editor), L.M. SKUIN', A.A. TOTOLYAN, I.P. SHABALOVA

EDITORIAL COUNCIL:

A.N. ARIPOV (*Tashkent*), T.V. VAVILOVA (*Sankt-Peterburg*), I. WATSON (*Great Britain, Liverpool*), A.Zh. GIL'MANOV (*Ufa*), D.A. GRITCHENKO (*Krasnoyarsk*), V.S. GUDUMAK (*Kishinev*), N.G. DASHKOVA (*Moscow*), V.A. DEEV (*Kiev*), T.I. DOLGIKH (*Omsk*), S.A. ELCHANINOVA (*Barnaul*), A.V. INDUTNY (*Omsk*), V.A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*), A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN (*Moscow*), G.I. KOZINEC (*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), V.G. KOLB (*Minsk*), G.V. KORSHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), A.R. MAVZYTTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), D.D. MEN'SHIKOV (*Moscow*), V.I. NIGULYANU (*Kishinev*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOVA (*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKIY (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. KHOROVSKAYA (*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

БИОХИМИЯ

- Титов В.Н., Рожкова Т.А., Ариповский А.В., Амелюшкина В.А., Карганов М.Ю. Становление в филогенезе реакций липолиза. Пальмитиновые и олеиновые триглицериды как субстраты. Инсулин, состояние нормолипидемии и формирование гиперлипотеинемии типов IIb, IV и V 4
- Сажина Н.Н., Попов И.Н., Титов В.Н. Сравнение двух хемилюминесцентных моделей для оценки антиоксидательной активности сыворотки крови пациентов с патологией печени. 16

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Потапенко В.Г., Пervaкова М.Ю., Лапин С.В., Титов А.К., Суркова Е.А., Петрова Н.Н., Черноокая Н.Ю., Миронова О.П., Потихонова Н.А., Узденева Е.И., Афанасьев Б.В. Роль фракционного анализа ферритина в диагностике вторичного гемофагоцитарного синдрома. 21
- Карамова Л.М., Власова Н.В. Десятилетняя гемограмма работников производства фталатов. 28

ИММУНОЛОГИЯ

- Агарков Н.М., Ткаченко П.В., Замулин Д.О., Аксёнов В.В., Гонтарева И.С., Кича Д.И., Мишенян М.О. Прогнозирование развития периапикального абсцесса при хроническом периодонтите у детей по параметрам крови и клеточного иммунитета. 31
- Марданлы С.Г., Арсеньева В.А., Марданлы С.С., Ротанов С.В., Амелина Е.А. Синхронная детекция серологических маркеров основных герпесвирусных инфекций человека. 35
- Боронина Л.Г., Блинова С.М., Саматова Е.В. Серологическая диагностика токсоплазмоза у детей и беременных женщин иммунохимическим методом на тест-системах разных производителей. 41
- Гурина О.П., Степанова А.А., Деметьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Блинов Г.А. Особенности аутоиммунных реакций при болезни Крона у детей. 44

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Жукова Л.И., Ковалевская О.И., Городин В.Н., Шахвердян Ю.Г. Клинико-лабораторная характеристика первичной острой цитомегаловирусной инфекции у неиммунокомпromетированных взрослых больных. 51
- Сароянц Л.В., Арнаудова К.Ш., Абрамов Д.Д., Трофимов Д.Ю. Разработка лабораторной диагностики лепры с помощью полимеразной цепной реакции. 55
- Детушева Е.В., Скрябин Ю.П., Богун А.Г., Кисличкина А.А., Кадникова Л.А., Фурсова Н.К. Изучение закономерностей формирования устойчивости *Staphylococcus aureus* к триклозану. 60

ЮБИЛЕЙ

- Долгов Владимир Владимирович (К 70-летию со дня рождения).

BIOCHEMISTRY

- Titov V.N., Rozhkova T.A., Aripovsky A.V., Amelyushkina V.A., Karganov M.Yu. The becoming of reactions of lipolysis in phylogenesis. The palmitic and oleic triglycerides as substrates. Insulin, condition of normolipemia and formation of hyper lipoproteinemia type IIb, IV and V 4
- Sazhina N.N., Popov I.N., Titov V.N. The comparison of two chemiluminescent models for assessing anti-oxidative activity of blood serum of patients with liver pathology 16

HEMATOLOGY

- Potapenko V.G., Pervakova M.Yu., Lapin S.V., Titov A.K., Surkova E.A., Petrova N.N., Chernookaya N.Yu., Mironova O.P., Poti-khonova N.A., Uzdenova E.I., Afanasiev B.V. The role of fraction analysis of ferritin in diagnostic of secondary hemophagocyte syndrome 21
- Karamova L.M., Vlasova N.V. The decade hemogram of workers of phthalate industry 28

IMMUNOLOGY

- Agarkov N.M., Tkachenko P.V., Zamulin D.O., Aksenov V.V., Gontareva I.S., Kicha D.I., Mishenin M.O. The prognostication of development of peri-apical abscess under chronic periodontitis by blood parameters and cell immunity in children 31
- Mardanly S.G., Arsenieva V.A., Mardanly S.S., Rotanov S.V., Amelina E.A. The synchronous detection of serological markers of main herpes viral human infections 35
- Boronina L.G., Blinova S.M., Samatova E.V. The serological diagnostic of toxoplasmosis in children and pregnant women using immune chemical technique by test-systems of various manufacturers 41
- Gurina O.P., Stepanova A.A., Dementieva E.A., Blinov A.E., Varlamova O.N., Blinov G.A. The characteristics of autoimmune reactions under Crohn's disease 44

MICROBIOLOGY

- Zhukova L.I., Kovalevskaya O.I., Gorodin V.N., Shakhverdyan Yu.G. The clinical laboratory characteristic of primary acute cytomegalovirus infection in non-immuno-compromised adult patients 51
- Saroyants L.V., Arnaudova K.Sh., Abramov D.D., Trofimov D.Yu. The development of laboratory diagnostic of leprosy using polymerase chain reaction 55
- Detusheva E.V., Skryabin Yu.P., Bogun A.G., Kislichkina A.A., Kadnikova L.A., Fursova N.K. The study of patterns of development of resistance of *Staphylococcus aureus* to triclosan 60

JUBILEE

- Dolgov Vladimir Vladimirovich (on the occasion of seventieth anniversary)

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.153.915-008.61-092:612.015.3

Титов В.Н.¹, Рожкова Т.А.¹, Ариповский А.В.², Амелюшкина В.А.¹, Карганов М.Ю.³

СТАНОВЛЕНИЕ В ФИЛОГЕНЕЗЕ РЕАКЦИЙ ЛИПОЛИЗА. ПАЛЬМИТИНОВЫЕ И ОЛЕИНОВЫЕ ТРИГЛИЦЕРИДЫ КАК СУБСТРАТЫ. ИНСУЛИН, СОСТОЯНИЕ НОРМОЛИПИДЕМИИ И ФОРМИРОВАНИЕ ГИПЕРЛИПОПРОТЕИНЕМИИ ТИПОВ IIb, IV И V

¹ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ, 121552, Москва;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Госсанэпиднадзора РФ, 142279, г. Оболенск Московской области;

³ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАН, 125315, Москва

Согласно филогенетической теории общей патологии, при жизни в океане все были плотоядными (рыбоядными); перенос к клеткам жирных кислот (ЖК) в форме неполярных триглицеридов (ТГ) начался апоВ-48 хиломикроны (ХМ), продолжили липопротеины (ЛП) очень низкой и низкой плотности (ЛПОНП и ЛПНП) и закончил его апоВ-100 эндоцитоз. ЖК переносят ХМ + ЛПОНП + ЛПНП; апоВ-48 + апоВ-100 + апоЕ, ТГ гидролизует печеночная глицеролгидролаза (ГЛГ) и кофермент апоС-III; гиперлиппротеинемия (ГЛП) по классификации ВОЗ соответствует типу V. На суше у травоядных, которые ещё не синтезировали инсулин, в переносе ТГ не стало апоВ-48 и ХМ. Плотоядные в ЛПОНП и ЛПНП переносят экзогенные пальмитиновые ТГ, травоядные — тоже пальмитиновые, но синтезированные гепатоцитами из глюкозы эндогенно. У травоядных перенос пальмитиновых ТГ до синтеза инсулина формирует апоВ-100 в составе ЛПОНП и ЛПНП. Гидролиз пальмитиновых ТГ в ЛПОНП активируют печеночная ГЛГ и апоС-III; клетки поглощают ЛПНП путем апоВ-100 эндоцитоза. Содержание в плазме крови ЛП при электрофорезе ЛП соответствует ГЛП типа IIb. В первом, втором вариантах переноса ЖК в форме ТГ в ЛПОНП + ЛПНП доминирует пальмитиновая ЖК, одноимённые ТГ и пальмитиновый метаболизм *in vivo* ЖК. Инсулин иницировал третий вариант переноса уже олеиновой ЖК к инсулинзависимым клеткам только в олеиновых ЛПОНП; гидролиз олеиновых ТГ активируют поздняя в филогенезе постгепариновая ЛПЛ и кофактор апоС-II. АпоВ-100 активно связывает динамичный апоЕ, формируя апоЕ/В-100 лиганд. На поздних ступенях филогенеза инсулин сформировал перенос ЖК в форме олеиновых ТГ в одноимённых ЛПОНП без образования олеиновых ЛПНП; электрофореграмма ЛП отражает отсутствие ГЛП. В филогенезе последовательно сформировались три варианта переноса ЖК в ТГ в составе ЛП: 1) ХМ + ЛПОНП + ЛПНП, 2) ЛПОНП + ЛПНП и 3) только в ЛПОНП. Первый характерен для рыбоядных (плотоядных) при жизни в океане. Второй реализуют травоядные, когда они ещё не начали синтез инсулина и гепатоциты ещё не превращают всю эндогенную пальмитиновую ЖК в олеиновую ЖК. Инсулин иницировал: а) перенос олеиновых ТГ в ЛПОНП, не образуя олеиновых ЛПНП; б) *in vivo* высокоэффективный олеиновый метаболизм ЖК и в) становление биологической функции локомоции. Афизиологичная индукция субстратом, избыток пальмитиновой НЖК в пище иницируют негативные изменения в составе ЛП в обратном, чем в филогенезе, направлении. Когда травоядный в филогенезе *Ното сарпиенс* начинает злоупотреблять плотоядной (мясной) пищей, вместо нормолиппротеинемии в плазме крови при электрофорезе ЛП можно выявить вначале транзиторную ГЛП IV типа, далее длительную ГЛП IIb типа. Если же пациент практически переходит на плотоядное питание, формируется ГЛП V типа.

Если содержание экзогенной пальмитиновой НЖК в пище превышает физиологические возможности переноса её в олеиновых ТГ как пальмитоил-олеил-пальмитат глицерол (ПОП), начинают формироваться пальмитиновые ТГ как олеил-пальмитоил-пальмитат (ОПП) глицерол, эпигенетически образуются афизиологичные, безлигандные пальмитиновые ЛПОНП→ЛПНП. Циркуляция их в крови — причина гипертриглицеридемии, высокого уровня ХС-ЛПНП, компенсаторного увеличения апоС-III. Далее происходит индуцированное субстратом формирование ГЛП вначале IV типа, далее ГЛП IIb типа и, наконец, ГЛП V типа. Патогенез атеросклероза и атероматоза активирован, когда травоядный в филогенезе *Ното сарпиенс* начинает злоупотреблять плотоядной пищей, нарушая биологические функции трофологии, реакцию экзотрофии (внешнего питания), функцию гомеостаза, эндозкологии и функцию адаптации. Формирование пальмитинового метаболизма ЖК вместо олеинового — причина хронического *in vivo* дефицита энергии, синтеза АТФ. Инсулин активирует поглощение клетками глюкозы с целью использовать её для синтеза олеиновой ЖК. В первую очередь инсулин регулирует *in vivo* метаболизм ЖК и во вторую — метаболизм глюкозы.

Ключевые слова: инсулин; пальмитиновая, олеиновая жирные кислоты; атеросклероз; плотоядные; травоядные; триглицериды.

Для цитирования: Титов В.Н., Рожкова Т.А., Ариповский А.В., Амелюшкина В.А., Карганов М.Ю. Становление в филогенезе реакций липолиза. Пальмитиновые и олеиновые триглицериды как субстраты. Инсулин, состояние нормолипидемии и формирование гиперлиппротеинемии типа IIb, IV и V. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(1) 4-15. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-4-15>

Titov V.N.¹, Rozhkova T.A.¹, Aripovsky A.V.², Amelyushkina V.A.¹, Karganov M.Yu.³

THE BECOMING OF REACTIONS OF LIPOLYSIS IN PHYLOGENESIS. THE PALMITIC AND OLEIC TRIGLYCERIDES AS SUBSTRATES. INSULIN, CONDITION OF NORMOLIPEMIA AND FORMATION OF HYPER LIPOPROTEINEMIA TYPE IIB, IV AND V

¹The Federal state budget scientific institution "The Russian cardiologic R&D production complex" of Minzdrav of Russia, 121552 Moscow, Russia

²The Federal budget institution of science "The state research center of applied microbiology and biotechnology" of Gossanepidnadzor of Russia, 142279 Obolensk, Russia

³The Federal state budget scientific institution "The research institute of general pathology and pathophysiology" of the Russian academy of sciences, 125315 Moscow, Russia

According to phylogenetic theory of general pathology, when living in ocean all were carnivorous (piscivorous) fatty acids transferring to cells in form of non-polar triglycerides initially began apoB-48 chylomicrons, continued lipoproteins of very low and low density and finalized its apoB-100 endocytosis. The fatty acids are transferred by chylomicrons + lipoproteins of very low density + lipoproteins of low density and non-polar triglycerides are hydrolyzed by hepatic glycerolhydrogenase and co-enzyme apoC-III; according WHO classification, hyperlipoproteinemia corresponds to type V. On land, in herbivorous who are not yet synthesized insulin, apoB-48 and chylomicrons left process of non-polar triglycerides transferring. In lipoproteins of very low density and lipoproteins of low density, the carnivorous transfer exogenous palmitic non-polar triglycerides. The herbivorous also transfer palmitic non-polar triglycerides though synthesized by hepatocytes from glucose endogenically. In herbivorous, transferring of palmitic non-polar triglycerides prior to synthesis of insulin is forming apoB-100 in composition of lipoproteins of very low density and lipoproteins of low density. The hydrolysis of palmitic non-polar triglycerides in lipoproteins of very low density is activated by hepatic glycerol hydrogenase and apoC-III; cells absorb lipoproteins of low density by means of apoB-100 endocytosis. The content on lipoproteins in blood plasma under electrophoresis of lipoproteins corresponds to hepatic glycerol hydrogenase type IIB. In first and second types of fatty acids transferring in form of triglycerides to lipoproteins of very low density + lipoproteins of low density predominate palmitic fatty acid, triglycerides of the same name and palmitic metabolism of fatty acids in vivo. The insulin initiated the third type of transferring of oleic fatty acid by now to insulin-dependent cells only in oleic lipoproteins of very low density; hydrolysis of oleic triglycerides is activated by late in phylogenesis post-heparin hepatic glycerol hydrogenase and apoC-II cofactor. The dynamic apoE is actively bound by apoB-100 forming apoE/B-100 ligand. At later stages of phylogenesis insulin formed fatty acids transferring in form of oleic triglycerides in lipoproteins of very low density of the same name without forming of oleic lipoproteins of low density; the electrophoregram of lipoproteins reflects absence of hepatic glycerol hydrogenase. In phylogenesis three types of fatty acids transferring to triglycerides in composition of lipoproteins formed sequentially: 1) chylomicrons + lipoproteins of very low and density + lipoproteins of low density; 2) lipoproteins of very low density + lipoproteins of low density; 3) only in lipoproteins of very low density. The first one is specific to piscivorous (carnivorous) while living in ocean. The second one is implemented by herbivorous while they didn't begin to synthesize insulin and hepatocytes not yet transform all endogenous palmitic fatty acid into oleic fatty acid. Insulin initiated: a) transferring of oleic fatty acids to lipoproteins of very low density without forming oleic lipoproteins of low density; b) highly effective oleic metabolism of fatty acids in vivo; c) becoming of biological function of locomotion. The aphysiological induction by substrate, surplus of palmitic fatty acids in food initiate negative alterations in composition of lipoproteins in opposite direction than in case of phylogenesis. When homo sapiens, herbivorous in phylogenesis, begins to misuse carnivorous (meat) food then instead of normolipoproteinemia in blood plasma under electrophoresis of lipoproteins one can initially detect transitory hyperlipoproteinemia type IV and then prolonged hyperlipoproteinemia type IIB. If patient factually passes on to carnivorous diet then hyperlipoproteinemia type V is developing. If content of exogenous palmitic fatty acid in food surpasses physiological capacities of its transferring in oleic triglycerides as palmitoyl-oleyl-palmitate glycerol, palmitic triglycerides as oleyl-palmitoyl-palmitate glycerol begin to form and epigenetically aphysiological non-ligand palmitic lipoproteins of very low density → lipoproteins of low density are formed. Their circulation in blood is a cause of hypertriglyceridemia, higher level of cholesterol-lipoproteins of low density, compensatory increasing of apoC-III. Then occurs induced by substrate formation of hyperlipoproteinemia initially of type IV, then of type IIB and finally of type V. The pathogenesis of atherosclerosis and atheromotosis is activated when homo sapiens, herbivorous in phylogenesis, begin to misuse carnivorous food affecting biological functions of trophology, reaction of exotrophy (external nutrition), function of homeostasis, endoecology and function of adaptation. The formation of palmitic metabolism if fatty acids instead of oleic one is a cause of chronic deficiency of energy and ATP synthesis in vivo. Insulin activates absorption of glucose by cells with purpose to use it for synthesis of oleic fatty acids. In the first place, insulin regulates in vivo metabolism of fatty acids and only in second place metabolism of glucose.

Key words: insulin; palmitic fatty acid; oleic fatty acid; atherosclerosis; carnivorous; herbivorous; triglycerides

For citation: Titov V.N., Rozhkova T.A., Aripovsky A.V., Amelyushkina V.A., Karganov M.Yu. The becoming of reactions of lipolysis in phylogenesis. The palmitic and oleic triglycerides as substrates. Insulin, condition of normolipemia and formation of hyper lipoproteinemia type IIB, IV and V. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic) 2018; 63 (1): 4-15. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-4-15>*

For correspondence: Titov V.N., doctor of medical sciences, professor, the Federal state budget scientific institution "The Russian cardiologic R&D production complex" of Minzdrav of Russia, 121552 Moscow, Russia. e-mail: vn_titov@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 10.07.2017
Accepted 21.07.2017

Способов запасаения *in vivo* энергии в форме АТФ (иного макроэргического субстрата) клетки в реакциях ни физической химии, ни биохимии на ступенях филогенеза не отработали. Все животные клетки вы-

нуждены нарабатывать оптимальные количества АТФ в то время, когда это необходимо. Однако запасть субстраты для наработки энергии — насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты (НЖК, МЖК)

в форме триглицеридов (ТГ), освобождать ЖК из эфирной связи со спиртом глицерином, переносить между органеллами в цитоплазме и окислять в митохондриях с целью покрытия потребностей в энергии клетки могут с ранних ступеней филогенеза [1]. Важно, что клетки формируют депо ЖК, запасают их как субстраты для наработки энергии *ex tempore*, синтезируют АТФ *in situ*. Важно быстро освободить ЖК из ТГ, в которых клетки запасают НЖК и МЖК в цитоплазме в форме «капель» липидов. ТГ — неполярные, гидрофобные эфиры трёхатомного спирта глицерина и трёх ЖК; этерификация ЖК со спиртом глицерином происходит в позициях sn-1, sn-2 и sn-3. Освобожденные ЖК в гидрофильную межклеточную среду в форме неэтерифицированных ЖК (НЭЖК), связывание НЭЖК липидпереносящими белками определено в филогенезе рядом условий.

1. Физико-химические свойства ТГ — субстрата липолиза. Определены они особенностями первичной структуры трёх этерифицированных с глицерином ЖК с учётом числа атомов углерода в цепи ЖК, числа и расположения двойных связей (ДС) в ЖК, наличия цис- или транс изомеров ЖК, позиции (sn-) спирта глицерина, в которых этерифицированы разные ЖК, формирования позиционных изоформ ТГ [2, 3]. Зависят особенности субстрата липолиза и от пространственной (стерической) формы индивидуальных ТГ в гидрофильной цитоплазме, от упаковки ТГ в гидрофобных «каплях» ТГ и на границе гидрофобная среда капли: гидрофильная среда цитоплазмы клеток [4].

2. Функциональные особенности гидролаз (липаз) — позиционная их специфичность, каталитическая активность липаз и особенности действия кофакторов ферментов. Необходимость в коферментах при гидролизе ТГ обусловлена тем, что реакция проходит на границе раздела гидрофильной и гидрофобной фаз [5]. Происходит это при гидрофобном субстрате липолиза и гидрофильном ферменте, при неполярном субстрате и полярных продуктах реакции и при менее гидрофобных продуктах реакции, которые специфично (неспецифично) связывают липидпереносящие протеины. Для переноса НЭЖК в гидрофильной цитоплазме функционирует семейство малых липидпереносящих протеинов с мол. массой ≈ 15 кДа; в межклеточной среде перенос полярных НЭЖК *in vivo* осуществляет альбумин.

3. С ранних ступеней филогенеза в цитоплазме клеток, в межклеточной среде и в органах сформировался синтез и осуществлено действие четырех функционально разных субстратзависимых липаз — гидролаз ТГ.

Экспрессия in vivo липаз на ступенях филогенеза в переносе ЖК.

1. Внутриклеточная, гормонзависимая липаза активна ещё на аутокринном уровне в цитоплазме как не зависимых от инсулина висцеральных жировых клетках сальника (ВЖК), так и в функционально иных, инсулинзависимых подкожных адипоцитах (ИПА); гормонзависимая липаза гидролизует неполярные ТГ одновременно на 4 полярные молекулы: три НЭЖК и глицерин [6].

2. Панкреатическая липаза в просвете тонкой киш-

ки гидролизует поступившие с пищей экзогенные ТГ с образованием НЭЖК, полярных ди- и моноглицеридов; только после гидролиза продукты реакции всасывают энтероциты. Роль кофактора панкреатической липазы, формирование мицеллярных структур, которые становятся акцепторами НЭЖК и полярных липидов при действии панкреатической липазы, исполняют активные, эндогенные детергенты — конъюгированные жёлчные кислоты. Энтероциты неполярные ТГ всасывать не могут [7].

3. Более ранняя в филогенезе печёночная глицеролгидролаза (ГЛГ) и её кофактор апоС-III. Синтезируют их гепатоциты; действует липаза во внутрисосудистом пуле межклеточной среды; субстратом для фермента являются более ранние в филогенезе пальмитиновые ТГ в секретированных гепатоцитами пальмитиновых, олеиновых липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), а также в линолевых и линоленовых ТГ в физиологических липопротеинах низкой плотности (ЛПНП) [8].

4. Поздняя в филогенезе постгепариновая липопротеинлипаза (ЛПЛ) и её кофактор апоС-II. Действует фермент во внутрисосудистом пуле межклеточной среды; субстратом для липазы являются олеиновые ТГ в одноимённых ЛПОНП. Постгепариновой ЛПЛ названа потому, что липополисахарид гепарин инициирует её активность, освобождая в кровотоке из электрохимической связи с цепями гликокаликса на поверхности клеток эндотелия. Гепарин устраняет электростатическую связь ЛПЛ с гликозамингликанами в дистальном отделе артериального русла [9].

Гидролиз пальмитиновых, олеиновых, линоленовых ТГ в липопротеинах при действии липаз. В зависимости от того, какая ЖК этерифицирована в sn-2 со вторичной спиртовой группой глицерина, мы подразделяем ТГ на пальмитиновые, олеиновые, стеариновые, линолевые и линоленовые. Смысл такого деления состоит в том, что при действии панкреатической липазы в кишечнике фермент гидролизует эфирную связь ЖК только с первичными спиртовыми группами в sn-1 и sn-3, но не с вторичной спиртовой группой в sn-2 [10]. В силу этого при гидролизе экзогенных ТГ в кишечнике ЖК в форме полярных НЭЖК, которые освобождены из sn-1 и sn-3, могут взаимодействовать с ионами кальция и магния, образуя кальциевые, магниевые мыла; энтероциты ни кальциевые, ни магниевые мыла не всасывают. Полярный sn-2-моноацилглицерол панкреатическая липаза гидролизовать не может; энтероциты поглощают его целиком [11].

В материнском молоке у животных (человека) в ТГ в sn-2 всегда этерифицирована пальмитиновая НЖК; это гарантирует всасывание её энтероцитами. Гидролизованная же из sn-1 и sn-3 олеиновая МЖК в реакции с двухвалентными Mg^{2+} и Ca^{2+} нерастворимые мыла не образует и потеря их в кишечнике тоже не происходит. Материнское молоко всегда пальмитиновое; это плотоядный продукт, который в форме «конечных» липидов (не ЛП), ассоциатов пальмитиновых ТГ с лактоферрином формируют клетки эпителия молочных желез у всех травоядных. Лактоферрин — глобулярный гликопротеин с мол. массой ≈ 80 кДа;

содержат его секреты желез: молоко, слюна и слезная жидкость. Лактоферрин — активный компонент системы врожденного иммунитета; он задействован в реализации биологической функции эндоекологии, биологической реакции воспаления, в системе неспецифического гуморального иммунитета, проявляя свойства медиатора, регулируя иммунокомпетентные клетки; лактоферрин — белок острой фазы биологической реакции воспаления.

В противоположность этому в маслах растений в sn-2 всегда этерифицирована олеиновая МЖК или ненасыщенные ЖК (ННЖК); наиболее часто растительные масла — олеиновые и линолевые. В них в ТГ реально высокое содержание пальмитиновой НЖК; этерифицирована же она только в sn-1 и sn-3. При гидролизе в тонкой кишке пальмовых, позиционных форм ТГ как пальмитоил-олеил-пальмитат (ПОП) глицерол при действии панкреатической липазы и эндогенных детергентов в форме желчных кислот, освобождённые пальмитиновые НЖК из sn-1 и sn-3 в форме НЭЖК образуют кальциевые и магниевые мыла; энтероциты их не всасывают. В сопоставлении с иными олеиновыми маслами поедание с пищей пальмового масла, в котором пальмитиновой НЖК больше 50%, должно было бы увеличить содержание спирта холестерина (ХС), ХС-ЛПНП по меньшей мере в 1,5 раза. Возрастает же содержание ХС-ЛПНП при избыточном потреблении человеком пальмового масла лишь на 27%. Не зря же пальмовое масло величают «тропическим оливковым маслом» [12].

При действии гормонозависимой липазы в цитоплазме ВЖК и ИПА, при активации её, в частности адреналином, одновременно происходит активация гидролиза сразу трёх ЖК. При этом из одной неполярной, нейтральной молекулы ТГ одновременно образуются четыре отрицательно заряженные молекулы: три аниона ЖК и молекула глицерина при диссоциации одной гидроксильной группы в sn-1 или sn-3 [13]. Липолиз клетки осуществляют на поверхности малых «капель» ТГ при реализации биологической функции трофологии, биологической реакции эндотрофии; в биологических функциях гомеостаза, адаптации и биологической реакции стресса. Акцепторами полярных НЭЖК являются белки, которые связывают ЖК в цитоплазме клеток; в межклеточной среде две полярные НЭЖК специфично связывает альбумин [14].

Вероятно, можно рассчитать, какой объём занимает в клетке неполярная молекула ТГ и какой объём необходим для четырёх, отрицательно заряженных молекул ЖК и глицерина. Сколь бы активным не был гуморальный медиатор, как адреналин, параметры гидролиза ТГ определяют в первую очередь те ЖК, которые этерифицированы с глицерином. Основным физико-химическим параметром при гидролизе ТГ является температура плавления ЖК, которые этерифицированы с глицерином, да и со спиртом ХС тоже. Температура плавления в свою очередь определена числом атомов углерода в цепи ЖК, числом ДС в цепи и расположением её в ЖК.

Гидролиз позиционных форм ТГ в биологических функциях трофологии и гомеостаза. С наиболее высокой константой скорости реакции постгепариновая

ЛПЛ гидролизует позиционные формы таких олеиновых ТГ, как олеил-олеил-олеат глицерол (ООО); менее эффективно проходит липолиз таких олеиновых ТГ, как пальмитоил-олеил-олеат (ПОО), и с низкой скоростью реакции гидролизу подвержены позиционные изоформы таких пальмитиновых ТГ, как пальмитоил-пальмитоил-олеат глицерол (ППО). Такие позиционные формы ТГ, как пальмитоил-пальмитоил-пальмитат (ППП) постгепариновая ЛПЛ практически не гидролизует [15]. Чем больше *in vivo* формируются такие олеиновые ТГ, как ПОП, тем более медленно происходит липолиз ТГ в составе пальмитиновых и олеиновых ЛПОНП, тем более длительно они циркулируют в крови как пальмитиновые, малые, плотные ЛПНП. Их медленно поглощают клетки путём апоВ-100 эндоцитоза ЛПНП. Это и определяет выраженную и длительную ГЛП после приема пищи [16].

У травоядного (рыбоядного) *Homo sapiens* при соблюдении им диеты гепатоциты физиологично секретируют в кровотоки, преимущественно олеиновые ТГ в одноимённых ЛПОНП. При такой индукции субстратом возрастает активность постгепариновой ЛПЛ, содержание кофермента апоС-II. Они активно гидролизуют олеиновые ТГ в одноимённых ЛПОНП с образованием лигандных, олеиновых ЛПОНП; их быстро поглощают ИПА путём апоЕ/В-100 эндоцитоза, формируя краткую постпрандиальную ГЛП после еды; образования из олеиновых ЛПОНП олеиновых ЛПНП физиологично не происходит [1].

У травоядного (рыбоядного) человека при нарушении биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии, при неоптимально высоком содержании плотоядной (мясной) пищи с высокой концентрацией экзогенной пальмитиновой НЖК гепатоциты секретируют преимущественно пальмитиновые ЛПОНП. Соответственно индукции иным субстратом происходит увеличение в крови активности печёночной ГЛГ и её кофактора апоС-III [17]; для них пальмитиновые ТГ в одноимённых ЛПОНП — это филогенетически ранний, физиологичный субстрат. Медленный гидролиз пальмитиновых ТГ в ЛПОНП формирует безлигандные ЛПОНП; они медленно превращаются в пальмитиновые ЛПНП, формируя ГЛП. Пальмитиновые ЛПОНП→ЛПНП длительно циркулируют в крови; клетки медленно поглощают их путём апоВ-100 эндоцитоза. При этом формируется постоянная ГЛП при высоком уровне ТГ и ХС-ЛПНП. Образование пальмитиновых ЛПНП при действии печёночной ГЛГ и кофактора апоС-III в ответ на секрецию пальмитиновых ЛПОНП является физиологичным. У травоядных при физиологичной диете невысокий уровень ХС-ЛПНП формируют линолевые и линоленовые ЛПНП и это полиеновые эфиры ХС. При плотоядном питании высокий уровень ХС-ЛПНП формируют пальмитиновые, безлигандные ЛПОНП→ЛПНП и это незэтерифицированный, полярный спирт ХС.

Пальмитиновые и олеиновые ЛПОНП, которые содержат много пальмитиновой НЖК, в таких позиционных формах ТГ, как ППО и ПОП, в крови формируются безлигандные ЛПОНП→ЛПНП; поглотить их физиологичным путём апоВ-100 эндоцитоза не могут

все клетки. В крови пальмитиновые ЛПОНП→ЛПНП и составляют основу формирования оседлыми макрофагами, гематогенными моноцитами атероматозных масс липидов в интима артерий эластического типа. Каковы же экзогенные (эндогенные) факторы, которые регулируют гидролиз ТГ?

Если расставить все пальмитиновые и олеиновые позиционные формы ТГ в порядке возрастания скорости гидролиза их при действии стандартизованной постгепариновой ЛПЛ, получится такая последовательность:

ППП — ППО — ОПП — ОПО — ПОП — ПОО — ООП — ООО.

Если пищу пациента можно охарактеризовать как «сдвиг вправо», профилактика двух разных патологических процессов — атеросклероза и атероматоза — будет успешной. И чем в большей мере реализация биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии будет соответствовать сдвигу влево, тем выше риск становления атеросклероза и атероматоза, короче время до развития симптомов ишемической болезни (ИБС), поражения атероматозом коронарных артерий и инцидентов инфаркта миокарда [18].

Экзогенным фактором инициирования ГЛП наиболее часто является плотоядная, мясная пища, богатая пальмитиновой НЖК; самой афизиологичной пищей для травоядного *Homo sapiens* является говядина. Содержание в ней пальмитиновой НЖК, одноимённых ТГ наиболее высоко в сравнении со всеми видами мяса: свинина, баранина, конина, мясо птицы. В sn-2 ТГ говядины наиболее часто этерифицирована пальмитиновая НЖК, в меньшей мере — олеиновая МЖК; в sn-1 и sn-3 наиболее часто располагается пальмитиновая ЖК. То же можно видеть в коровьем молоке, сливках, сметане и в сырах; в них в sn-2 ТГ этерифицирована пальмитиновая НЖК. Уже в энтероцитах, далее в гепатоцитах при реакции изомеризации пальмитиновую НЖК в sn-2 замещает олеиновая МЖК, а пальмитиновая НЖК перемещается в sn-3, формируя нежелательные для липолиза позиционные формы ТГ как ПОП; это нефизиологичный субстрат для липолиза. Изложенное способствует пониманию того, что если исключить врождённые, генетически обусловленные формы патологии, формирование *in vivo* двух афизиологичных процессов — вначале атеросклероза и далее атероматоза — является следствием главным образом нарушения биологической функции трофологии (питания) биологической реакции экзотрофии, внешнего питания.

Последовательная экспрессия липаз на ступенях филогенеза, параметры кинетики и функция. Последовательное формирование на ступенях филогенеза четырёх липолитических ферментов явилось следствием воздействия факторов внешней среды; происходило это на протяжении нескольких миллиардов лет. Первыми субстратами для наработки энергии в глубинах океана стали уксусная кислота, ацетат, диацетат изначально минерального происхождения. Это соответствует биогеохимической теории В.И. Вернадского [19]; однако трудно сказать, откуда взялись

столь совершенные митохондрии у ранних в филогенезе архей.

Прежде чем началось развитие живого, в мировом океане необходимо было отгородить микрообъёмы гидрофильной среды, в которых могли бы в оптимальной концентрации быть накоплены биологически активные вещества, первичные белки; необходимо было сформировать ранние клеточные мембраны. К этому времени митохондрии уже окисляли ацетил-КоА и в дыхательной цепи нарабатывали макроэргический АТФ. Из ацетата минерального происхождения самые ранние клетки начали и синтез НЖК.

Если митохондрии активно поглощают и окисляют С2—С10 коротко-, среднецепочечные С12—С14 НЖК и нарабатывают АТФ, то монослойные структуры, из которых при физико-химической взаимодействии можно сформировать бислойные мембраны клеток, образуют только длинноцепочечные ЖК; самой короткой из них является С16:0 пальмитиновая НЖК. Она обладает и высокой температурой плавления; это важно, поскольку температура раннего океана соответствовала изовольметрическому интервалу воды, 36—42°C. В этом интервале изменение температуры воды не сопровождается изменением её объёма. Так оптимальные физико-химические свойства пальмитиновой НЖК выдвинули её на авансцену биологии: а) коротко- и среднецепочечные НЖК стали субстратом для окисления митохондриями; б) длинноцепочечная же пальмитиновая НЖК стала компонентом клеточной мембраны. Для регуляции проницаемости мембраны, реализации биологической функции адаптации клетки начали синтез *in situ de novo* и циклического, полярного, вторичного, гидрофобного спирта ХС. Конденсируя ХС между полярными молекулами фосфатидилхолинов в наружном монослое мембраны, клетки регулировали её проницаемость [20].

Полагают, что животные клетки с раннего аутокринного (клеточного) уровня относительного биологического совершенства из ацетил-КоА в цикле Кноопа—Линена синтезируют пальмитиновую НЖК без образования среднецепочечных ЖК по пути ацетил-КоА→С16:0. Согласно филогенетической теории общей патологии, на втором уровне биологического совершенства, в паракринно регулируемых сообществах (ПС) функционально разных клеток, а позднее в органах и системах органов, произошло формирование первого *in vivo* варианта переноса в межклеточной среде экзогенных ЖК пищи в форме только полярных липидов в составе апоА-I липопротеинах высокой плотности (ЛПВП).

При жизни миллионы лет в глубинах океана в анаэробных условиях, в полной темноте, все животные были плотоядными (рыбоядными); поедали они себе подобных; синтеза глюкозы ещё миллионы лет не было. Основу обеспечения клеток энергией составлял метаболизм ЖК, включая: а) перенос гидрофобных ЖК в гидрофильной межклеточной среде; б) депонирование ЖК в цитоплазме клеток в форме ТГ и в) освобождение и использование депо субстратов для наработки митохондриями АТФ. При жизни в океане сформировались рыбоядные, плотоядные, не по своей воле оказавшиеся на суше, продолжили филогене-

тическое развитие вплоть до становления вида *Homo sapiens*. Для человека же характерным стало использование иной биологической функции трофологии, функции питания, внешнего питания; ещё далёкие предки вида *Homo sapiens* стали травоядными [21].

Перенос ЖК в форме неполярных ТГ в составе ЛПП и поглощение клетками у плотоядных. У рыбоядных в океане спустя миллионы лет первый вариант переноса ЖК в форме неполярных липидов — ТГ на ступенях филогенеза состоял в следующем.

1. Гидролиз экзогенных ТГ пищи в просвете тонкой кишки при действии панкреатической липазы. Освобождение НЭЖК, 2-моноацилглицерина, всасывание НЖК, МЖК, ненасыщенных ЖК (ННЖК) энтероцитами и повторная этерификация их в ТГ, но уже в цитоплазме энтероцитов.

2. В канальцах эндоплазматической сети (ретикулума) энтероцитов МБПТ формирует из разных ТГ рыхлую структуру ХМ, секретировав их в лимфу; далее ХМ оказываются в кровотоке [22]. Одновременно экзогенные, эссенциальные полиеновые ЖК (ПНЖК) этерифицируют энтероциты в состав полярных аминифосфолипидов (ФЛ) и секретируют в кровь. Происходит это в формируемых энтероцитами апоА-1 ЛПВП; ранние в филогенезе ЛПВП переносят ПНЖК в форме только полярных ФЛ, полярные НЖК, МЖК и ННЖК — в форме ди- и моноглицеридов.

3. В кровотоке с апоВ-48 ХМ ассоциируются с апоЕ; это белок лиганд и вектор; в результате все лигандные ХМ поглощают гепатоциты путём кооперативного апоЕ/В-48 рецепторного эндоцитоза [23].

4. Поглотив ХМ, гепатоциты реализуют биологическую реакцию оптимизации; при действии гормонозависимой липазы происходит гидролиз всех экзогенных ТГ, окисление в органеллах (в пероксисомах) афизиологичных ЖК и ретерификация физиологичных ЖК в ТГ. Утилизация афизиологичных ЖК происходит *in situ*, в пероксисомах в результате экспрессии одновременно функционально разных α -, β - и ω -оксидаз ЖК. Афизиологичными ЖК являются: а) транс-формы ЖК [24]; б) ЖК с нечётным числом атомов углерода; в) ЖК с разветвлённой цепью; г) дикарбоновые ЖК; д) ЖК с циклическими структурами в цепи; е) очень длинноцепочечные ЖК (более С24—С26 и ж) тию-ЖК с наличием в ЖК атомов серы (липоевая тию-ЖК [25]).

5. Синтезированный гепатоцитами апоВ-100 разделяет структурирует олеиновые, пальмитиновые, стеариновые, линолевые и линоленовые ТГ, формируя все одноимённые ЛПОНП и секретировав их в кровь; у плотоядных гепатоциты секретируют преимущественно пальмитиновые ЛПОНП.

6. Гидролиз в крови главным образом пальмитиновой ЖК в ТГ всех ЛПОНП активирует печёночная ГЛГ и кофактор апоС-III [26]; в процессе гидролиза ТГ и освобождения в кровотоке НЭЖК секретированные гепатоцитами ЛПОНП превращаются в одноимённые ЛПНП. Освобожденные при липолизе НЭЖК связывает альбумин; из этих ассоциатов ЖК как НЭЖК поглощают все клетки. В биологической реакции экзотрофии, в период постпрандиальной ГЛП, клетки *in vivo* используют экзогенные и синтезируемые гепа-

тоцитами из глюкозы эндогенные ЖК для покрытия потребностей в энергии.

7. В кровотоке белок, переносящий полиеновые эфиры холестерина (БППЭХ), формирует тройственный ассоциат — ЛПВП + БППЭХ + ЛПОНП. В рамках его ПНЖК в форме неполярных полиеновых эфиров холестерина (поли-ЭХС) переходят из ЛПВП в состав всех ЛПОНП. В ассоциации с более гидрофобными поли-ЭХС апоВ-100 принимает активную конформацию и формирует в ЛПНП активное положение домена-лиганда. Далее все клетки активно поглощают лигандные ЛПНП путём апоВ-100 эндоцитоза.

Следовательно, в филогенезе у плотоядных перенос к клеткам ЖК в форме неполярных ТГ начинают МБПТ и апоВ-48 в составе ХМ; заканчивается перенос при поглощении ХМ гепатоцитами путём апоЕ/В-48 эндоцитоза. Перенос ЖК продолжает апоВ-100 в ЛПОНП и после липолиза в составе ЛПНП; заканчивает перенос апоВ-100 эндоцитоз ЛПНП. В переносе ЖК у плотоядных (рыбоядных) задействованы: а) три класса ЛП: ХМ + ЛПОНП + ЛПНП; б) два стационарных апо — апоВ-48 + апоВ-100 и динамичный апоЕ и в) одна липаза — печёночная ГЛГ в межклеточной среде. У плотоядных (рыбоядных), принимая во внимание участие ХМ + ЛПОНП + ЛПНП в переносе ЖК, по классификации фенотипов ГЛП соответствует эпигенетически индуцированному типу V [27].

Когда в пермском и триасовом периодах мировой океан отступил и многие животные океана оказались на суше, большинство их погибло в первую очередь из-за отсутствия пищи. На суше практически не было плотоядной (рыбоядной) пищи, но было (есть) много травоядной. На суше растения в отличие от синезелёных и красных водорослей океана не синтезируют эссенциальные ПНЖК, ни ω -3 С20:5 эйкозапентаеновую, ни ω -3 С22:6 докозагексаеновую ПНЖК [28]; на суше растения не синтезируют и ω -6 С20:4 арахидоновую ПНЖК [29].

Перенос ЖК в ЛП у травоядных, до того как они начали синтез инсулина. В течение последующих миллионов лет не по своей воле оказавшиеся на суше рыбоядные адаптировались к новым условиям внешней среды, реализуя биологическую функцию трофологии, питания, биологическую реакцию экзотрофии, внешнего питания. В течение миллионов лет стали формироваться выраженные анатомические различия организма (*in vivo*) у многих травоядных животных и меньшего количества реально плотоядных мясоедов. Мы часто, не мудрствуя лукаво, говорим о существовании всеядных животных.

С позиций общей биологии таких животных нет; всеядными были бы животные, которые утром способны зубами оторвать от туши и проглотить, не жуя, большой кусок сырого мяса; вечером же собрать и съесть, тщательно и долго пережевывая, большое количество свежей травы, листьев. В филогенезе *in vivo* сформировались две системы питания у травоядных, *Homo sapiens* и у плотоядных, мясоедов. Можно привести много анатомических и физиологических различий в системе пищеварения, в реализации биологической функции трофологии. Можно начать с анатомических особенностей зубов и параметров слюны.

Далее последует в несколько раз большая длина тонкой кишки у травоядных по сравнению с плотоядными (хищниками). Надо принять во внимание и многократное различие времени, которое необходимо для переваривания и всасывания ЖК из животной и глюкозы из растительной пищи.

За миллионы лет предки вида *Homo sapiens* постепенно стали травоядными; приматы стали даже плоядными, питаясь в основном плодами с деревьев. Принципиальное различие метаболизма плотоядных и травоядных животных состоит в том, что основным субстратом пищи у плотоядных являются экзогенные ЖК, доминируют пальмитиновые позиционные формы ТГ и пальмитиновая НЖК. Основным же субстратом пищи травоядных являются полисахариды, растительная клетчатка, полимер глюкозы — крахмал, дисахарид сахароза и глюкоза. В организме травоядных и вида *Homo sapiens* сформировался иной вариант переноса ЖК в ЛП. Отдельные виды травоядных с пищей практически не получают ЖК; энтероциты всасывают их в малой мере или не всасывают вообще.

У травоядных животных в отличие от плотоядных перенос ЖК стал короче. Определено это тем, что не стало этапа переноса экзогенных ЖК от энтероцитов к гепатоцитам в составе апоВ-48 ХМ в лимфо- и кровотоке, да и апоВ-100 в ЛПОНП переносят также пальмитиновую НЖК, только эндогенную, ту, которую синтезировали гепатоциты из экзогенной глюкозы. Гидролиз пальмитиновых ТГ в таких позиционных формах олеиновых ТГ, как ПОП, реализует как и прежде печёночная ГЛГ. Как и ранее, секретированные гепатоцитами ЛПОНП превращаются в крови в одноимённые ЛПОНП, которые клетки поглощают путём апоВ-100 эндоцитоза. Суммируя сказанное, следует отметить, что в филогенезе второй этап переноса ЖК у травоядных: а) сформирован одним апоВ-100; б) перенос эндогенных ЖК осуществляют ЛПОНП + ЛПНП; в) гидролиз ТГ в ЛПОНП активирует печёночная ГЛГ; г) клетки поглощают ЛПНП путём апоВ-100 эндоцитоза. У травоядных до того, как они начали синтез инсулина, содержание в плазме крови ЛП на электрофореграмме [30] по классификации ВОЗ соответствует ГЛП типа ИБ.

Инсулин и формирование в филогенезе биологической функции локомоции. Выраженные изменения в метаболизме ЖК, переносе их в ЛП и поглощении клетками сформировались на ступенях филогенеза в процессе становления новой, поздней биологической функции локомоции, движения за счёт реципрокного сокращения в филогенезе новых, поперечнополосатых миоцитов. Биологическая роль инсулина состоит в обеспечении субстратами для выработки энергии всех клеток, которые реализуют биологическую функцию локомоции. Предшественником гормона в филогенезе был более ранний в филогенезе инсулиноподобный фактор роста; в каждом из ПС клеток его синтезировал пул клеток рыхлой соединительной ткани (РСТ). Со временем инсулин сформировал *in vivo* функционально активную систему инсулина и новую в филогенезе биологическую функцию локомоции. Со временем она стала основной биологиче-

ской функцией как у плотоядных хищников, так и у травоядных.

В филогенезе гормон сформировал *in vivo* систему инсулинзависимых клеток. Она включает: поперечнополосатые скелетные миоциты, синцитий кардиомиоцитов, инсулинзависимые подкожные адипоциты, перипортальные гепатоциты и специализированные макрофаги Купфера печени. Формирование столь высокоспециализированных оседлых макрофагов в печени, мы полагаем, определено тем, что разнообразие афизиологичных ЖК в растительной пище во много раз превышает плотоядную, мясную, тем более рыбоядную пищу. Независимыми от инсулина *in vivo* остались все клетки нервной системы, ВЖК сальника и забрюшинной клетчатки. Нейроны, астроциты и ВЖК сальника на плазматической мембране не имеют активных рецепторов к инсулину и зависимых от инсулина глюкозных транспортёров GLUT4 [31]. Инсулин завершил формирование замкнутой системы кровообращения, центрального насоса — сердца и централизованной системы депонирования ЖК в форме ТГ в составе ИПА и сформировал эффективное обеспечение кардиомиоцитов необходимым количеством олеиновых, но не пальмитиновых ЖК в форме НЭЖК. И если CD36 транслоказа переносит в кардиомиоциты преимущественно пальмитиновые ЖК в форме полярных НЭЖК, формируется диффузный липоидоз кардиомиоцитов и развивается дилатационная кардиомиопатия.

До действия инсулина каждая из клеток на первом (аутокринном) уровне относительного биологического совершенства самостоятельно запасала ЖК в форме ТГ в каплях липидов цитоплазмы и столь же самостоятельно активировала липолиз, освобождая в цитоплазму оптимальное количество ЖК в форме НЭЖК. Для реализации функции скелетных миоцитов, кардиомиоцитов инсулин сформировал централизованное снабжение их ЖК в форме НЭЖК как субстратом, который можно сразу окислить в митохондриях для выработки макроэнергетического АТФ. Напомним, что ни скелетные миоциты, ни кардиомиоциты не запасают в цитоплазме ЖК в форме ТГ в каплях липидов. В то же время они в большом количестве депонируют в цитоплазме гидрофильные гранулы гликогена — полимера глюкозы. Вероятно, формирование гидрофобных компонентов в цитоплазме поперечнополосатых миоцитов нарушает функцию сократимости миофибрилл. В условиях эксперимента сколь бы значительной не стала гипогликемия в межклеточной среде, ни скелетные миоциты, ни кардиомиоциты не станут участвовать в её компенсации. Запасённая миоцитами глюкоза предназначена только для сокращения самих клеток, но не для реализации биологической функции гомеостаза. Для этой биологической функции предназначен гликоген, который в цитоплазме накапливают в печени специализированные, инсулинзависимые перипортальные гепатоциты.

Централизованное снабжение скелетных миоцитов и кардиомиоцитов ЖК в форме НЭЖК *in vivo* состоит в том, что депонирование ЖК в форме неполярных ТГ происходит только в цитоплазме инсулинзависимых подкожных адипоцитов [32]. В ИПА происходит

и гидролиз депонированных ТГ с освобождением НЭЖК. Их альбумин во внутрисосудистом пуле межклеточной среды доставляет ко всем скелетным миоцитам; клетки активированно поглощают НЭЖК при действии CD36 транслоказы ЖК. Далее семейство белков, переносящих ЖК в цитоплазме, доставляют НЭЖК к митохондриям. Подобным же образом *in vivo* обеспечены субстратами энергии все зависимые от инсулина клетки.

У травоядных основную массу ЖК *in vivo* синтезируют гепатоциты, используя в качестве субстрата экзогенную глюкозу. Ещё с аутокринного уровня каждая животная клетка из глюкозы по пути лактат→пируват→ацетат→ацетил-КоА в цикле Кноопа—Линена синтезирует только пальмитиновую НЖК: кратко ацетил-КоА→С16:0. В первом и втором вариантах переноса к клеткам ЖК в форме ТГ в составе апоВ-100 ЛПОНП + ЛПНП вне действия инсулина доминировали пальмитиновая ЖК и пальмитиновые ТГ. На ступенях филогенеза *in vivo* при реализации первого (у рыбоядных) и второго (у травоядных) вариантов переноса к клеткам ЖК в форме ТГ в составе апоВ-100 ЛП доминировал пальмитиновый вариант метаболизма ЖК.

Митохондрии клеток через внутреннюю мембрану проводят в матрикс короткоцепочечные С4—С6 и среднецепочечные С8—С10 ЖК, но медленно переносят длинноцепочечную, насыщенную пальмитиновую ЖК. Окислить пальмитиновую НЖК на наружной стороне внутренней мембраны митохондрий и провести её в матрикс в форме двух среднецепочечных ЖК физико-химически сложно. Поглощение пальмитиновой НЖК стало лимитировать синтез *in vivo* макроэргического АТФ, обеспечение всех клеток энергией. Из-за невозможности быстро поглотить пальмитиновую НЖК митохондрии на ступенях филогенеза сформировали новый, специфичный транспортёр — карнитинпальмитоил ацилтрансферазу. Он стал переносить пальмитиновую НЖК через мембрану целиком и гидролизовать её уже в матриксе митохондрий. В результате увеличилась скорость поглощения митохондриями пальмитиновой НЖК; однако проблему это не решило. Прохождение НЖК через внутреннюю мембрану митохондрий, как и до этого, осталось «узким местом», лимитирующим этапом в синтезе АТФ в митохондриях [33].

Условия существования видов животных на ступенях филогенеза стали зависеть от реализации когнитивной биологической функции, функции позиционирования особей в пространстве. При оптимальном единении действия внешних и внутренних условий (регуляция метаболизма) преимущества в конкуренции стали получать те животные, которые в единицу времени могут наработать большее число молекул АТФ. Это те виды животных, у которых эффективность наработки АТФ более высокая, а в результате этого становятся выше и все кинетические параметры организма [34]. Это общебиологическая задача; далеко не на ранних ступенях филогенеза, но все-таки она была решена *in vivo* при действии инсулина. Поздний в филогенезе инсулин призван формировать и совершенствовать биологическую функцию локомоции.

Если не получается повлиять на функцию филогенетически ранних митохондрий, на митохондриальный геном, остается одно — модифицировать субстрат реакции, пальмитиновую НЖК [35, 36].

Полученные нами более 10 лет назад экспериментальные результаты автоматического титрования O_3 индивидуальных ЖК показали, что скорость физико-химического окисления С16:0 пальмитиновой НЖК намного ниже кинетических параметров окисления озоном С18:1 олеиновой МЖК [37]. Это дало основание обратить внимание на активность *in vivo* десатураз ЖК, экспрессию их на ступенях филогенеза и с этой точки зрения привлечь внимание всё к той же ранней в филогенезе пальмитиновой НЖК.

Окислять пальмитиновую НЖК на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий существенно легче, если ввести в её цепь одну двойную связь (ДС) и превратить НЖК в МЖК. Много ранее синтеза в филогенезе инсулина произошла экспрессия пальмитоил-КоА-десатуразы; фермент превратил С16:0 пальмитиновую НЖК в ω -9 С16:1 пальмитолеиновую МЖК. ДС при этом располагается у 9-го атома углерода, считая от карбоксильного конца ЖК. Однако энергия, которая необходима для гидролиза пальмитолеиновой МЖК, оказалась не оптимально высокой; желаемого увеличения поглощения митохондриями пальмитолеиновой МЖК не произошло.

И уже при синтезе в филогенезе инсулин экспресировал синтез двух новых ферментов — пальмитоил-КоА-элонгазу и стеарил-КоА-десатуразу. Действие первого фермента превратило С16:0 пальмитиновую НЖК в более длинноцепочечную С18:0 стеариновую НЖК с большей гидрофобностью и более высокой температурой плавления. Второй фермент путём введения ДС в позицию ω -9 превратил С18:0 стеариновую НЖК в С18:1 олеиновую НЖК [38, 39]. Расположение ДС в олеиновой МЖК, которая одинакова удалена от карбоксильного и метильного концов ЖК, потребовало минимальной энергии для гидролиза ЖК по месту расположения ДС. Происходит это на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий, обеспечивая поглощение ими олеиновой МЖК в форме двух среднецепочечных ЖК. Регуляция инсулином метаболизма ЖК, формирование высокоэффективного олеинового варианта метаболизма *in vivo* ЖК взамен потенциально менее эффективного пальмитинового варианта является основной биологической функцией инсулина. Биологическая функция инсулина — регуляция метаболизма ЖК и вторично — регуляция поглощения клетками глюкозы как субстрата для синтеза гепатоцитами *in situ de novo* олеиновой МЖК.

Вариант переноса ЖК в форме ТГ у травоядных при биологической функции локомоции и действии инсулина. Регуляция метаболизма ЖК инсулином состоит в том, что гормон всю синтезированную гепатоцитами из экзогенной глюкозы в цикле Кноопа—Линена пальмитиновую НЖК превращает в олеиновую НЖК. Далее гепатоциты этерифицируют олеиновую МЖК в одноимённые ТГ и секретируют их в кровоток в составе олеиновых ЛПОНП. Инсулин, формируя биологическую функцию локомоции, инициирует в межклеточной среде векторный перенос к ИПА те ЖК,

которые являются субстратами для синтеза митохондриями АТФ; это преимущественно МЖК в составе олеиновых ЛПОИП. В сформированном инсулином векторном переносе олеиновой МЖК от гепатоцитов к пулу ИПА в олеиновых ЛПОИП гидролиз ТГ в крови активирует иной, более поздний на ступенях филогенеза фермент — постгепариновую ЛПЛ и её кофактор апоС-II [40].

При оптимальном гидролизе постгепариновой ЛПЛ олеиновых ТГ в одноимённых ЛПОИП апоВ-100 принимает активную конформацию и с ним ассоциируется динамичный белок-вектор, апоЕ. Вместе они формируют кооперативный апоЕ/В-100 лиганд и одновременно синтезируют при действии гормона инсулинзависимые подкожные адипоциты, выставляя на клеточную мембрану апоЕ/В-100 рецепторы [41]. Далее олеиновые, лигандные ЛПОИП поглощают главным образом ИПА путём апоЕ/В-100 эндоцитоза. Так инсулин на поздних ступенях филогенеза сформировал эффективный, короткий перенос в межклеточной среде МЖК в форме олеиновых ТГ. Реализует перенос МЖК один апоВ-100; происходит это только в ЛПОИП, при действии постгепариновой ЛПЛ и активного апоЕ/В-100 эндоцитоза. Согласно классификации фенотипов ГЛП по Д. Фредриксону, третьему иницированному инсулином переносу к клеткам МЖК соответствует та электрофореграмма ЛП [42], которую именуют «состояние нормы при физиологичном уровне в плазме крови ТГ и ХС».

Биологическая роль инсулина и превращение плотоядных (рыбоядных) в травоядных. Обсуждается биологическая роль инсулина, регуляция в первую очередь метаболизма ЖК и вторично метаболизма глюкозы, в обеспечении организма энергией — синтез АТФ. При этом важно принять во внимание биологические, филогенетические особенности действия гормона.

1. Поздний в филогенезе инсулин не может превратить в олеиновую НЖК экзогенную, раннюю в филогенезе пальмитиновую НЖК, содержание которой может быть велико в плотоядной (мясной) пище. Инсулин экспрессирует превращение в олеиновую МЖК только ту эндогенную пальмитиновую НЖК, которую гепатоциты синтезируют из экзогенной глюкозы.

2. Избыточное содержание в плотоядной (мясной) пище пальмитиновой НЖК и индукция уже иным субстратом — пальмитиновыми ТГ — формирует активацию более ранней в филогенезе печеночной ГЛП и пальмитиновый вариант метаболизма ЖК. Обладая низкими потенциальными возможностями синтеза АТФ, пальмитиновый вариант метаболизма ЖК постоянно формирует *in vivo* состояние хронического дефицита энергии. Обусловлено это тем, что митохондрии медленно окисляют пальмитиновую НЖК, формируя хронический дефицит *in vivo* энергии и низкие кинетические параметры функции локомоции. Это относится к каждому из пациентов с синдромом инсулинорезистентности (ИР).

4. Экспрессия инсулином специфичного транспортера глюкозы ГЛЮТ4 и выставление его на клеточную мембрану при гипергликемии и низком со-

держании НЭЖК в межклеточной среде преследуют одну цель — активировать синтез олеиновой МЖК и наработку митохондриями АТФ. Метаболическими последствиями избытка плотоядной (мясной) пищи является в первую очередь гипертриглицеридемия, далее гипергликемия, формирование ГЛП типа Пб, высокий уровень ХС-ЛПНП за счёт высокого содержания пальмитиновых ЛПОИП→ЛПНП и постоянный дефицит *in vivo* энергии, хронически низкий уровень синтеза АТФ.

5. Филогенетически поздний инсулин не может блокировать липолиз и освобождение НЭЖК из висцеральных жировых клеток сальника. Будучи в филогенезе более ранними, ВЖК сальника на плазматической мембране не имеют активных рецепторов к инсулину и не формируют ГЛЮТ4; это и есть этиологическая основа формирования синдрома ИР. Инсулин активно блокирует липолиз (гидролиз ТГ) и освобождение в межклеточную среду олеиновой и пальмитиновой ЖК в форме НЭЖК во всех инсулинзависимых подкожных адипоцитах, но не в ВЖК сальника [43].

6. Миллионы лет на самых ранних ступенях филогенеза клетки активно осуществляли метаболизм ацетата, ацетил-КоА, синтез ЖК и гидролиз ТГ. И только миллионами лет позже клетки начали метаболизм глюкозы. Поэтому механизмы поглощения клетками ЖК в форме полярных НЭЖК являются куда более совершенными по сравнению с более поздним в филогенезе поглощением клетками глюкозы. И если возможно из межклеточной среды поглощать НЭЖК, клетки поглощать глюкозу не будут. Чтобы «принудить» клетки поглощать глюкозу, их надо лишить возможности поглощать из межклеточной среды НЭЖК; таким образом реализовано действие инсулина.

7. Митохондрии могут в матриксе окислять ацетил-КоА, образованный как из ЖК, так и из глюкозы по пути: глюкоза→лактат→пируват→ацетил-КоА. *In vivo* все соматические клетки окисляют ацетил-КоА, образованный из ЖК, и только митохондрии нейронов окисляют ацетил-КоА, который образовали сами клетки из глюкозы. Полагают, что гематоэнцефалический барьер является преградой, которая не позволяет средне- и длинноцепочечным ЖК оказаться в спинномозговой жидкости. На самом деле спинномозговая жидкость, которая по физико-химическим параметрам сходна с первичной мочой канальцев нефрона, является столь гидрофильной, что в ней могут находиться только С4 ЖК — кетоновые тела [44].

Инсулин, нарушения переноса ЖК в форме ТГ в ЛП и формирование типов ГЛП. Не так просто представить себе, что, согласно филогенетической теории общей патологии, половина фенотипов (типов) ГЛП при электрофорезе ЛП, согласно классификации ВОЗ, является следствием нарушения биологической функции трофологии, функции питания, биологической реакции экзотрофии — внешнего питания; нарушения эти инициированы нарушением эпигенетики [45]. Если рассмотреть первичные, генетически обусловленные фенотипы ГЛП и эпигенетические вторично обусловленные типы ГЛП, можно прояснить:

реально генетическими фенотипами врождённых нарушений метаболизма являются ГЛП фенотипов I, IIa и III. Эпигенетическими, сформированными в онтогенезе типами ГЛП являются: фенотип нормолипидемии (нет ГЛП) при денситометрии электрофореграмм ЛП часто удаётся выявить ГЛП типа IIb, более редко — ГЛП типа IV и ещё реже — ГЛП типа V [46, 47]. Нелегко после столь долгих представлений о генезе ГЛП фенотипа IIb как о «семейной» комбинированной ГЛП понять, что в большинстве случаев это всего-то «наеденные нарушения», сформированные каждым пациентом самостоятельно при несовершенстве *in vivo* когнитивной биологической функции.

На ступенях филогенеза по мере развития разных видов животных последовательно сформировались три варианта переноса ЖК в форме ТГ в составе ЛП: первый вариант ХМ + ЛПОНП + ЛПНП, второй вариант ЛПОНП + ЛПНП и третий вариант ЛПОНП.

Первый вариант функционирует в межклеточной среде у рыбоядных (плотоядных) при жизни в океане, при высоком содержании *in vivo* (доминировании) экзогенной пальмитиновой НЖК; всасывают её энтероциты. У ставших травоядными животными, которые ещё не начали синтез инсулина и основной ЖК *in vivo* является тоже пальмитиновая НЖК, но уже эндогенно синтезированная гепатоцитами из глюкозы, необходимость в ХМ полностью отпадает. Формирование же третьего этапа переноса в олеиновых ЛПОНП в основном МЖК + небольшое количество НЖК в олеиновые ТГ, инициировал инсулин.

В гепатоцитах инсулин экспрессировал превращение всей эндогенно синтезированной из глюкозы пальмитиновой НЖК в олеиновую МЖК; её к инсулинзависимым клеткам переносят апоЕ/В-100 ЛПОНП; олеиновые ЛПОНП просто не образуются. При электрофорезе ЛП у рыбоядных (плотоядных) чаще выявляют ГЛП типа V. У травоядных же до становления функции инсулина ЛП в плазме крови соответствуют ГЛП типа IIb. У травоядных при действии инсулина формируется электрофореграмма ЛП, которая выявляет отсутствие ГЛП.

Если в филогенезе, при физиологических изменениях индукции субстратом, происходили позитивные сдвиги в переносе к клеткам ЖК в форме ТГ в составе ЛП, можно полагать, что в онтогенезе афизиологичная индукция субстратом, избыточным количеством пальмитиновой НЖК в свою очередь инициирует негативные изменения в ЛП. Согласно общей биологии, правилу Геккеля — «онтогенез повторяет основные этапы филогенеза», можно обоснованно полагать: если травоядный в филогенезе *Homo sapiens* начинает злоупотреблять плотоядной (мясной) пищей, вместо нормолипидемии в плазме крови при электрофорезе ЛП можно выявить транзиторную ГЛП типа IV, далее длительную ГЛП типа IIb. Если пациент практически переходит на плотоядное питание, формируется ГЛП типа V.

Изменение переноса в межклеточной среде ЖК в форме ТГ при нарушении биологической функции трофологии, реакции экзотрофии начинается с формирования гипертриглицеридемии и кратковременного эпигенетически обусловленного формирования

ГЛП типа IV. Если содержание экзогенной пальмитиновой НЖК превышает физиологичные возможности переноса её в составе таких олеиновых ТГ, как ПОП, происходит формирование филогенетически ранних пальмитиновых ТГ, таких как ОПП глицерол, эпигенетически, вторично, начинается формирование пальмитиновых ЛПОНП→ЛПНП, которых ранее при травоядной и рыбоядной пище не было. Нарушение превращения в крови пальмитиновых ЛПОНП→ЛПНП, длительная циркуляция их в крови и есть причина гипертриглицеридемии, повышение уровня ХС-ЛПНП, компенсаторное увеличение содержания апоС-III, активности печёночной ГЛГ и формирования эпигенетически обусловленной ГЛП вначале типа IV, далее ГЛП типа IIb и, наконец, ГЛП типа V. Гипертриглицеридемию, повышение уровня ХС-ЛПНП и ГЛП типа IIb всегда, согласно физиологичной теории общей патологии, сопровождает синдром ИР и компенсаторное повышение артериального давления.

Нет необходимости выяснять, до какого уровня оптимально понизить содержание в плазме крови ХС-ЛПНП. Величина ХС-ЛПНП является производной от содержания ТГ; удастся усилителями, в первую очередь пациента, при соблюдении диеты нормализовать содержание в плазме крови ТГ в пределах 0,6—1,2 мМ/л; это достаточно. Уровень в плазме крови ХС-ЛПНП, содержание пальмитиновых НЖК, пальмитиновых ТГ и одноимённых ЛПОНП→ЛПНП понизятся самостоятельно. И не надо фармпрепаратов: сформировались афизиологичные процессы при нарушении основополагающих условий биологии, биологической функции трофологии; биологически их следует и устранить. И только после этого более эффективно реально заняться лечением пациентов с выявленными генетическими формами патологии метаболизма ЖК. Содержание экзогенной и эндогенной пальмитиновой НЖК в плазме крови не должно превышать возможности этерификации её в составе олеиновых ТГ, олеиновых ЛПОНП без образования пальмитиновых ЛПОНП и ЛПНП.

Рассматривая метаболическую пандемию — атеросклероз — в свете биологической теории общей патологии с учётом всех этиологических факторов, можно обоснованно полагать, что патогенез атеросклероза активирован в то время, когда травоядный в филогенезе *Homo sapiens* начинает абиологически злоупотреблять плотоядной пищей, нарушая при этом биологические функции трофологии, функцию гомеостаза и функцию эндоэкологии [1]. В ответ на формирование атеросклероза, биологической функции эндоэкологии, замусоривание межклеточной среды эндогенными флогенами большой молекулярной массы — безлигандными пальмитиновыми ЛПОНП→ЛПНП и активация биологической функции адаптации, компенсаторно происходит активация биологической реакции воспаления, биологической функции эндоэкологии.

Профилактика атеросклероза и атероматоза является единой: это всего-то соблюдение человеком отработанных на ступенях филогенеза биологических закономерностей. На ступенях длительного филогене-

неза предки человека были рыбающими (плотоядными); на суше они стали травоядными, но не были мясоедами. Для *Homo sapiens* поедание мяса и богатых пальмитиновой НЖК молочных продуктов в течение всей жизни является явным нарушением биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии; для травоядного в филогенезе человека физиологично поедание фруктов, овощей и рыбы. При желании сохранить здоровье, избежать инфаркта миокарда и не быть «стендериванным» необходимо соблюдать каноны общей биологии во всех ситуациях.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3—16; 21—26; 28—30; 32; 36; 39—42; 47 см. REFERENCES)

1. Титов В.Н. *Клиническая биохимия. Курс лекций*. М.: ИНФРА-М; 2017.
2. Коткина Т.И., Титов В.Н. Позиционные изомеры триглицеридов в маслах, жирах и apoB-100 липопротеинах. Пальмитиновый и олеиновый варианты метаболизма жирных кислот — субстратов для наработки энергии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 1: 22—43.
17. Титов В.Н. Этиология и патогенез последовательного становления тестов гипертриглицеридемии, гиперхолестеринемии и гипергликемии. Общность этиологических факторов метаболических пандемий и компенсаторная роль apoC-III. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 1: 4—12.
18. Титов В.Н. Высокое содержание пальмитиновой жирной кислоты в пище — основная причина повышения уровня холестерина липопротеинов низкой плотности и атероматоза интимы артерий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 2: 3—10.
19. Вернадский В.И. *Биосфера и ноосфера*. М.: Наука; 1989.
20. Гончаров Н.В., Уколов А.И., Орлова Т.И., Мигаловская Е.Д., Войтенко Н.Г. Метабономика: на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(1): 3—17.
27. Титов В.Н. *Клиническая биохимия жирных кислот, липидов и липопротеинов*. М.—Тверь: ООО «Издательство Триада»; 2008.
31. Титов В.Н. *Метаболический синдром — переиздание физиологичной пищи. Висцеральные жировые клетки, незатерифицированные и свободные жирные кислоты*. М.: ИНФРА-М; 2017.
33. Титов В.Н. Функция митохондрий, карнитин, коэнзим-А, жирные кислоты, глюкоза, цикл Рендла и инсулин. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 2: 32—42.
34. Шноль С.Э. *Физико-химические факторы биологической эволюции*. М.: Издательство «Наука»; 1979.
35. Титов В.Н. Инсулин: иницирование пула инсулинзависимых клеток, направленный перенос триглицеридов и повышение кинетических параметров окисления жирных кислот. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 4: 27—37.
37. Лисицын Д.М., Разумовский С.Д., Тишенин М.А., Титов В.Н. Кинетические параметры окисления озоном индивидуальных жирных кислот. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2004; 138(11): 517—9.
38. Титов В.Н. Изоферменты стеарил-коэнзим А-десатуразы и действие инсулина в свете филогенетической теории патологии. Олеиновая жирная кислота в реализации биологических функций трофологии и локомоции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 11: 16—26.
43. Титов В.Н., Салтыкова М.М. Становление на ступенях филогенеза функции и метаболизма подкожных инсулинзависимых адипоцитов. Этиологический фактор и патогенез ожирения как метаболической пандемии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(1): 4—12.
44. Титов В.Н., Ширинский В.П. Резистентность к инсулину — конфликт между биологическими настройками энергетического метаболизма и образом жизни человека (взгляд на проблему с эволюционных позиций). *Сахарный диабет*. 2016; 19(4): 286—94.
45. Кэри Н. *Эпигенетика: как современная биология переписывает наши представления о генетике, заболеваниях и наследственности*. Ростов-на-Дону: Феникс; 2012.
46. Титов В.Н., Амелюшкина В.А., Рожкова Т.А. Конформация apoB-100 в филогенетически и функционально разных липопротеинах низкой и очень низкой плотности. Алгоритм формирования фенотипов гиперлипидемии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 1: 27—38.

REFERENCES

1. Titov V.N. *Clinical biochemistry. Lecture course. [Klinicheskaya biokhimiya. Kurs lektiy]*. Moscow: INFRA-M; 2017. (in Russian)
2. Kotkina T.I., Titov V.N. Positional isomers of triglycerides in oils, fats and apoB-100 lipoproteins. Palmitin and olein variants of the metabolism of fatty acids — substrates for energy production. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 1: 22—43. (in Russian)
3. Eichmann T.O., Kumari M., Haas J.T., Farese R.V., Zimmermann R., Lass A., Zechner R. *Studies* on the substrate and stereo/regioselectivity of adipose triglyceride lipase, hormone-sensitive lipase, and diacylglycerol-O-acyltransferases. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(49): 41446—57.
4. Weber N., Klein E., Mukherjee K. Stereospecific incorporation of palmitoyl, oleoyl and linoleoyl moieties into adipose tissue triacylglycerols of rats results in constant sn-1:sn-2:sn-3 in rats fed rapeseed, olive, conventional or high oleic sunflower oils, but not in those fed coriander oil. *J. Nutr.* 2003; 133(2): 435—41.
5. Sondergaard E., Andersen I.R., Sørensen L.P., Gormsen L.C., Nielsen S. Lipoprotein lipase activity does not predict very low-density lipoprotein-triglyceride fatty acid oxidation during exercise. *Scand. J. Med. Sci. Sports*. 2017; 27(5): 474—81.
6. Mendoza L.D., Rodrigues J.A., Leclaire J., Buono G., Fotiadu F., Carriere F., Abousalham A. An ultraviolet spectrophotometric assay for the screenin of sn-2-specific lipases using 1,3-O-dioleoyl-2-O- α -eleostearoyl-sn-glycerol as substrate. *J. Lipid. Res.* 2012; 53(1): 185—94.
7. Yli-Jokipii K.M., Schwab U.S., Tahvonen R.L., Kurvinen J.P., Mykkanen H.M., Kallio H.P. Triacylglycerol molecular weight and to a lesser extent, fatty acid positional distribution, affect chylomicron triacylglycerol composition in women. *J. Nutr.* 2002; 132(5): 924—9.
8. Zambon A., Deeb S.S., Bensadoun A., Foster K.E., Brunzell J.D. In vivo evidence of a role for hepatic lipase in human apoB-containing lipoprotein metabolism, independent of its lipolytic activity. *J. Lipid. Res.* 2000; 41(12): 2094—9.
9. Merkel M., Loeffler B., Kluger M., Fabig N., Geppert G., Pennacchio L.A., Laatsch A., Heeren J. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(22): 21553—60.
10. Gouk S.W., Cheng S.F., Mok J.S., Ong A.S., Chua C.H. Long-chain SFA at the sn-1, 3 positions of TAG reduce body fat deposition in C57BL/6 mice. *Br. J. Nutr.* 2013; 110(11): 1987—95.
11. Giammanco A., Cefalu A.B., Noto D., Averna M.R. The pathophysiology of intestinal lipoprotein production. *Front. Physiol.* 2015; 6: 61—70.
12. Oda O.J., Ofori S., Maduka O. Palm oil and the heart: A review. *World. J. Cardiol.* 2015; 7(3): 144—9.
13. Schoiswohl G., Schweiger M., Schreiber R., Gorkiewicz G., Preiss-Landl K., Taschler U., Zierler K.A. Adipose triglyceride lipase plays a key role in the supply of the working muscle with fatty acids. *J. Lipid. Res.* 2010; 51(3): 490—9.
14. Zechner R., Kienesberger P.C., Haemmerle G., Zimmermann R., Lass A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J. Lipid. Res.* 2009; 50(1): 3—21.
15. Herrera L.C., Potvin M.A., Melanson J.E. Quantitative analysis of positional isomers of triacylglycerols via electrospray ionization tandem mass spectrometry of sodiated adducts. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 2010; 24(18): 2745—52.
16. Leskinen H., Suomela J.P., Kallio H. Quantification of triacylglycerol regioisomers in oils and fat using different mass spectrometric and liquid chromatographic methods. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 2007; 21(14): 2361—73.

17. Titov V.N. Etiology and pathogenesis of sequential development of tests of hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia and hyperglycemia. The generality of the etiological factors of metabolic pandemics and the compensatory role of apoS-III. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 1: 4—12. (in Russian)
18. Titov V.N. The high content of palmitic fatty acid in food is the main cause of increased levels of low density lipoprotein cholesterol and arterial intima atheromatosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 2: 3—10. (in Russian)
19. Vernadskiy V.I. *Biosphere and noosphere*. [*Biosfera i noosfera*]. Moscow: Nauka; 1989. (in Russian)
20. Goncharov N.V., Ukolov A.I., Orlova T.I., Migalovskaya E.D., Voytenko N.G. Metabolomics: on the way of integration of biochemistry, analytical chemistry, informatics. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(1): 3—17. (in Russian)
21. Titov V.N. Common etiology, different pathogenesis and basics of atherosclerosis and atheromatosis prevention. Marked differences in lipoprotein-mediated fatty acids transport in blood of herbivores and carnivores. *Intern. Heart. Vasc. Dis*. 2016; 4(12): 22—35.
22. Walsh M.T., Iqbal J., Josekutty J., Soh J., Di Leo E., Özyaydin E., Gündüz M. Novel abetalipoproteinemia missense mutation highlights the Importance of the N-terminal β -barrel in microsomal triglyceride transfer protein function. *Circ. Cardiovasc. Genet*. 2015; 8(5): 677—87.
23. Nauli A.M., Sun Y., Whittimore J.D., Atiya S., Krishnaswamy G., Nauli S.M. Chylomicrons produced by Caco-2 cells contained ApoB-48 with diameter of 80-200 nm. *Physiol. Rep*. 2014; 2(6): e12018.
24. Hayes K.C., Pronczuk A. Replacing trans fat: the argument for palm oil with a cautionary note on interesterification. *J. Am. Coll. Nutr*. 2010; 29(3 Suppl): 253S—84S.
25. Rogue A., Anthérieu S., Vluggens A., Umbdenstock T., Claude N., de la Moureyre-Spire C., Weaver R.J., Guillouzo A. PPAR agonists reduce steatosis in oleic acid-overloaded HepaRG cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2014; 276(1): 73—81.
26. Wang F., Kohan A.B., Dong H.H., Yang Q., Xu M., Huesman S., Lou D., Hui D.Y., Tso P. Overexpression of apolipoprotein C-III decreases secretion of dietary triglyceride into lymph. *Physiol. Rep*. 2014; 2(3): e00247.
27. Titov V.N. *Clinical biochemistry of fatty acids, lipids and lipoproteins*. [*Klinicheskaya biokhimiya hzirnnyh kislot, lipidov i lipoproteinov*]. Moscow—Tver': OOO «Izdatel'stvo «Triada»; 2008. (in Russian)
28. Sperling L.S., Nelson J.R. History and future of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease. *Curr. Med. Res. Opin*. 2016; 32(2): 301—11.
29. Handelsman Y., Shapiro M.D. Triglycerides, atherosclerosis, and cardiovascular outcome studies: focus on omega-3 fatty acids. *Endocr. Pract.* 2017; 23(1): 100—12.
30. Tani S., Matsumoto M., Nagao K., Hirayama A. Association of triglyceride-rich lipoproteins-related markers and low-density lipoprotein heterogeneity with cardiovascular risk: effectiveness of polyacrylamide-gel electrophoresis as a method of determining low-density lipoprotein particle size. *J. Cardiol*. 2014; 63(1): 60—8.
31. Titov V.N. Metabolic syndrome —overeating physiological food. Visceral fat cells, and non-esterified free fatty acids. [*Metabolicheskii sindrom — pereedanie fiziologichnoy pishi. Viskeral'nye ghirovye kletki, neeterifizirovannye i svobodnye ghirovye kisloty*]. Moscow: INFRA-M; 2017. (in Russian)
32. Arner P., Bernard S., Salehpour M., Possnert G., Lieb J., Steier P., Buchholz B.A., Eriksson M., Arner E. Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease. *Nature*. 2011; 478(7367): 110—3.
33. Titov V.N. Function of mitochondria, carnitine, coenzyme-A, fatty acids, glucose, Rendle cycle and insulin. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 2: 32—42. (in Russian)
34. Shnol S.E. *Physicochemical factors of biological evolution*. [*Fiziko-khimicheskie faktory biologicheskoy evolyutsii*]. Moscow: Izdatel'stvo «Nauka»; 1979. (in Russian)
35. Titov V.N. Insulin: initiation of a pool of insulin-dependent cells, directed transfer of triglycerides and an increase in the kinetic parameters of oxidation of fatty acids. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 4: 27—37. (in Russian)
36. Petersen K.F., Dufour S., Shulman G.I. Decreased insulin-stimulated ATP synthesis and phosphate transport in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *PLoS Med*. 2005; 2(9): e233.
37. Lisitsyn D.M., Razumovskiy S.D., Tischenin M.A., Titov V.N. Kinetic parameters of individual ozone oxidation of fatty acids. *Bulliten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2004; 138(11): 517—9. (in Russian)
38. Titov V.N. Isoenzymes of stearyl-coenzyme A-desaturase and the action of insulin in the light of the phylogenetic theory of pathology. Oleic fatty acid in the realization of the biological functions of trophology and locomotion. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 11: 16—26. (in Russian)
39. Miyazaki M., Ntambi J.M. Role of stearyl-coenzyme a desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins leukot Essent Fatty Acids*. 2003; 68(2): 113—21.
40. Nordestgaard B.G. Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease: new insights from epidemiology, genetics, and biology. *Circ. Res*. 2016; 118(4): 547—63.
41. Corsetti J.P., Gansevoort R.T., Bakker S.J., Navis G., Sparks C.E., Dullaart R.P. Apolipoprotein E predicts incident cardiovascular disease risk in women but not in men with concurrently high levels of high-density lipoprotein cholesterol and C-reactive protein. *Metabolism*. 2012; 61(7): 996—1002.
42. Singh Y., Lakshmy R., Gupta R., Kranthi V. A rapid 3% polyacrylamide slab gel electrophoresis method for high through put screening of LDL phenotype. *Lipids. Health. Dis*. 2008; 7: 47—55.
43. Titov V.N., Saltykova M.M. Formation of the function and metabolism of hypodermic insulin dependent adipocytes at the stages of phylogenesis. The etiological factor and pathogenesis of obesity as a metabolic pandemic. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(1): 4—12. (in Russian)
44. Titov V.N., Shirinskiy V.P. Insulin resistance is a conflict between the biological settings of energy metabolism and the way people live (look at the problem from an evolutionary perspective). *Sakharniy diabet*. 2016; 19(4): 286—94. (in Russian)
45. Keri N. Epigenetics: how modern biology rewrites our ideas about genetics, diseases and heredity. [*Epigenetika: kak sovremennaya biologiya perepisyvaet nashi predstavleniya o genetike, zabol-evaniyah i nasledstvennosti*]. Rostov-na-Donu: Feniks; 2012. (in Russian)
46. Titov V.N., Amelyushkina V.A., Rozhkova T.A. Conformation of apoB-100 in phylogenetically and functionally different lipoproteins of low and very low density. Algorithm for the formation of phenotypes of hyperlipoproteinemia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 1: 27—38. (in Russian)
47. Ensign W., Hill N., Heward C.B. Disparate LDL phenotypic classification among 4 different methods assessing LDL particle characteristics. *Clin. Chem*. 2006; 52(9): 1722—7.

Поступила 10.07.17

Принята к печати 21.07.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.36-07:616.152-073.537.9

Сажина Н.Н.¹, Попов И.Н.², Титов В.Н.³

СРАВНЕНИЕ ДВУХ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ПАТОЛОГИЕЙ ПЕЧЕНИ

¹ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва;

²НИИ антиокислительной терапии, Берлин, Германия;

³ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава РФ, 121552, Москва

Проведена сравнительная оценка антиокислительной активности (АОА) сыворотки крови больных с патологией печени двумя хемилюминесцентными методами с разными моделями свободнорадикального окисления: «Hb-H₂O₂-люминол» и «АБАП-люминол». Выявлена достоверная, но не высокая корреляция результатов ($r = 0,798$), что связано, главным образом, с различием механизмов иницирования свободных радикалов и влиянием компонент сыворотки крови на процесс иницирования. Сильней это влияние проявляется в модели «Hb-H₂O₂-люминол». Расхождение результатов измерений более выражено у пациентов с аномально высоким содержанием в крови билирубина. В этой связи, более предпочтительной в клинической практике для оценки АОА следует считать модель окисления «АБАП-люминол».

Ключевые слова: антиокислительная активность, хемилюминесценция, свободнорадикальное окисление, люминол, сыворотка крови.

Для цитирования: Сажина Н.Н., Попов И.Н., Титов В.Н. Сравнение двух хемилюминесцентных моделей для оценки антиокислительной активности сыворотки крови больных с патологией печени. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(1): 16-21. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-16-21>

Sazhina N.N.¹, Popov I.N.², Titov V.N.³

THE COMPARISON OF TWO CHEMILUMINESCENT MODELS FOR ASSESSING ANTI-OXIDATIVE ACTIVITY OF BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH LIVER PATHOLOGY

¹The Federal state budget institution of science "The N.M. Emanuel institute of biochemical physics" of the Russian academy of sciences, 119334 Moscow, Russia

²The research institute of anti-oxidation therapy, Berlin, Germany

³The Federal state budget scientific institution "The Russian cardiologic R&D production complex" of Minzdrav of Russia, 121552 Moscow, Russia

The comparative assessment was carried out concerning anti-oxidation activity of blood serum of patients with liver pathology using two chemiluminescent techniques with different models of free radical oxidation: «Hb-H₂O₂-luminol» и «ABAP-luminol». The reliable but low correlation of results was established ($r=0,798$) related mainly to difference in mechanisms of initiation of free radicals and effect of blood serum on initiation process. This effect is stronger manifested in model «Hb-H₂O₂-luminol». The discrepancy of results of measurement is more expressed in patients with anomalous higher content of bilirubin in blood. Thereupon, oxidation model «ABAP-luminol» is to be considered as a more preferable for clinical practice.

Key words: anti-oxidant activity; chemiluminescence; free radical oxidation; luminol; blood serum.

For citation: Sazhina N.N., Popov I.N., Titov V.N. The comparison of two chemiluminescent models for assessing anti-oxidative activity of blood serum of patients with liver pathology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63 (1): 16-21. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-16-21>

For correspondence: Sazhina N.N., candidate of physical mathematical sciences, senior researcher of the Federal state budget institution of science "The N.M. Emanuel institute of biochemical physics". e-mail: Natnik48s@yandex.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.02.2017

Accepted 20.02.2017

Введение. Определение антиокислительной активности (АОА) сыворотки крови человека является важной задачей для медико-биологических исследований, поскольку АОА определяет защитную систему организма для борьбы с окислительным стрессом, как результатом нарушения равновесия между образующимися свободными радикалами и соответствующими защитными механизмами в организме. Сыворотка крови представ-

ляется сложной субстанцией для исследований, АО состав которой обусловлен, прежде всего, наличием в ней аминокислот, мочевой кислоты, витаминов Е, А, С, гормонов, ферментов, а также промежуточных и конечных продуктов метаболизма [1]. При этом суммарная АОА есть некая интегральная величина, характеризующая потенциальную возможность АО действия всех компонент сыворотки крови с учетом их потенциального синергизма. Печень - один из главных органов в антиокислительной системе организма, поэтому изучение АОА сыворотки крови больных с патологией печени является важным аспектом понимания *in vivo*

Для корреспонденции: Сажина Наталья Николаевна, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. ФГБУ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; e-mail: Natnik48s@yandex.ru

окислительных превращений. На протяжении многих лет предпринимаются попытки создания методик для определения суммарной АОА одновременно всех, присутствующих в плазме крови, ингибиторов свободно-радикальных реакций, однако роль каждого из АО может существенно отличаться при различных способах активации окислительных процессов. Поэтому выбор адекватных систем оценки АОА имеет первостепенное значение для правильной интерпретации полученных результатов в рамках клинической лабораторной диагностики. Определение АОА предполагает не только обнаружение одного или нескольких веществ, а выявление их «функциональной» АОА, что может быть воспроизведено в подходящей окислительной системе. Основными компонентами любой тест-системы для определения АОА являются: система генерации радикалов и субстрат или молекула-мишень, которая подвергаясь окислению, меняет свои регистрируемые физико-химические свойства. От выбора этих объектов и зависит информативность полученных результатов. В настоящее время всё большее распространение получают хемиллюминесцентные (ХЛ) методы определения АОА сыворотки крови и других биологических жидкостей [1]. Они достаточно чувствительны, оперативны и позволяют непосредственно контролировать кинетику окисления. Одним из главных различий ХЛ методов является способ генерации свободных радикалов. Он может осуществляться по разным принципам: химическому (например, в ферментативной реакции ксантинооксидаз, при взаимодействии гемсодержащих производных с перекисью водорода) или физико-химическому (при термоиницированном распаде азо-соединений, облучении фотосенсибилизаторов).

Цель настоящей работы - сравнительный анализ определения суммарной АОА сыворотки крови пациентов с патологией печени, проведенный на двух хемиллюминесцентных приборах с различными моделями свободнорадикального окисления.

Материал и методы. Пробы сыворотки крови 26 больных с патологией печени (атрофический цирроз, новообразования и др.) и 8 доноров с необходимыми клиническими показателями крови были предоставлены для исследования Институтом клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова Российского кардиологического научно-производственного комплекса. Измерения суммарной АОА параллельно на двух ХЛ приборах были выполнены в ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН.

В первой модели свободнорадикального окисления использовалась система «гемоглобин (Hb)—(H₂O₂)—люминол», в которой образование радикалов-инициаторов происходит при взаимодействии Hb и H₂O₂, а люминол играет роль хемиллюминогенного субстрата окисления. Эта модель, хотя и не до конца изучена, представляет интерес своей «физиологичностью», поскольку взаимодействие Hb и H₂O₂ может происходить *in vivo*. Подробная методика использования этой модели для изучения АОА сыворотки крови и ее отдельных компонентов изложена в [2]. Кинетика и конкретная схема протекающих при взаимодействии Hb и H₂O₂ реакций очень сложные. Авторами [3] было обнаружено, что в результате реакции оксиHb с H₂O₂ происходит быстрое образование метHb (Hb-Fe³⁺). Взаимодействие метHb с избытком H₂O₂ ([гем]:[H₂O₂] = 1:10, моль:моль) сопровождается разрушением гема и освобождением ионов железа, которые реагируют с H₂O₂, образуя реактив-

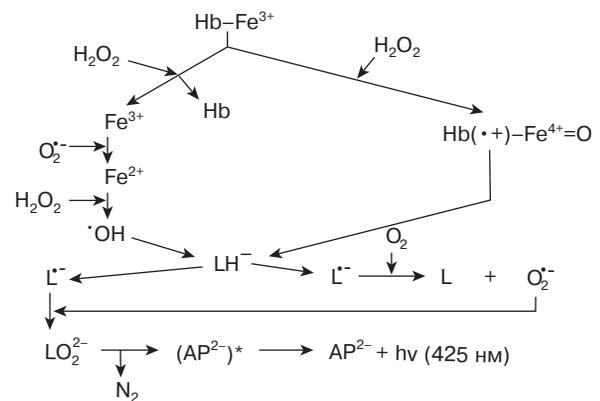
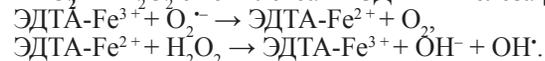


Рис. 1. Предполагаемая схема реакций в системе «Hb—H₂O₂—люминол», приводящих к генерации квантов ХЛ (пояснения в тексте).

ную форму, окисляющую дезоксирибозу. Поскольку это окисление ингибируется хелаторами ионов железа и перехватчиками OH•-радикала, был сделан вывод, что он и является этой реактивной формой [3, 4]. Однако при взаимодействии оксиHb и метHb с эквимольными концентрациями H₂O₂ ([гем]:[H₂O₂] = 1:1) разрушения гема не наблюдается, а происходит образование другой реактивной частицы, которая также окисляет дезоксирибозу, но ее окислительная деградация меньше ингибируется перехватчиками OH•, но более чувствительна к таким ингибиторам, как 4-(2-гидроксиэтил) пиперазин-1-этансульфоновая кислота. Этой частицей является радикал феррил Hb (Hb(•+)-Fe⁴⁺=O) [5, 6], обладающий высокой реакционной способностью [7, 8]. Добавление в реакцию вместо Hb солей двухвалентного (FeSO₄) и трехвалентного железа (FeCl₃) не дает свечения [2], что указывает на необходимость наличия гемовой структуры у радикалов-инициаторов. В методике [2] для предотвращения разложения H₂O₂ металлами переменной валентности, присутствующими в следовых количествах в воде и химических реактивах, в состав буфера добавляли 100 мкМ ЭДТА (этилендиаминтетраацетат). Обнаруженная при этом способность церулоплазмينا и трансферрина уменьшать интенсивность ХЛ системы «Hb—H₂O₂—люминол», обусловлена антирадикальными свойствами этих белков [9], а не их ферроксидазной (церулоплазмин) или хелатирующей (трансферрин) активностью [9]. Наиболее вероятными инициаторами окислительных превращений люминола в рассматриваемой модельной системе являются радикалы феррилHb. Однако это не исключает участия в них и OH•, который может также образоваться при взаимодействии O₂•- и H₂O₂ с комплексами ЭДТА и железа [10]:



На рис. 1 приведена предполагаемая схема реакций, приводящих к образованию радикалов-инициаторов окисления люминола [11]. Взаимодействие H₂O₂ с метHb, с одной стороны, сопровождается разрушением гема и выходом из него ионов железа, участвующего в образовании OH•, а, с другой стороны, приводит к возникновению радикалов феррилHb (Hb(•+)-Fe⁴⁺=O). Указанные радикалы-инициаторы вызывают одноэлектронное окисление люминола, в процессе которого образуется L•-радикал, O₂•-радикал, эндопероксид люми-

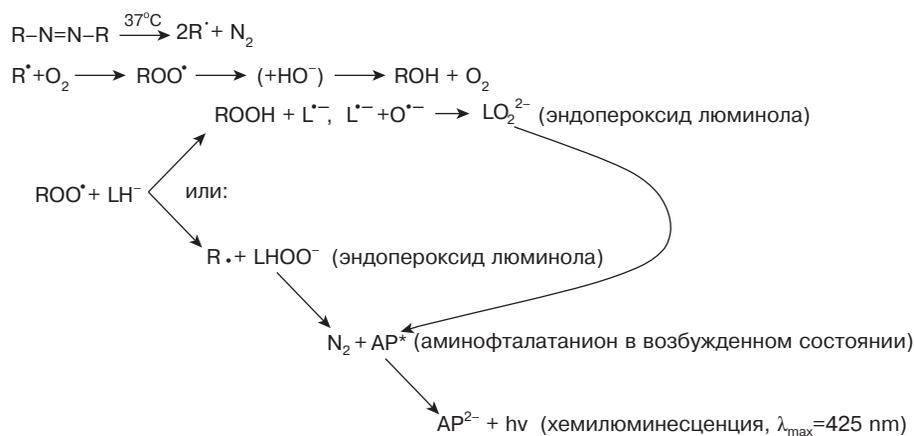


Рис. 2. Схема предполагаемых реакций в модели «АБАП-люминол».

нола LO_2^{2-} и 3-аминофталат дианион в возбужденном состоянии (AP^{2-})*, при переходе которого в основное состояние высвечивается квант света $h\nu$ (425 нм). Преимуществом этой модели, помимо «физиологичности», является доступность и не токсичность используемых реактивов, недостатком - нестабильность H_2O_2 и необходимость контроля ее концентрации.

ХЛ этой модельной системы регистрировали на приборе «Lum-5773»; www.chemilum.ru по методике [2].

Во второй модели (термо-ХЛ) субстратом окисления тоже служит люминол, а инициирование свободных радикалов происходит при термическом распаде водорастворимого азо-соединения 2.2'-азо-бис (2-амидинопропан) дигидрохлорида (АБАП). Возникшие радикалы детектируются в реакции с люминолом (LH^-), сопровождающейся ХЛ. На рис. 2 приведена соответствующая схема реакций [12].

Эндопероксид люминола, образующийся в реакциях, существует в двух формах, одна из которых трансформируется в LH^- и O_2 без излучения (верхняя реакция на рис. 3 [13]), в то время, как другая форма, после промежуточных превращений, теряя азот, переходит в молекулу 3-аминофталат дианиона в возбужденном состоянии (AP^{2-})*, в результате чего испускается квант света (нижняя реакция на рис. 3 [14]). Скорости этих реакций примерно одинаковы, но точный механизм второй реакции не ясен [14]. В работе [12] установлено, что в ней должен участвовать супероксид $O_2^{\cdot-}$, поскольку суперокси-

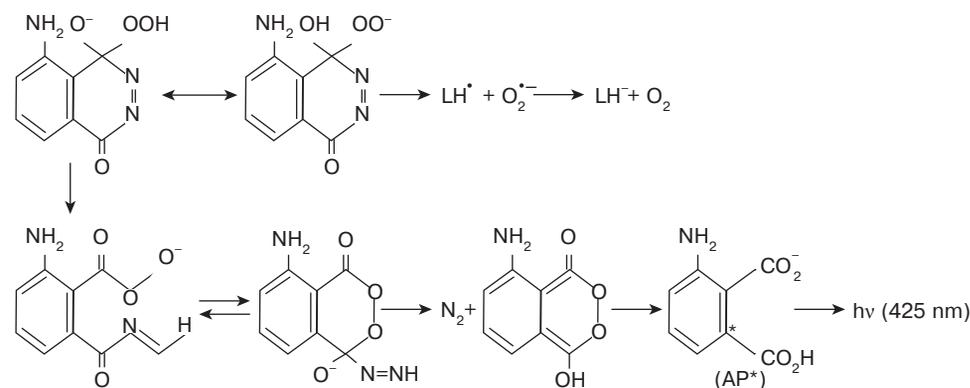


Рис. 3. Реакции превращения эндопероксида люминола.

дисмутаза (СОД) тушит хемилюминесценцию.

Количество пероксидных радикалов, образующихся при термическом распаде АБАП равно: $N = R_i \cdot t = k[АБАП]t$, где R_i — скорость генерации радикалов, k — константа скорости, t — продолжительность реакции [15]. В водной среде с $pH = 7,4$ и температуре $37^\circ C$, R_i , (моль/л)/с = $1,36 \cdot 10^{-6} \cdot [АБАП]$. Для антиоксиданта с концентрацией $[АО]$ время ингибирования генерации пероксидных радикалов $t_{inh} = n[АО]/R_i$, где n — соответствующий стехиометрический коэффициент. Преимуществом модели термо-ХЛ (ТХЛ) является постоянство скорости инициирования радикалов при

стабильной температуре в течение длительного времени (период полураспада 175 часов). Регистрация ТХЛ осуществлялась на приборе minilum® при температуре $(37 \pm 0,01)^\circ C$ (www.minilum.de).

В обеих ХЛ системах основным измеряемым параметром при определении суммарной АОА водорастворимых компонентов плазмы крови (АСВ — «integral antiradical capacity of water soluble compounds») являлся латентный период. Он определялся как время от момента инициирования окисления до точки пересечения с временной осью касательной, приложенной к ХЛ кривой в точке её перегиба, соответствующей максимуму первой производной. Калибровка приборов проводилась по аскорбиновой кислоте (АК), и суммарная АОА водорастворимых субстратов (АСВ) выражалась в эквивалентном содержании АК в 1л сыворотки крови ($\mu mol/l$). Ошибка измерений этого параметра для первого прибора с учетом повторяемости результатов составила не более 15%, для второго не превышала 5%.

Результаты и обсуждение. На рис. 4 приведены кинетические ХЛ кривые, полученные при использовании обеих моделей окисления для проб пациентов: №1 — с самым низким значением АОА (АСВ), №2 — со средним, №3 — с самым высоким. Видно, что в первом случае (рис. 4, а) для разных проб характерно не только изменение латентного периода, но и значительное изменение интенсивности свечения, в то время как во второй модели (рис. 4, б) существенно изменяется только латентный период. Особенно это характерно для больных с повышенным содержанием билирубина (проба №3). Для первой модели окисления особенно сильно выражено влияние белковых составляющих плазмы крови, которые, в основном, и подавляют амплитуду ХЛ [2].

На рис. 5 представлена корреляционная зависимость суммарной АОА (АСВ) водорастворимых компонентов сыворотки крови исследованных пациентов, полученная с по-

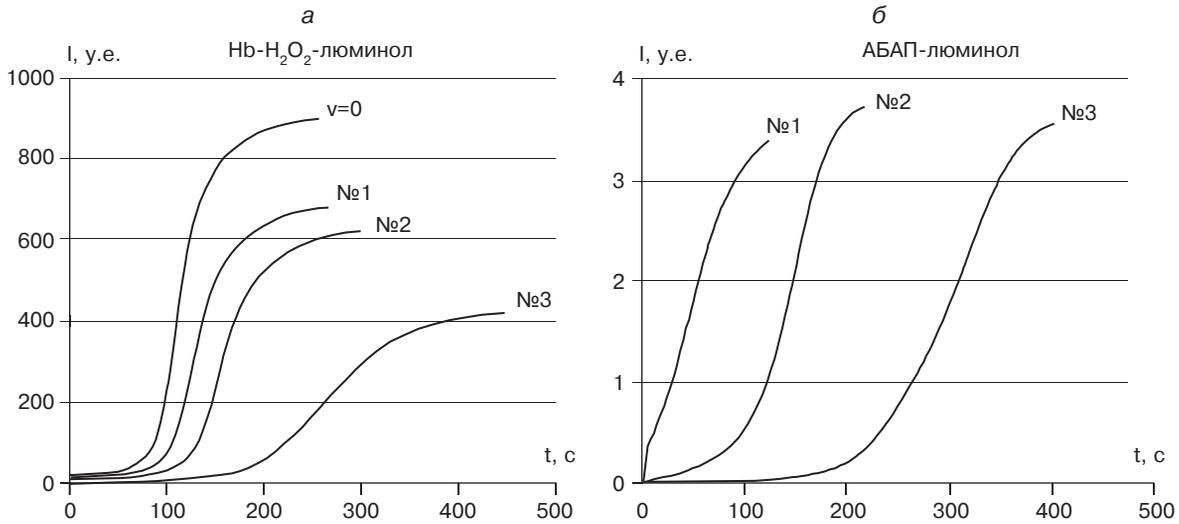


Рис. 4. Интенсивность ХЛ-свечения от времени для модели «Hb—H₂O₂—люминол» (а) и модели «АБАП—люминол» (б). Объем сыворотки крови $v = 2$ мкл (№1), 1,5 мкл (№2, 3) для (а) и $v = 2$ мкл (№1, 2, 3) для (б). №1 — проба с самым низким значением АСВ, полученная от донора, №2 и №3 — пробы реципиентов со средним и с самым высоким АСВ.

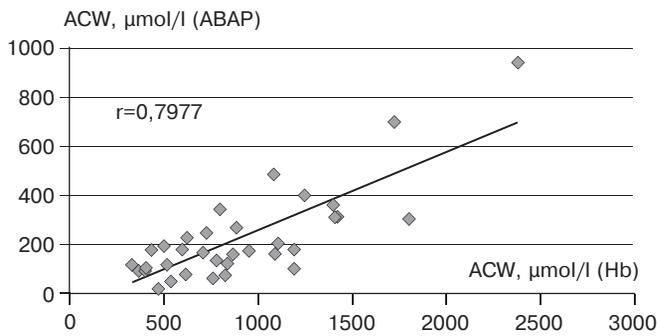


Рис. 5. Корреляция результатов измерений суммарной АОА сыворотки крови всех пациентов (АСВ — «integral antiradical capacity of water soluble compounds») для модели окисления с гемоглобином (АСВ, $\mu\text{mol/l}$ (Hb)) и с АБАП (АСВ, $\mu\text{mol/l}$ (АВАР)).

мощью обоих методов. Результаты демонстрируют большой разброс значений АСВ: от 300 до 2400 $\mu\text{mol/l}$ для первой модели, и от 15 до 940 $\mu\text{mol/l}$ для второй. Аномально высокие значения АСВ наблюдались у больных с повышенным содержанием в сыворотке общего билирубина (до 600 $\mu\text{mol/l}$ и выше, при норме 1,7—20,5 $\mu\text{mol/l}$). Корреляционный коэффициент для использованных моделей составил $r = 0,7977$. Относительно низкая корреляция связана, главным образом, с различием механизмов иницирования свободных радикалов и возможностью влияния некоторых компонентов сыворотки крови (особенно белковых) на скорость иницирования, что может значительно изменить наблюдаемый латентный период. Особенно это касается первой модели, в которой одним из радикалов-инициаторов является очень активный OH^\cdot -радикал, реагирующий со многими составляющими сыворотки

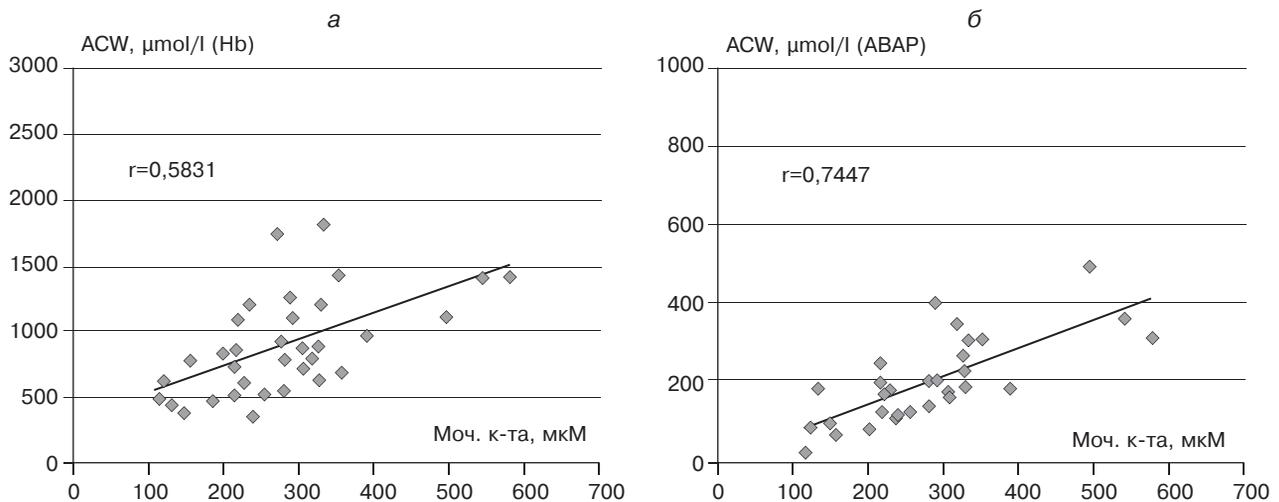


Рис. 6. Зависимости суммарной АОА (АСВ) сыворотки крови доноров и больных с патологией печени от содержания мочевой кислоты для модели окисления с Hb (а) и с АВАП (б). АСВ в $\mu\text{mol/l}$ АК.

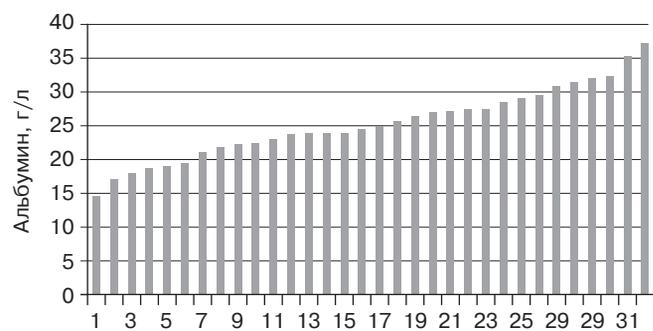


Рис. 7. Содержание альбумина в исследованных пробах сыворотки крови (биохимический анализ).

крови, в особенности с протеинами, которые «отвлекают» его от реакции с люминолом.

Подобные аргументы можно привести и для объяснения различий для двух моделей зависимостей АСВ от содержания в сыворотке крови мочевой кислоты (биохимический анализ) (рис. 6). Эквивалентное количество АК, определяемое латентным периодом при одном и том же количестве мочевой кислоты, в 3—4 раза больше в первой модели, чем во второй. Взаимодействуя с различными радикальными интермедиатами, мочевая кислота влияет в первой модели не только на латентный период, но в значительной степени и на интенсивность ХЛ. Корреляция АСВ с содержанием мочевой кислоты значительно хуже для первой модели ($r = 0,5831$), чем для второй ($r = 0,7447$). Значения подобных корреляционных коэффициентов, определенные с мочевой кислотой на модели с АБАП в других работах [16, 17], достаточно близки к коэффициентам, полученным в настоящих экспериментах. В [12, 18] на основании измерений плазмы крови 45 доноров показано, что АОА мочевой кислоты составляет 64% от общей АСВ, а белков — 5% (www.minilum.de).

Было показано, что в системах фотосенсибилизированной и термоиницированной ХЛ нативные аминокислоты и альбумин не обладают антирадикальной активностью, но приобретают её в процессе окислительной модификации [18]. В системе «Нв-Н₂O₂-люминол» на их долю приходится около 50% АСВ [2, 11]. Поэтому результаты измерений подвержены влиянию содержания альбумина в сыворотке, которое у печёночных больных занижено из-за нарушения синтезирующей способности печени (рис. 7). Среднее значение альбумина составило $25,21 \pm 5,33$ г/л (min = 14,4 г/л, max = 37,1 г/л) при норме 34—48 г/л. Как видно из диаграммы, разница значений альбумина у разных пациентов достигает 100% и выше, что является существенной помехой при определении параметра АСВ и ставит под сомнение его информативность. Единственной возможностью использовать метод «Нв-Н₂O₂-люминол» в клинических целях, по-видимому, является депотеинизация сыворотки крови. Однако при этом теряется возможность полной количественной оценки степени окислительного стресса, как это показано в системе ТХЛ путём сравнения антиокислительной защиты со степенью окислительного повреждения белков сыворотки крови [12].

Выводы. Таким образом, сравнительный анализ суммарной АОА водорастворимых компонентов сыворотки крови больных с патологией печени (АСВ), проведенный на разных моделях свободнорадикального окисления, показал значительное расхождение результатов из-

мерений и относительно низкую корреляцию ($r = 0,798$). Это связано, главным образом, с различием механизмов инициирования свободных радикалов и возможностью влияния некоторых компонентов сыворотки крови (особенно белковых) на процесс и скорость инициирования. Сильней это влияние проявляется в модели с «Нв-Н₂O₂-люминол», где одним из радикалов-инициаторов является активный ОН• радикал, который реагирует со многими составляющими сыворотки крови. Расхождение в результатах измерений заметнее для больных с аномально высоким содержанием некоторых компонентов сыворотки крови, которые по-разному ингибируют окисление люминола из-за побочных реакций. В этой связи, более предпочтительной для клинического применения с целью оценки АОА, как способности противостоять активным радикалам, следует считать модель окисления люминола с АБАП-инициатором.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 5—10, 12, 14—18 см. REFERENCES)

2. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любичский О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А.: Ингибирование сывороточными антиоксидантами окисления люминола в присутствии гемоглобина и пероксида водорода. *Вопросы медицинской химии*. 1997; 43(2): 87—93.
4. Якутова Э.Ш., Осипов А.Н., Костенко О.В. и др. Взаимодействие гипохлорита с оксигемоглобином приводит к освобождению железа в каталитически активной форме. *Биофизика*. 1992; 37(6): 1021—8.
11. Теселкин Ю.О. *Антиоксидантная активность сыворотки крови как критерий оценки функционального состояния антиоксидантной системы организма и эффективности применения экзогенных антиоксидантов*. Дисс. д-ра биол. наук. М.; 2003.
13. Русин Б.А. *Хемилюминесценция фталгидразидов*. Биохемилуминесценция. Труды московского общества испытателей природы. М.: Наука; 1983.

REFERENCES

1. Bartosz G. Total antioxidant capacity. *Adv. Clin. Chem.* 2003; 37: 219—92.
2. Teselkin Yu.O., Babenkova I.V., Lyubitsky O.B., Klebanov G.I., Vladimirov Yu.A. Inhibition by serum antioxidants oxidation of luminol in the presence of hydrogen peroxide and hemoglobin. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1997; 43(2): 87—93. (in Russian)
3. Puppo A., Halliwell B. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological Fenton reagent? *Biochem. J.* 1988; 249(1): 185—90.
4. Yakutova E.Sh., Osipov A.N., Kostenko O.V. Interaction of hypochlorite with oxyhemoglobin leads to release of iron in catalytically active form. *Biofizika*. 1992; 37(6): 1021—8. (in Russian)
5. Giulivi C., Davies K.J. A novel antioxidant role for hemoglobin. The comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin. *J. Biol. Chem.* 1990; 265(32): 19453—60.
6. Lissi E.A., Escobar J., Pascual C. Visible chemiluminescence associated with the reaction between methemoglobin or oxyhemoglobin with hydrogen peroxide. *Photochem. Photobiol.* 1994; 60(5): 405—11.
7. Everse J., Hsia N. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22(6): 1075—99.
8. Yamana T., Volkmer, Grishan M.B. The effects of sulfasalazine metabolites on hemoglobin-catalyzed lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 10(1): 41—9.
9. Wayner D.D.M., Burton G.W., Ingold K.U., Locke S.J. *FEBS Lett.* 1985; 187(1): 33.
10. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press. 1985; 1—332.

11. Teselkin Yu.O. *The antioxidant activity of blood serum as a criterion for evaluating the functional state of the antioxidant system and the efficacy of exogenous antioxidants. [Antioksidantnaya aktivnost' syvorotki krovi kak kriteriy otsenki funktsional'nogo sostoyaniya antioksidantnoy sistemy organizma i effektivnost' primeneniya ekzogennykh antioksidantov]*. Diss. Moscow; 2003. (in Russian)
12. Popov I., Lewin G., eds. *Antioxidative homeostasis, its evaluation by means of chemiluminescent methods in oxidative stress assessment*. Transworld Research Network. Kerala, 2008, 361—91.
13. Rusin B.A. *Chemiluminescence ftalgidrazidov. Biohemilyumi-cence. Proceedings of the Moscow Society of Naturalists. [Hemiluminestsentsiya ftalgidrazidov. Biohemiluminestsentsiya. Trudy moskovskogo obshchestva ishytateley prirody]*. Moscow: Nauka; 1983. (in Russian)
14. Merenyi G., Lind J., Eriksen T.E. Nucleophilic addition to diazaquinones. Formation and breakdown of tetrahedral intermediates in relation to luminol chemiluminescence. *J. Amer. Chem. Soc.* 1986; 108: 1716—26.
15. Niki E. *Free Radical Initiators as Source of Water- or Lipid-Soluble Peroxyl Radicals. Methods in enzymology*. L. Packer & A.N. Glazer, eds. New-York: Academic Press; 1990.
16. Uotila J.T., Kirkkola A.L., Rorarius M. et al. The total peroxy radical-trapping ability of plasma and cerebrospinal fluid in normal and pre-eclamptic parturients. *Free Radic. Biol. Med.* 1994; 16(5): 581—90.
17. Lissi E.A., Salim-Hanna M., Pascual C., Castillo M.D. Evaluation of total antioxidant potencial (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurement. *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 18(2): 153—8.
18. Popov I., Lewin G. Photochemiluminescent detection of antiradical activity. VI. Antioxidant characteristics of human blood plasma, low density lipoprotein, serum albumin and aminoacids during *in vitro* oxidation. *Luminescence*. 1999; 14: 169—74.

Поступила 01.02.17
Принята к печати 20.02.17

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616-092:612.112.3]-074

Потапенко В.Г.¹, Первакова М.Ю.², Лапин С.В.², Титов А.К.³, Суркова Е.А.², Петрова Н.Н.¹, Черноокая Н.Ю.¹, Миронова О.П.¹, Потихонова Н.А.⁴, Узденова Е.И.¹, Афанасьев Б.В.²

РОЛЬ ФРАКЦИОННОГО АНАЛИЗА ФЕРРИТИНА В ДИАГНОСТИКЕ ВТОРИЧНОГО ГЕМОФАГОЦИТАРНОГО СИНДРОМА

¹СПб ГБУЗ «Городская клиническая больница № 31», 197110, Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург;

³ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург;

⁴ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА РФ, 191024, Санкт-Петербург

Вторичный гемофагоцитарный синдром (ВГФС) представляет собой жизнеугрожающее состояние, характеризующееся неспецифическими проявлениями: системной воспалительной реакцией, цитопениями, поражением печени и высоким содержанием ферритина в сыворотке крови. Одним из проявлений ВГФС является снижение уровня гликозилированного ферритина (ГФ) в сыворотке крови, выраженного в процентах от общего уровня. Определение ГФ может быть использовано для дифференциального диагноза с другими схожими по клинической картине критическими состояниями, прежде всего, с септическим процессом. Целью данного исследования было определение клинической ценности измерения ГФ для диагностики и дифференциальной диагностики ВГФС. Проанализированы образцы сыворотки крови и клинические данные пациентов с диагнозом ВГФС ($n = 40$), тяжелого сепсиса ($n = 24$), цитолитического синдрома ($n = 36$) и здоровых доноров ($n = 40$). Определено общее содержание ферритина турбидиметрическим методом («BioSystems», Испания) и рассчитан ГФ. Для определения уровня ГФ гликозилированную фракцию ферритина осаждали с помощью конканавалина А, полимеризованного с сепарозой 4В («GE Healthcare», США). Нормальные значения ГФ составили 78,3—87,1%. При ВГФС снижение содержания ГФ составило $25,0 \pm 18,4\%$ и было значительно ниже, чем при сепсисе — $47,0 \pm 17,7\%$ ($p < 0,001$) и цитолитическом синдроме — $63,5 \pm 18,7\%$ ($p < 0,001$). По результатам ROC-анализа площадь под кривой ГФ была наибольшей по сравнению с другими маркерами ВГФС, в частности, общим ферритином, триглицеридами, фибриногеном. При уменьшении уровня ГФ ниже 30,4% используемый нами метод обеспечивает клиническую чувствительность 69%, специфичность 94,3% и точность 86,9% в проведении дифференциального диагноза ВГФС. При расчете абсолютного содержания негликозилированного ферритина было обнаружено, что его значения коррелируют с концентрацией триглицеридов, международным нормализованным отношением, аспаратаминотрансферазой, аланинаминотрансферазой и общим билирубином у больных ВГФС ($p < 0,05$). Таким образом, снижение уровня ГФ позволяет с высокой точностью диагностировать ВГФС.

Ключевые слова: гемофагоцитарный синдром; сепсис; ферритин; гиперферритинемия; гликозилированный ферритин.

Для корреспонденции: Первакова Маргарита Юрьевна, врач КЛД клинико-диагностической лаборатории НМЦ молекулярной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава РФ; e-mail: margaritalerner@gmail.com

Для цитирования: Потепенко В.Г., Первакова М.Ю., Лапин С.В., Титов А.К., Суркова Е.А., Петрова Н.Н., Черноокая Н.Ю., Миронова О.П., Потихонова Н.А., Узденова Е.И., Афанасьев Б.В. Роль фракционного анализа ферритина в диагностике вторичного гемофагоцитарного синдрома. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (1); 21-27. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-21-27>

Potapenko V.G.¹, Pervakova M.Yu.², Lapin S.V.², Titov A.K.³, Surkova E.A.², Petrova N.N.¹, Chernookaya N.Yu.¹, Mironova O.P.¹, Potikhonova N.A.⁴, Uzdenova E.I.¹, Afanasiev B.V.²

THE ROLE OF FRACTION ANALYSIS OF FERRITIN IN DIAGNOSTIC OF SECONDARY HEMOPHAGOCYTE SYNDROME

¹The state budget institution of health care "The municipal clinical hospital № 31" of the St. Petersburg health care department, 197110 St. Petersburg, Russia

²The Federal state budget educational institution of higher education "The Pavlov First Saint Petersburg State Medical University" of Minzdrav of Russia, 197022 St. Petersburg, Russia

³The Federal state budget scientific institution "The V.A. Almazov North-Western federal medical research center" of Minzdrav of Russia, St. Petersburg, Russia

⁴The Federal state budget scientific institution "The Russian research institute of hematology and transfusiology" of the Federal medical biological agency of Russia, 191025 St. Petersburg, Russia

The secondary hemophagocytic syndrome is a life-threatening condition characterized by non-specific manifestations: systemic inflammatory reaction, cytopenia, liver affection, high content of ferritin in blood serum. One of manifestations of secondary hemophagocytic syndrome is decreasing of level of glycosylated ferritin in blood serum expressed in percentage of total level. The detection of glycosylated ferritin can be applied for a differentiated diagnosis with clinically similar conditions, including septic process. The purpose of study was to determine clinical value of measurement of glycosylated ferritin for diagnostic and differentiated diagnosis of secondary hemophagocytic syndrome. The analysis was applied to samples of blood serum and clinical data of patients with diagnoses of secondary hemophagocytic syndrome (n=40), severe sepsis (n=24), cytolytic syndrome (n=36) and healthy donors (n=40). The total content of ferritin is established using turbidimetric technique ("BioSystems", Spain). The glycosylated ferritin was calculated. To determine level of glycosylated ferritin the glycosylated fraction of ferritin was precipitated using concanavalin A, polymerized with sepharose 4B ("GE Healthcare", USA). The normal values of glycosylated ferritin made up to 78.3%-87.1%. Under secondary hemophagocytic syndrome decreasing of content of glycosylated ferritin made up to 25.0 ± 18.7% and was significantly lower than under sepsis (47.0 ± 17.7%, p<0.001) and cytolytic syndrome (63.5% ± 18.7%, p<0.001). According the results of ROC-analysis, the area under curve was maximal as compared with other markers of secondary hemophagocytic syndrome, including total ferritin, triglycerides, fibrinogen. At decreasing of level of glycosylated ferritin lower than 30.4% the applied technique provides clinical sensitivity 69%, specificity 94.3%, accuracy 86.9% in applying differentiating diagnosis of secondary hemophagocytic syndrome. At calculation of absolute content of non-glycosylated ferritin it was discovered that its values correlate with concentration of triglycerides, international normalized ratio, aspartataminotransferase, alaninaminotransferase and total bilirubin in patients with secondary hemophagocytic syndrome (p<0.05). Therefore, decreasing of level of glycosylated ferritin permits to diagnose secondary hemophagocytic syndrome with higher accuracy.

Key words: hemophagocytic syndrome; sepsis; ferritin; hyperferritinemia; glycosylated ferritin

For citation: Potapenko V.G., Pervakova M.Yu., Lapin S.V., Titov A.K., Surkova E.A., Petrova N.N., Chernookaya N.Yu., Mironova O.P., Potikhonova N.A., Uzdenova E.I., Afanasiev B.V. The role of fraction analysis of ferritin in diagnostic of secondary hemophagocyte syndrome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63 (1): 21-27. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-21-27>

For correspondence: Pervakova M.Yu., physician of the clinical diagnostic laboratory of the research medical center of molecular medicine of the Federal state budget educational institution of higher education "The Pavlov First Saint Petersburg State Medical University". e-mail: margaritalerner@gmail.com

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study was implemented at the expense of grant of the Russian scientific foundation (project №16-15-00118).

Received 11.08.2017
Accepted 20.08.2017

Введение. Гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, или гемофагоцитарный синдром (ГФС), представляет собой тяжелое воспалительное состояние, характеризующееся лихорадкой, гепатомегалией, спленомегалией, панцитопенией, высоким уровнем сывороточного ферритина и избыточной доброкачественной пролиферацией активированных макрофагов. Патологической основой ГФС является дефект иммунной системы, который обуславливает неадекватную индукцию цитотоксических лимфоцитов под действием триггерного фактора, такого как инфекция. Результатом является бесконтрольная активация Т-лимфоцитов и макрофагов с последующим цитокиновым штормом.

Первичный ГФС является аутосомно-рецессивным генетическим заболеванием, которое обычно развивается в раннем детском возрасте. Вторичный ГФС (ВГФС) может развиваться в любом возрасте и является осложне-

нием тяжелых инфекций, ревматологических, онкологических заболеваний. В случаях, когда ВГФС возникает на фоне ревматического заболевания, его часто обозначают термином «синдром макрофагальной активации». Считается, что при синдроме макрофагальной активации более выражены коагулопатия, цитопения, гиперферритинемия, но терапевтический эффект стероидов выше. С другой стороны, ВГФС близко связан с другими состояниями, протекающими с повышением уровня ферритина сыворотки: септическим шоком, катастрофическим антифосфолипидным синдромом и болезнью Стилла, поэтому все эти заболевания часто объединяют термином «гиперферритинемический синдром».

Первичный ГФС проявляется анемией, высокой лихорадкой, цитолитическим или холестатическим синдромом, цитопенией, гипертриглицеридемией, что нашло отражение в критериях диагноза, разработанных

группой по изучению детского, генетического ГФС. Критерии ВГФС как отдельной нозологической единицы пока находятся в стадии разработки, поэтому во многих клиниках критерии первичного ГФС экстраполируют на ВГФС. В то же время у пациентов, получающих иммуносупрессивную, цитостатическую терапию, как отмечают многие исследователи, данные критерии неприменимы ввиду низкой чувствительности и специфичности. Проведение дифференциального диагноза с острым инфекционным процессом, особенно сепсисом, представляет собой сложную задачу, так как оба эти жизнеугрожающие состояния имеют схожие клинические проявления. В отличие от сепсиса при ГФС, необходимо использовать иммуносупрессивные препараты, в том числе этопозид, циклоспорин А, большие дозы препаратов иммуноглобулина человека. Глюкортикоидные гормоны при этом малоэффективны.

Ферритин является доступным лабораторным маркером ГФС и ассоциированных с ним заболеваний. В процессе секреции гепатоцитов молекула ферритина подвергается гликозилированию в эндоплазматической сети клетки, что увеличивает стабильность белка. Продуктами ферритина являются клетки Купфера, гепатоциты, макрофаги. В норме большая часть сывороточного ферритина гликозилирована. Негликозилированный ферритин находится в тканях, поэтому повышение сывороточного ферритина за счет негликозилированного служит признаком тканевого повреждения. Умеренное неспецифическое снижение уровня гликозилированного ферритина (ГФ) иногда наблюдается при инфекционных и аутоиммунных состояниях, хотя при ВГФС описано наиболее выраженное снижение гликозилированной фракции. Диапазон нормальных значений ГФ и степени его снижения при различных состояниях сильно различаются в разных исследованиях и требуют валидации. Концентрация общего ферритина, достаточная для диагностики ВГФС, до настоящего времени не определена, поэтому в качестве пороговой величины в литературе используют значения 1000, 4000 и 10 000 нг/мл. Даже в сочетании с другими критериями ВГФС специфичность и чувствительность гиперферритинемии как маркера не высоки, поскольку на начальном этапе развития ВГФС тканевое повреждение может быть незначительным.

Целью данного исследования было изучение клинической ценности определения ГФ для диагностики и дифференциальной диагностики ВГФС.

Материал и методы. Проведен анализ клинических данных и биоматериала от 64 пациентов (из них у 46 проспективно), получавших лечение в Городской клинической больнице № 31, Первом Санкт-Петербургском медицинском университете им. И.П. Павлова, Северо-Западном университете им. И.И. Мечникова, Городской больнице № 15, НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе. Проанализированы образцы сыворотки крови и клинические данные двух исследуемых групп пациентов с диагнозами ВГФС ($n = 40$) и тяжелого сепсиса ($n = 24$). Группы сравнения составили образцы сыворотки и клинические данные, полученные от здоровых доноров ($n = 40$) и пациентов с цитолитическим синдромом при поражениях гепатобилиарной системы ($n = 36$).

Первая группа пациентов с установленным диагнозом ВГФС включала 40 человек, медиана возраста 57 лет (8—74), 19 лиц мужского пола и 21 — женского. У всех больных выполнялись критерии НЛН-2004 для ГФС [6]. Клиническая картина включала лихорадку, устойчивую

к противомикробной терапии широкого спектра, цитопении, необъяснимые органические повреждения (легкие, ЦНС). У пациентов с инфекцией или коллагенозом пусковым фактором к развитию ВГФС послужило основное заболевание. У 11 пациентов отмечена хронологическая связь между дебютом/прогрессированием лимфомы и развитием ВГФС. У 23 пациентов точного провоцирующего фактора ВГФС не выявлено. Девятнадцати пациентам с ВГФС проводилась терапия, направленная на купирование воспалительного ответа. Использовали внутривенный иммуноглобулин, этопозид, циклоспорин А. Положительная клинико-лабораторная динамика достигнута у 16 (85%) пациентов.

Вторая группа пациентов с тяжелым сепсисом, инфекционно-токсическим шоком, полиорганной недостаточностью включала 15 мужчин и 9 женщин с медианой возраста 57,5 года (18—82). Диагноз «сепсис» устанавливали на основании критериев АССР/SCCM. У всех пациентов был верифицирован первичный очаг воспаления. Все получали антибактериальную, антимикотическую, противовирусную терапию эмпирически с последующей коррекцией по результатам бактериологических данных. У 20 пациентов сепсис развился на фоне глубокого иммунодефицита (гемобластозы после цитостатического лечения, ВИЧ-инфекция, хроническая инфекция вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ)), у 4 пациентов с предшествующей патологией иммунитета не было. Заболевания крови диагностированы на основании критериев ВОЗ. Хроническая ЭБВ-инфекция диагностирована на основании критериев М. Окапо [20].

В группу пациентов с цитолитическим синдромом входило 14 мужчин и 16 женщин, медиана возраста 54,5 года (20—85). У всех пациентов диагностированы воспалительные ($n = 15$), токсические ($n = 8$), аутоиммунные ($n = 7$) поражения гепатобилиарной системы.

Уровень аминотрансфераз — аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) у пациентов данной группы превышал нормальные значения не менее чем в 2 раза. Медиана АЛТ 152,7 МЕ/л (65—1008), АСТ — 146,8 МЕ/л (97,7—282,2). Активность ферментов определяли кинетическим методом на анализаторе AU-480 («Beckman Coulter», США).

Содержание триглицеридов и билирубина определяли колориметрическим методом («Beckman Coulter», США), фибриноген и международное нормализованное отношение (МНО) — клоттинговым методом на анализаторе Sysmex CA-600 (Япония).

В группе здоровых доноров проанализированы образцы сыворотки 40 человек: 18 мужчин и 22 женщины, медиана возраста 23,5 года (21—43).

Кровь на анализ ферритина в группе сепсиса взята в пределах суток до летального исхода. В группе ВГФС измерение уровня ферритина проводилось в день постановки диагноза, в контрольных группах (с цитолитическим синдромом и у доноров) — произвольно.

Концентрацию общего ферритина в сыворотке крови определяли методом иммунотурбидиметрии на анализаторе AU-480 («Beckman Coulter», США). Процент ГФ устанавливали методом, предложенным М. Wogwood и соавт. [21], основанным на определении содержания ферритина в парных образцах сыворотки крови. Для связывания гликозилированной фракции ферритина один из образцов сыворотки крови инкубировали в течение 2 ч с раствором конканавалина А, сорбированного на сепарозе 4В («GE Healthcare», США). Второй образец ин-

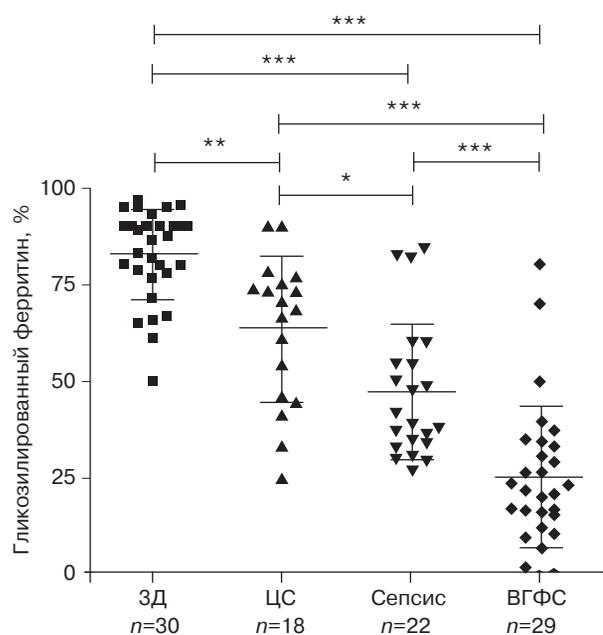


Рис. 1. Процент ГФ в разных группах больных, метод ANOVA с поправкой Бонферрони.

Достоверное различие: $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ЗД — здоровые доноры; ЦС — цитолитический синдром.

кубировали с раствором сефарозы 4В («GE Healthcare», США) для контроля неспецифического связывания. После этого образцы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин и определяли концентрации ферритина в надосадочной жидкости с помощью иммунотурбидиметрического метода (реактивы компании «Biosystems», Испания). Таким образом, концентрация ферритина, измеренная в первом образце, показывала уровень негликозилированной фракции, а во втором образце — общий уровень ферритина после обработки сефарозой. Процент гликозилирования определяли по формуле:

$$\text{ГФ} = \left[\frac{\text{ферритин общий} - \text{ферритин негликозилированный}}{\text{ферритин общий}} \right] \cdot 100\%$$

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0.

Результаты. В данной работе определяли степень снижения процента ГФ у больных ВГФС и трех групп сравнения: больных тяжелым сепсисом, цитолитическим синдромом и здоровых лиц. Среднее значение фракции ГФ у здоровых доноров составило $82,7 \pm 11,7\%$ (95% ДИ 78,3—87,1%). Во всех обследованных группах больных ГФ был достоверно ниже, чем у здоровых доноров, кроме того, группы достоверно различались. При цитолитическом синдроме средний уровень ГФ был снижен до $63,5 \pm 18,7\%$, при сепсисе — до $47 \pm 17,7\%$ и при ВГФС составил $25 \pm 18,4\%$. Значения ГФ в обследованных группах представлены на рис. 1.

У всех больных ВГФС и сепсисом регистрировалось повышение общего содержания сывороточного ферритина, медианы которого составили 7635 (2863—13559) нг/мл и 2163 (1095—3941) нг/мл соответственно при диапазоне нормальных значений 20—250 нг/мл. Медиана общего ферритина у пациентов с цитолитическим синдромом составила 199,5 нг/мл (42,7—353) и незначительно ($p > 0,05$) превышала значения, определенные у здоровых лиц: 47,25 нг/мл (21,25—120,5). Биохимический профиль пациентов с ВГФС и сепсисом приведен в табл. 1.

Для сравнения клиничко-лабораторных параметров тестов определения ГФ и общего содержания ферритина был использован ROC-анализ для групп пациентов с сепсисом и ВГФС (целевой диагноз — ВГФС) (рис. 2). На рис. 2 также приведены ROC-кривые для содержания триглицеридов и фибриногена, входящих в диагностические критерии ГФС, и АСТ, повышение которой является одним из критериальных маркеров синдрома макрофагальной активации. Площадь под кривой для ГФ составила 0,9229 и была значительно больше, чем для общего содержания ферритина — 0,7886. Площади под кривыми для значений триглицеридов, фибриногена и АСТ составили 0,8278, 0,586 и 0,5546 соответственно.

В табл. 2 приведен анализ тестов ГФ и общего ферритина согласно критериям достоверности при использовании различных пороговых значений.

При использовании значений ГФ 78,1% и общего ферритина 306 нг/мл, которые максимально приближены к диапазону значений здоровых доноров, специфичность обоих методов неудовлетворительна (40 и 0% соответственно).

При определении уровня ГФ использование порогового значения ниже 30,4% обеспечивает специфичность 94,3% и чувствительность 69%. Для содержания общего ферритина наибольшая специфичность достигается при значениях выше 7851 нг/мл, но при этом чувствительность метода снижается до менее 50%.

Кроме того, использование порогового значения ниже 30,4% дает наибольший индекс точности — 86,9% и отношение правдоподобия положительного результата 12,07.

В образцах контрольной группы и группы сравнения,

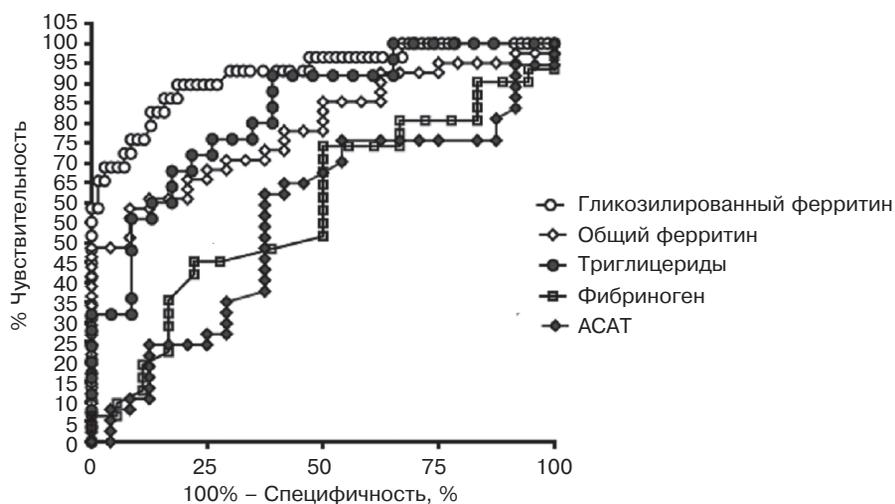


Рис. 2. Значение ГФ, концентрации ферритина, триглицеридов, фибриногена в дифференциальной диагностике ВГФС и сепсиса (целевой диагноз — ВГФС). ROC-анализ.

Таблица 1

Биохимический профиль пациентов с ВГФС и сепсисом

Показатель	Группа пациентов	Количество измерений	Медиана	25-й квартиль	75-й квартиль	Статистическая значимость	
Ферритин общий, нг/мл	ВГФС	41	7635	2863	13559	<i>p</i> < 0,01	
	Сепсис	24	2163	1094,7	3940,5		
Гликозилированный ферритин, %	ВГФС	31	21	10	33		
	Сепсис	22	40,1	33,7	55,9		
Негликозилированный ферритин, нг/мл	ВГФС	29	4869	2793	18003		
	Сепсис	22	1547	376	3062		
Триглицериды, ммоль/л	ВГФС	25	3,1	2,2	4,1		
	Сепсис	23	1,38	0,75	2,37		
МНО	ВГФС	36	2,37	1,02	2,03		
	Сепсис	22	1,73	1,47	2,4		
Фибриноген, г/л	ВГФС	31	2,8	0	13,7		
	Сепсис	19	3,9	0,68	9		
АЛТ, МЕ/л	ВГФС	38	55	22	134,5		Различия статистически незначимы
	Сепсис	24	82	15,6	56,7		
АСТ, МЕ/л	ВГФС	37	165	33,5	156		
	Сепсис	24	42,5	13,1	140,1		
Билирубин, мкмоль/л	ВГФС	38	19,5	12,7	59,9		
	Сепсис	23	30	19,4	89		

Таблица 2

Показатели достоверности тестов определения ГФ и общего ферритина при различных пороговых значениях для диагностики ВГФС

Показатель	Гликозилированный ферритин		Общий ферритин	
	< 78,1%	< 30,4%	> 306 нг/мл	> 7851 нг/мл
Чувствительность, %	96,6	69,0	97,6	48,8
Специфичность, %	40,0	94,3	0,0	95,8
Отношение правдоподобия положительного результата	1,61	12,07	0,98	11,71
Отношение правдоподобия отрицательного результата,	0,09	0,33	0,0	0,53
Прогностическая ценность положительного результата, %	40,0	83,3	62,5	95,2
Прогностическая ценность отрицательного результата, %	96,6	88,0	0,0	52,3
Индекс точности, %	56,6	86,9	61,5	66,2

в которых содержание общего ферритина было в пределах нормальных границ, его уровень не коррелировал со степенью гликозилирования. При выраженном повышении уровня общего ферритина наблюдалась достоверная отрицательная корреляция с процентом его гликозилированной фракции ($p = 0,0024$; $r = -0,4166$). Абсолютное содержание негликозилированной фракции ферритина с высокой степенью достоверности коррелировало с общим уровнем сывороточного ферритина как при ВГФС ($p < 0,0001$; $r = 0,9123$), так и при сепсисе ($p < 0,0001$; $r = 0,9356$). Результаты корреляционного анализа негликозилированной фракции и общего ферритина у больных ВГФС и сепсисом представлены на рис. 3.

Таким образом, максимальный уровень общего ферритина и минимальный процент гликозилированной фракции зарегистрирован у пациентов с ВГФС. Это свидетельствует о том, что гиперферритинемия при ВГФС являлась результатом селективного увеличения уровня тканевого негликозилированного ферритина.

В группе больных ВГФС абсолютные значения содержания негликозилированного ферритина положительно коррелировали с содержанием триглицеридов ($r = 0,5888$; $p = 0,0080$), МНО ($r = 0,4094$; $p = 0,0340$), АЛТ ($r = 0,6624$; $p = 0,0002$), АСТ ($r = 0,5210$; $p = 0,0076$) и общего билирубина ($r = 0,4145$; $p = 0,0353$) в группе больных ВГФС. В группе больных сепсисом взаимосвязь данных показателей отсутствовала.

Обсуждение. ВГФС и сепсис — состояния, похожие как клинически, так и по изменению биохимических показателей крови. Условиями благоприятного исхода при этих состояниях являются своевременно поставленный диагноз и начало терапии.

Гиперферритинемия имеет значение в дифференциальной диагностике, но повышение уровня сывороточного ферритина наблюдается и при перегрузке железом, инфекционных, аутоиммунных, редких наследственных заболеваниях (гемохроматозы I—III типа, болезнь Гоше и другие). Для дифференциального диагноза между

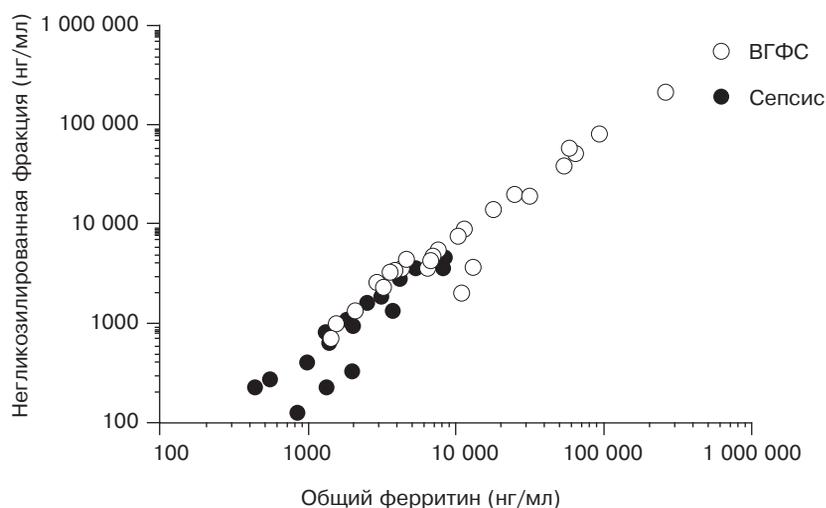


Рис. 3. Результаты корреляционного анализа негликозилированной фракции ферритина и общего ферритина для дифференциальной диагностики ВГФС и сепсиса.

ВГФС и другими гиперферритинемиями можно использовать тест определения процента ГФ сыворотки крови. Методика фракционного анализа воспроизводима в большинстве лабораторий, так как для определения ГФ достаточно общеклинического оборудования.

В данной работе определяли степень снижения ГФ у больных ВГФС, а также у больных тяжелым сепсисом, цитолитическим синдромом и у здоровых лиц. При этом ГФ оказался снижен по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров при всех исследуемых патологиях, однако был наименьшим в группе больных ВГФС: $25 \pm 18,4\%$, что было достоверно ниже по сравнению с количеством ГФ у больных сепсисом: $47 \pm 17,7\%$ ($p < 0,001$) и цитолитическим синдромом: $63,5 \pm 18,7\%$ ($p < 0,001$). Стоит отметить, что повышение фракции негликозилированного ферритина при цитолитическом синдроме имеет иной механизм, чем при ВГФС и сепсисе, и обусловлено потерей внутриклеточного ферритина при разрушении гепатоцитов, а не увеличением его синтеза.

Для определения пороговой величины ГФ, которая позволит отличить ВГФС от сепсиса, а также оценки диагностической значимости данного показателя по сравнению с другими маркерами ВГФС был использован ROC-анализ. Площадь под кривой для ГФ была наибольшей относительно уровней общего ферритина, триглицеридов, фибриногена и АСТ и составила $0,9229$. Оптимальное пороговое значение ГФ равнялось $30,4\%$, при этом специфичность теста была $94,3\%$, чувствительность — 69% . Использование точки отсечения ГФ $30,4\%$ дает наилучшие показатели достоверности: индекс точности — $86,9\%$, отношение правдоподобия положительного результата $12,07$.

При корреляционном анализе было установлено, что только в группе больных ВГФС абсолютные значения негликозилированной фракции ферритина коррелируют с концентрацией триглицеридов, МНО, АСТ, АЛТ и общего билирубина. Прямая взаимосвязь между патологически повышенной негликозилированной фракцией и лабораторными признаками печеночного повреждения согласуется с современными представлениями о ВГФС

как о состоянии, при котором главным органом-мишенью является печень.

Полученные нами данные позволяют заключить, что снижение уровня ГФ представляет собой доступный и информативный маркер для диагностики и дифференциальной диагностики ВГФС.

Благодарности. Авторы выражают благодарность за поддержку в проведении данной работы специалистам Городской клинической больницы № 31 (Санкт-Петербург) Н.В. Медведевой, А.В. Климович, И.А. Самородовой, В.В. Козыро, М.И. Набилковой, д-ру мед. наук Э.И. Подольцевой, канд. мед. наук И.А. Скороход, Д.А. Чигинской, В.В. Рябчиковой, М.Н. Смирновой, Н.В. Скоробогатовой, З.Р. Розовой, С.А. Трофимовой; Санкт-Петербургского НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе канд. мед. наук А.С. Повзуну, канд. мед. наук А.В. Рысеву, А.Ю. Каськову; Городской больницы № 15 (Санкт-Петербург) Е.В. Карягиной; Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова (Санкт-Петербург) Е.С. Павлюченко и Е.А. Кареву; Санкт-Петербургского государственного университета канд. мед. наук Т.Г. Кулибабе; Клинической ревматологической больницы № 25 (Санкт-Петербург) Ю.А. Нестерову; Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова (Москва) канд. мед. наук Г.О. Бронину.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №16-15-00118).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1—8, 10—26, 29, 30 см. REFERENCES)

- Потапенко В.Г., Потихонова Н.А., Байков В.В., Белогурова М.Б., Лисуков И.А., Климович А.В. и др. Вторичный гемофагоцитарный синдром у взрослых в клинической практике гематолога: обзор литературы и собственные данные. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика.* 2015; 8(2): 169—84.
- Тотоян А.А., Алешина Л.А., Марфичева Н.А., Зуева Е.Е., Лапин С.В. Медицинские стандарты иммунологического обследования больных с аллергическими нарушениями и нарушениями иммунной системы. *Медицинская иммунология.* 2002; 4(2): 379.
- Волкова О.Я., Смирнова В.И., Белан М.Л., Зыкова А.Б. Оценка возможности применения автоматического выделения ДНК для HLA-типирования молекулярно-биологическими методами. *Справочник заведующего КДЛ.* 2013; 10: 52—6.

REFERENCES

- Wang Z., Wang Y., Wang J., Feng C., Tian L., Wu L. Early diagnostic value of low percentage of glycosylated ferritin in secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Int. J. Hematol.* 2009; 90(4): 501—5.
- Madkaikar M., Shabrish S., Desai M. Current Updates on Classification, Diagnosis and Treatment of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (HLH). *Indian J. Pediatr.* 2016; 83(5): 434—43.
- Aricò M., Janka G., Fischer A., Henter J.I., Blanche S., Elinder G. Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Report of 122 children from the International Registry. FHL Study Group of the Histiocyte Society. *Leukemia.* 1996; 10(2): 197—203.

4. Chandrakasan S., Filipovich A.H. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: advances in pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J. Pediatr.* 2013; 163(5): 1253—9.
5. Rosário C., Zandman-Goddard G., Meyron-Holtz E.G., D’Cruz D.P., Shoenfeld Y. The hyperferritinemic syndrome: macrophage activation syndrome, Still’s disease, septic shock and catastrophic antiphospholipid syndrome. *BMC Med.* 2013; 11: 185.
6. Henter J.I., Horne A., Aricó M., Egeler R.M., Filipovich A.H., Imashuku S. et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr. Blood Cancer.* 2007; 48(2): 124—31.
7. Emmenegger U., Schaer D.J., Larroche C., Neftel K.A. Haemophagocytic syndromes in adults: current concepts and challenges ahead. *Swiss Med. Wkly.* 2005; 135(21—22): 299—314.
8. Buda P., Gietka P., Wieteska-Klimczak A., Ksiazek J. Secondary hemophagocytic syndromes. *Wiad Lek.* 2013; 66(2, Pt 2): 153—63.
9. Potapenko V.G., Potikhonova N.A., Baikov V.V., Belogurova M.B., Lisukov I.A., Klimovich A.V. et al. Secondary Hemophagocytic Syndrome in the Adult Patients. Literature Review and Authors’ Experience. *Klinicheskaya onkologiya. Fundamental’nye issledovaniya i klinicheskaya praktika.* 2015; 8(2): 169—84. (in Russian)
10. Worwood M., Cragg S.J., Williams A.M., Wagstaff M., Jacobs A. The clearance of 131I-human plasma ferritin in man. *Blood.* 1982; 60(4): 827—33.
11. Wang W., Knovich M.A., Coffman L.G., Torti F.M., Torti S.V. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1800(8): 760—9.
12. Fardet L., Coppo P., Kettaneh A., Dehoux M., Cabane J., Lambotte O. Low glycosylated ferritin, a good marker for the diagnosis of hemophagocytic syndrome. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(5): 1521—7.
13. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992; 101(6): 1644—55.
14. Dhote R., Simon J., Papo T., Detournay B., Sailler L., Andre M.H. et al. Reactive hemophagocytic syndrome in adult systemic disease: report of twenty-six cases and literature review. *Arthritis Rheum.* 2003; 49(5): 633—9.
15. Allen C.E., Yu X., Kozinetz C.A., McClain K.L. Highly elevated ferritin levels and the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr. Blood Cancer.* 2008; 50(6): 1227—35.
16. Han A.R., Lee H.R., Park B.B., Hwang I.G., Park S., Lee S.C. et al. Lymphoma-associated hemophagocytic syndrome: clinical features and treatment outcome. *Ann. Hematol.* 2007; 86(7): 493—8.
17. Saeed H., Woods R.R., Lester J., Herzig R., Gul Z., Monohan G. Evaluating the optimal serum ferritin level to identify hemophagocytic lymphohistiocytosis in the critical care setting. *Int. J. Hematol.* 2015; 102(2): 195—9.
18. Bone R.C., Sibbald W.J., Sprung C.L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest.* 1992; 101(6): 1481—3.
19. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H. et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* Lyon: IARC Press; 2008.
20. Okano M., Kawa K., Kimura H., Yachie A., Wakiguchi H., Maeda A. et al. Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection. *Am. J. Hematol.* 2005; 80(1): 64—9.
21. Worwood M., Cragg S.J., Wagstaff M., Jacobs A. Binding of human serum ferritin to concanavalin A. *Clin. Sci. (Lond).* 1979; 56(1): 83—7.
22. Castillo L., Carcillo J. Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis and severe sepsis/ systemic inflammatory response syndrome/ multiorgan dysfunction syndrome/macrophage activation syndrome share common intermediate phenotypes on a spectrum of inflammation. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2009; 10(3): 387—92.
23. Orbach H., Zandman-Goddard G., Amital H., Barak V., Szekanecz Z., Szucs G. et al. Novel biomarkers in autoimmune diseases: prolactin, ferritin, vitamin D, and TPA levels in autoimmune diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1109: 385—400.
24. Tripathy R., Panda A.K., Das B.K. Serum ferritin level correlates with SLEDAI scores and renal involvement in SLE. *Lupus.* 2015; 24(1): 82—9.
25. Jouanolle A.M., Gandon G., Jézéquel P., Blayau M., Campion M.L., Yaouanq J. et al. Haemochromatosis and HLA-H. *Nat Genet.* 1996; 14(3): 251—2.
26. Regenboog M., van Kuilenburg A.B., Verheij J., Swinkels D.W., Hol-lak C.E. Hyperferritinemia and iron metabolism in Gaucher disease: Potential pathophysiological implications. *Blood Rev.* 2016; 30(6): 431—7.
27. Totolian A.A., Aleshina L.A., Marficheva N.A., Zueva E.E., Lapin S.V. Meditsinskie standarty immunologicheskogo obsledovaniya bol’nykh s allergicheskimi narusheniyami i narusheniyami immunnoy sistemy. *Meditsinskaya immunologiya.* 2002; 4(2): 379. (in Russian)
28. Volkova O.Ya., Smirnova V.I., Belan M.L., Zykova A.B. Otsenka vozmozhnosti primeneniya avtomaticheskogo vydeleniya DNK dlya HLA-tipirovaniya molekulyarno-biologicheskimi metodami. *Sprav-ochnik zaveduyushchego KDL.* 2013. 10: 52—6. (in Russian)
29. Chapman R.W., Gorman A., Laulicht M., Hussain M.A., Sherlock S., Hoffbrand A.V. Binding of serum ferritin to concanavalin A in patients with iron overload and with chronic liver disease. *J. Clin. Pathol.* 1982; 35(5): 481—6.
30. Konijn A.M., Kaplan R., Or R., Matzner Y. Glycosylated serum ferritin in patients with hematological malignancies before and after bone marrow transplantation. *Leuk. Lymphoma.* 1992; 7(1—2): 151—6.

Поступила 11.08.17

Принята к печати 20.08.17

©КАРАМОВА Л.М., ВЛАСОВА Н.В., 2018

УДК 616.15-02:613.63:074

Карамова Л.М., Власова Н.В.

ДЕСЯТИЛЕТНЯЯ ГЕМОГРАММА РАБОТНИКОВ ПРОИЗВОДСТВА ФТАЛАТОВ

ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» Минздрава РФ, 450106, Уфа, Россия

Представлена 10-летняя динамика гемограммы рабочих, начавших свою трудовую деятельность в производствах терефталевой кислоты, очищенной терефталевой кислоты и полиэтилентерефталата. Выявлены стажевая гемодинамика, характеризующая гематологические сдвиги — снижение содержания элементов красной крови, адаптационно-компенсаторные реакции белой крови, повышение сенсibilизации и аллергизации.

Ключевые слова: фталаты; стажевая гемограмма; лабораторная диагностика.

Для цитирования: Карамова Л.М., Власова Н.В. Десятилетняя гемограмма работников производства фталатов. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (1): 28-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-28-31>

Karamova L.M., Vlasova N.V.

THE DECADE HEMOGRAM OF WORKERS OF PHTHALATE INDUSTRY

The Federal budget institution of science "The Ufa research institute of occupational medicine and human ecology" of Minzdrav of Russia, 450106 Ufa, Russia

The article presents decade dynamics of hemogram of workers started their labor activity in factories of terephthalic acid, purified terephthalic acid and polyethylene terephthalate. The study established a hemodynamics depended on career pattern, characterizing hematologic shifts i.e. decreasing of content of red blood elements, adaptative compensatory reactions of white blood, increasing of sensitization and allergizing.

Key words: phthalates; hemogram depending on career pattern; laboratory diagnostic.

For citation: Karamova L.M., Vlasova N.V. The decade hemogram of workers of phthalate industry. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63 (1): 28-31. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-28-31>

For correspondence: Vlasova N.V., candidate of biological sciences, biologist of the clinical biochemical laboratory of the Federal budget institution of science "The Ufa research institute of occupational medicine and human ecology". e-mail: vnv.vlasova@yandex.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 07.08.2017
Accepted 15.08.2017

Введение. Ранее нами (в 2010 г.) было выполнено комплексное клиничко-функциональное обследование состояния здоровья работников мужского пола впервые открывшегося в 2005 г. в стране производства фталатов — ОАО «ПОЛИЭФ». Для дифференциальной оценки влияния фталатов на организм рабочие, начавшие свою трудовую деятельность на этом предприятии, были выделены в отдельную группу. Результаты этих исследований показали, что состояние крови за 5 лет работы на предприятии, где ведущим гигиеническим фактором является повышение уровня терефталевой кислоты до 1,5—2,8 ПДК и полиэтилентерефталата — до 1,25—1,3 ПДК, характеризуется признаками раздражения костного мозга, сдвига лейкоцитарной формулы влево, сенсibilизации организма. Материалы исследований нами опубликованы [1,2]. Настоящее исследование выполнено на этом же предприятии через 10 лет его работы; обследовали рабочих, которые работали здесь с первого года запуска предприятия с целью проследить динамику гемограммы при временном влиянии фталатов.

Фталаты относятся к веществам, представляющим потенциальный риск для здоровья человека. Фталаты

— это вещества, широко применяющиеся в качестве пластификаторов при производстве полимерных материалов различного назначения, синтетических и натуральных каучуков. Фталаты включены в список стойких органических загрязнителей. Сведений о действии на организм в литературе немного и касаются они в основном экспериментальных работ, в которых есть указания на негативное воздействие на кровь [3—5]. Данные о ранней клиничко-лабораторной диагностике заболеваний, связанных с воздействием фталатов на организм человека, крайне ограничены. Выявлено аллергенное свойство фталатов [6].

Цель работы — выявить особенности гематологических показателей при воздействии фталатов на работников полиэфирного комплекса в зависимости от стажа работы на предприятии.

Материал и методы. Нами было проведено комплексное клиничко-функциональное обследование работников ОАО «ПОЛИЭФ». Комплексное медицинское обследование рабочих показало, что из числа начавших свою трудовую деятельность аппаратчиков на этом производстве до настоящего времени продолжают работать 75%. За последние 5 лет впервые на работу поступили еще 19 молодых аппаратчиков. Всего в группу наблюдения вошли 87 аппаратчиков. Средний возраст рабочих $26,0 \pm 2,3$ года. Гематологическое исследование вклю-

Для корреспонденции: Власова Наталья Викторовна, канд. биол. наук, биолог клиничко-биохимической лаборатории; e-mail: vnv.vlasova@yandex.ru

Таблица 1

Частота гематологических и некоторых биохимических показателей (в %) в динамике стажевых лет рабочих производства фталатов

Показатели	Отклонение показателей	0—10 лет			
		0—5 лет	6—10 лет		В среднем
			2010—2014	2005—2009	
Гемоглобин, г/л	> 160	10,4 ± 5,6	9,8 ± 8,6	5,8 ± 2,5	13,7 ± 3,0
	< 110	15,8 ± 7,6	14,8 ± 10,3	39,7 ± 10,6	31,0 ± 3,3
Эритроциты, • 10 ¹² /л	> 5,1	36,8 ± 6,4	20,6 ± 11,7	10,3 ± 3,2	16,0 ± 3,8
	< 4,0	12,3 ± 8,9	3,3 ± 5,2	23,5 ± 3,6	16,6 ± 3,4
Лейкоциты, • 10 ⁹ /л	> 8,8	10,8 ± 5,7	10,4 ± 5,6	29,8 ± 4,9	20,4 ± 2,7
	< 4,0	2,0 ± 0,9	5,0 ± 2,3	15,5 ± 3,9	8,5 ± 2,8
Сегментоядерные, %	> 70	13,1 ± 9,7	13,1 ± 9,7	16,1 ± 5,0	8,8 ± 3,6
Эозинофилы, %	> 5	10,4 ± 5,6	3,3 ± 5,2	39,7 ± 15,5	37,9 ± 8,5
Моноциты, %	> 12	—	—	2,0 ± 1,2	2,0 ± 0,4
Лимфоциты, %	> 40	28,4 ± 11,2	26,4 ± 12,7	44,6 ± 18,7	36 ± 9,7
СОЭ, мм/ч	> 10	3,5 ± 1,6	—	—	—
Холестерин, ммоль/л	> 6,2	14,5 ± 4,5	14,0 ± 4,5	17,6 ± 5,3	14,5 ± 4,5
Глюкоза, ммоль/л	> 6,1	0,5 ± 0,09	10,0 ± 3,9	2,9 ± 0,6	0,5 ± 0,09
ИА	0,6—1,2	31,6 ± 10,9	26,2 ± 5,7	44,0 ± 7,1	35,1 ± 6,4
IgE, МЕ/мл	> 100,0	—	21,3 ± 5,3	46,0 ± 7,1	33,6 ± 6,2

чало определение содержания гемоглобина, эритроцитов, ретикулоцитов и лейкоцитарной формулы. Подсчёт форменных элементов проводился на гематологическом анализаторе «Systmex КХ-21» согласно общепринятым методикам. Биохимическое обследование включало

определение в сыворотке крови содержания глюкозы и общего холестерина. Методики выполнялись на полуавтоматическом биохимическом анализаторе «Stat Fax» с использованием реагентов фирмы «Вектор Бест» (Новосибирск). Проведены исследования показателя гиперчувствительности (содержание иммуноглобулина (Ig) Е общего) и индекса аллергизации (ИА). Результаты исследований обрабатывались с использованием программного пакета прикладных программ статистического анализа «Statistika for Windows» с определением средних величин, показателя достоверности по коэффициенту Стьюдента (*t*) и уровня значимости (*p*).

Результаты и обсуждение. Состояние периферической крови является интегральным показателем многосистемной перестройки организма и отражает происходящие в нём физиологические и ранние патологические изменения. Анализ результатов гематологических исследований выявил определенную закономерность и однонаправленность сдвигов. Средние значения показателей гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, СОЭ находились в пределах физиологических колебаний. Однако при персональном анализе крови выявлены отклонения от нормы, имеющие свои стажевые особенности (табл. 1). Так, повышенный уровень (более 160 г/л) гемоглобина в первые (0—5 лет) годы работы отмечается у каждого десятого (9,8 ± 8,6%) обследованного, в последующие 6—10

Таблица 2

Частота (в %) гематологических отклонений у рабочих различных производств в последующие 6—10 лет работы

Показатели	Отклонение показателей	ТФК	оТФК	ПЭТФ	6 лет	7 лет	8 лет	9 лет	10 лет	6—10 лет
Гемоглобин, г/л	> 160	4,0 ± 2,2	—	7,1 ± 2,5	10,0 ± 3,7	4,5 ± 1,2	10,0 ± 2,6	8,2 ± 2,2	—	5,8 ± 2,5
	< 110	41,8 ± 9,1	31,5 ± 7,7	40,0 ± 5,4	—	40,0 ± 2,2	57,2 ± 5,8	43,0 ± 6,6	52,6 ± 7,6	39,7 ± 15,5
Эритроциты, • 10 ¹² /л	> 5,1	17,6 ± 4,4	—	7,1 ± 3,3	20,0 ± 5,1	18,1 ± 1,3	7,1 ± 2,5	—	—	—
	< 4,0	26,4 ± 7,8	5,2 ± 1,2	13,5 ± 3,0	12,6 ± 9,2	13,7 ± 3,7	17,1 ± 10,8	28,5 ± 3,3	29,8 ± 3,7	23,5 ± 5,6
Лейкоциты, • 10 ⁹ /л	> 8,8	29,4 ± 4,5	15,7 ± 2,2	40,0 ± 3,2	33,3 ± 3,7	22,7 ± 1,2	28,5 ± 1,8	24,2 ± 2,2	25,0 ± 2,3	29,8 ± 6,9
	< 4,0	12,6 ± 2,7	21,0 ± 2,7*	14,5 ± 2,8	6,7 ± 2,2	8,8 ± 0,5	14,2 ± 3,0	28,5 ± 3,4	20,0 ± 3,4	15,5 ± 3,3
Сегментоядерные, %	> 70	23,5 ± 5,4	—	4,0 ± 3,7	10,0 ± 6,0	16,6 ± 3,4	18,2 ± 3,7	15,5 ± 6,3	8,0 ± 2,2	16,1 ± 5,0
Эозинофилы, %	> 5	32,3 ± 3,4	42,1 ± 6,6	33,3 ± 9,1	30,0 ± 10,0	45,6 ± 17,8	42,8 ± 17,5	22,2 ± 11,1	46,6 ± 19,2	39,7 ± 15,5
Моноциты, %	> 12	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Лимфоциты, %	> 40	44,2 ± 16,2*	10,6 ± 4,5	—	72,0 ± 21,2	55,2 ± 14,5	57,1 ± 14,2	43,5 ± 14,8	20,0 ± 15,1	44,6 ± 19,7
СОЭ, мм/ч	> 10	4,0 ± 4,0	—	6,6 ± 2,2	2,0 ± 1,8	2,0 ± 0,6	4,4 ± 4,0	—	—	2,0 ± 1,2
IgE, МЕ/мл	> 100,0	45,5 ± 15,7	45,0 ± 11,4	43,7 ± 12,8	25,0 ± 25,0	47,4 ± 11,7	40,0 ± 16,3	—	53,8 ± 14,4	44,7 ± 7,3
ИА	> 1,2	54,5 ± 15,7	45,0 ± 11,4	37,5 ± 12,5	50,0 ± 28,8	31,6 ± 10,9	50,0 ± 16,67	100,0	46,2 ± 14,4	44,0 ± 7,1

Примечание. * — достоверность различий с группой сравнения (*p* < 0,05).

лет — у $5,8 \pm 2,5\%$. И, наоборот, число рабочих с низким (менее 110 г/л) содержанием гемоглобина с годами возрастает с $14,8 \pm 10,3$ до $39,7 \pm 10,6\%$.

Такая же закономерность наблюдается в динамике содержания эритроцитов. В первые 5 лет работы количество эритроцитов превышает $5,0 \cdot 10^{12}/л$ у $20,6—36,8\%$ рабочих, с увеличением стажа таких рабочих остается $10,3 \pm 3,2\%$, а количество рабочих с эритропенией по мере увеличения стажа работы возрастает с $3,3 \pm 5,2$ до $23,5 \pm 3,6\%$. Следует отметить, что признаки анемии четко проявляются с 8-го года работы на предприятии; у каждого третьего рабочего с 10-летним стажем меньше нормы количество эритроцитов ($29,8 \pm 3,7\%$) и у каждого второго — гемоглобина ($52,6 \pm 7,6\%$) (табл. 2). Больше таких рабочих на производстве очищенной терефталевой кислоты (оТФК), где самые высокие концентрации терефталевой кислоты (ТФК). Токсическое избирательное влияние фталатов на систему красной крови, раздражение костного мозга, формирование анемии доказано многими экспериментальными и клиническими данными [5, 7—10]. Эритроцитоз и гемоглобинемия в первые годы работы, видимо, следует рассматривать как компенсаторно-адаптационную реакцию на раздражение костного мозга с последующим угнетением гемопоэза и формированием анемии.

Со стороны лейкоцитарной формулы выявлены изменения в виде нейтрофильного лейкоцитоза с левым ядерным сдвигом, который постепенно нарастает с увеличением стажа (см. табл. 1, 2). В среднем лейкоцитоз зарегистрирован у каждого пятого ($20,4 \pm 2,7\%$), но до пяти лет работы — у каждого десятого, более пяти лет — у каждого третьего рабочего ($29,8 \pm 6,9\%$). Следует отметить, что при стаже более пяти лет постепенно увеличивается число рабочих с лейкопенией и к 10 годам работы их уже $20 \pm 3,4\%$. Больше всего рабочих с лейкоцитозом выявлено на производстве полиэтилентерефталата (ПЭТФ), а с лейкопенией — на производстве оТФК. У $36,6 \pm 9,7\%$ повышено количество лимфоцитов. Стажевая динамика их особенная. Лимфоцитоз проявляется на третьем году работы в производстве ТФК, затем количество их нормализуется и довольно заметно снова возрастает в более поздние сроки. Проявления лейкоцитоза и лейкопении, лимфоцитоза под влиянием фталатов также согласуются с данными литературы [5].

Известно, что фталаты обладают аллергическими свойствами. Эозинофилия выявлена у $37,9 \pm 8,9\%$ обследованных. Она проявляется на третьем году работы во всех производствах в пределах $3,3—10,4\%$ случаев (см. табл. 1). Однако при стаже более пяти лет доля таких рабочих сильно увеличивается и к 10 годам эозинофилия установлена у $46,6 \pm 19,2\%$ рабочих. Повышенное количество эозинофилов до $5—13\%$ диагностировано в производствах ПЭТФ ($33,3 \pm 9,1\%$) и оТФК ($42,1 \pm 6,6\%$). Столь заметная эозинофилия, проявляющаяся на ранних стадиях контакта и нарастающая со стажем, подтверждает аллергенные свойства фталатов. Об этом же свидетельствуют анализы IgE и ИА. Высокие концентрации IgE выявлены у рабочих всех цехов производства (см. табл. 1, 2). Это согласуется с данными литературы о наличии аллергизирующего действия фталатов [1, 11, 12]. С годами работы удельный вес работников с повышенными показателями аллергизации увеличивается до $26,2—44,0\%$, что указывает на серьезную сенсibilизацию организма, вероятность формирования в будущем аутоиммунных процессов и клинических форм патологий.

Результаты прежних наших исследований [1, 2], проведенных у когорты рабочих с 0—5-летним первичным стажем работы на этом предприятии, подтвердились и в настоящей работе (см. табл. 1) для вновь поступивших на работу в последующие 5 лет. Выявленные тенденции в картине крови рабочих со стажем от 0 до 5 лет в обоих исследованиях практически одинаковы и их можно рассматривать как индивидуальную ответную реакцию организма работающих на вредное воздействие производственных факторов, которые характеризуются раздражением костного мозга, анемическим синдромом, нейтрофильным лейкоцитозом, эозинофилией и согласуется с мнением других авторов.

Выводы. 1. Выявлены изменения со стороны красной крови, нарастающие с увеличением стажа работы на производстве. Раздражение кроветворной системы является патогенетической основой формирования в будущем клинической формы анемии.

2. Изменения белой крови в виде нейтрофильного лейкоцитоза с левым ядерным сдвигом можно рассматривать как компенсаторно-адаптационную реакцию организма на контакт с условиями труда на производстве фталатов.

3. Нарастающие со стажем эозинофилия, уровень IgE, ИА указывают на сенсibilизацию и аллергизацию организма, которая является патогенетической основой для развития патологии в различных системах организма.

4. Необходимо рекомендовать динамическое наблюдение за состоянием здоровья, уделить целенаправленное внимание показателям гемограммы с целью своевременного выявления аллергизации и развития заболеваний системы крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карамова Л.М., Власова Н.В. Скрининговая лабораторная диагностика гематологических изменений у работников полиэфирного комплекса. *Здоровье населения и среда обитания*. 2014; 3: 21-3.
2. Карамова Л.М., Власова Н.В. «Компенсаторно-адаптационные реакции системы крови у рабочих производства фталатов». *Актуальные проблемы управления здоровьем населения. Сборник научных трудов. Выпуск 7*. Нижний Новгород: ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России»; 2014.
3. Антонюк О.К. К вопросу о токсичности эфиров фталевой кислоты. *Гигиена применения полимерных материалов и изделий из них*. Медведь Л.И., ред. Киев: ВНИИГИНТОКС; 1969; 1: 302—6.
4. Антонюк О.К., Алдырева М.В. Обоснование предельно допустимой концентрации дибутилфталата в воздухе производственных помещений. *Гигиена труда и профессиональные заболевания*. 1973; 8: 26—30.
5. Милков Л.Е., Алдырева М.В., Сайтанов А.О., Смирнова М.И., Комарова А.А., Ожиганова В.Н. и др. В клинике хронической интоксикации фталатными пластификаторами. *Первая Всесоюзная конференция по ранней диагностике, лечению, экспертизе трудоспособности и профилактике профессиональных заболеваний химической этиологии*. М.: 1971; 120—3.
6. Алдырева М.В., Гафуров Ш.А. *Гигиена труда в производстве искусственных кож*. М.: Медицина; 1980.
7. Карамова Л.М., Бакиров А.Б. *Заболевания, связанные с условиями труда в нефтеперерабатывающей, нефтехимической, химической промышленности: монография*. Уфа: КП РБ «Мир печати»; 2011.
8. Таушан М.Д., Горячковский В.С. Микроинтоксикации в производстве поливинилхлоридных пленок. *Врачебное дело*. 1976; 8: 128—30.

9. Тимофиевская Л.А. *Эфиры о-фталевой кислоты*. Измеров Н.Ф., ред. Вып. 23. М.: Центр международных проектов ГКНТ; 1983.
 10. Lind L. Can persistent organic pollutants and plastic-associated chemicals cause cardiovascular disease? *Journal of Internal Medicine*. 2012; 271(6): 537—53.
 11. Валеева Э.Т., Бакиров А.Б., Каримова Л.К., Галимова Р.Р. Профессиональные заболевания, развивающиеся у работников нефтехимических производств современных условиях. *Экология человека*. 2010; 3: 19—23.
 12. Тимашева Г.В., Валеева О.В. Диагностическая значимость биохимических и гематологических изменений у работников нефтехимической промышленности. *Медицина труда и промышленная экология*. 2009; 11: 20—3.
 1. Karamova L.M., Vlasova N.V. Screening laboratory diagnosis of hematological changes in workers polyether complex. *Zdorov'ye naseleniya i sreda obitaniya*. 2014; 3: 21—3. (in Russian)
 2. Karamova L.M., Vlasova N.V. «Compensatory-adaptive reactions of the blood system in phthalate production workers» [*Aktual'nyye problemy upravleniya zdorov'iem naseleniya. Sbornik nauchnykh trudov. Vypusk 7*]. Nizhniy Novgorod: «Nizhegorodskaya gosudarstvennaya meditsinskaya akademiya Minzdrava Rossii»; 2014. (in Russian)
 3. Antonyuk D.C. *On the question of the toxicity of phthalic acid esters. Gigiyena primeneniya polimernykh materialov i izdeliy iz nikh*. Medved. L.I., ed. Kiev: VNIIGINTOKS; 1969. (in Russian)
 4. Antonyuk O.K., Aldyreva M.V. Justification maximum allowable concentration dibutyl phthalate in the air of industrial premises. *Gigiyena truda i professional'nye zabolovaniya*. 1973; 8: 26—30. (in Russian)
 5. Milken L.E., Aldyreva M.V., Saytanov A.O., Smirnova M.I., Komarova A.A., Ozhiganova V.N. et al. The clinic chronic intoxication phthalate plasticizers. *Pervaya Vsesoyuznaya konferentsiya po ranney diagnostike, lecheniyu, ekspertize trudospobnosti i profilaktike professional'nykh zabolovaniy khimicheskoy etiologii*. Moscow; 1971. (in Russian)
 6. Aldyreva M.V., Gafurov Sh.A. *Occupational hygiene in the production of artificial leather [Gigiyena truda v proizvodstve iskusstvennykh kozh]*. Moscow: Meditsina; 1980. (in Russian)
 7. Karamova L.M., Bakirov A.B. *Diseases associated with the working conditions in the refining, petrochemical, chemical industry [Zabolovaniya, svyazannye s usloviyami truda v neftepererabatyvayushey, neftechimicheskoy, chimicheskoy promyshlennosti]. Monografiya*. Ufa: KP RB «Mir pechati»; 2011. (in Russian)
 8. Taushan M.D. Microintoxications in the production of polyvinyl chloride films. *Vrachebnoye delo*. 1976; 8: 128—30. (in Russian)
 9. Timofievskaya L.A. *Esters of phthalic acid [Efiroy o-ftalevoy kisloty]*. Izmerov N.F., ed. Vol. 23. Moscow: Tsentr mezhdunarodnykh proektov; 1983. (in Russian)
 10. Lind L. Can persistent organic pollutants and plastic-associated chemicals cause cardiovascular disease? *Journal of Internal Medicine*. 2012; 271(6): 537—53.
 11. Valeyeva E.T., Bakirov A.B., Karimova L.K., Galimova R.R. Occupational diseases and intoxications in workers of modern petrochemical industries. *Ekologiya cheloveka*. 2010; 3: 19—23. (in Russian)
 12. Timasheva G.V., Valeyeva O.V. Diagnostic value of biochemic and hematologic changes in petrochemical industry workers. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2009; 11: 20—3. (in Russian)
- Поступила 07.08.17
Принята к печати 15.08.17

REFERENCES

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.314.17-002.2-06:616-002.311-078.33

Агарков Н.М.¹, Ткаченко П.В.², Замулин Д.О.¹, Аксёнов В.В.¹, Гонтарева И.С.³, Кича Д.И.⁴, Мишенин М.О.¹

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РАЗВИТИЯ ПЕРИАПИКАЛЬНОГО АБСЦЕССА ХРОНИЧЕСКОМ ПЕРИОДОНТИТЕ У ДЕТЕЙ ПО ПАРАМЕТРАМ КРОВИ И КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА

¹ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет» 305040, Курск;

²ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», 305041, Курск;

³ФГАОУ ВПО НИУ «Белгородский государственный университет», 308015, Белгород;

⁴ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва, Российская Федерация

Хронический периодонтит у детей при неадекватной консервативной терапии часто осложняется развитием периапикального абсцесса. Однако прогностические модели для определения вероятности его развития отсутствуют. Цель исследования — разработать регрессионные модели для прогнозирования периапикального абсцесса при хроническом периодонтите у детей по показателям периферической крови и системного клеточного иммунитета. Хронический периодонтит, осложненный периапикальным абсцессом, изучен у 120 детей в возрасте от 8 до 15 лет. Для прогнозирования методом пошаговой регрессии периапикального абсцесса использованы параметры крови и системного клеточного иммунитета. Созданы математические модели для прогнозирования периапикального абсцесса у детей с хроническим периодонтитом по показателям периферической крови и системного клеточного иммунитета, позволяющие с необходимым качеством прогнозировать развитие данного осложнения. Для прогнозирования периапикального абсцесса необходимо использовать данные модели, абсолютное количество лимфоцитов, процент палочкоядерных нейтрофилов, СОЭ, абсолютное число в крови Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-супрессоров и относительное содержание Т-супрессоров.

Ключевые слова: хронический периодонтит у детей; периапикальный абсцесс; прогнозирование; метод пошаговой регрессии.

Для корреспонденции: Агарков Николай Михайлович, д-р мед. наук, проф. каф. биомедицинской инженерии Юго-Западного государственного университета; e-mail: vitalaxen@mail.ru

Для цитирования: Агарков Н.М., Ткаченко П.В., Замулин Д.О., Аксёнов В.В., Гонтарева И.С., Кича Д.И., Мишенин М.О. Прогнозирование развития периапикального абсцесса при хроническом периодонтите у детей по параметрам крови и клеточного иммунитета. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018;63(1): 31-34. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-31-34>

Agarkov N.M.I, Tkachenko P.V.2, Zamulin D.O.I, Aksenov V.V.I, Gontareva I.S.3, Kicha D.I.4, Mishenin M.O.I

THE PROGNOSTICATION OF DEVELOPMENT OF PERI-APICAL ABSCESS UNDER CHRONIC PERIODONTITIS BY BLOOD PARAMETERS AND CELL IMMUNITY IN CHILDREN

¹The Federal state budget educational institution of higher education "The South-Western state university", 305040 Kursk, Russia

²The Federal state budget educational institution of higher education "The Kursk state medical university", 3050412 Kursk, Russia

³The Federal state autonomous educational institution of higher education research university "The Belgorod state university", 308015 Belgorod, Russia

⁴The Federal state autonomous educational institution of higher education "The peoples' friendship university of Russia", 117198 Moscow, Russia

The chronic periodontitis in children is frequently complicated by development of periapical abscess under inadequate conservative therapy. However, prognostic models of estimation of probability of its development are lacking. The purpose of study is to develop regression models of prognostication of periapical abscess under chronic periodontitis in children according indices of peripheral blood and systemic cellular immunity. The chronic periodontitis complicated with periapical abscess is analyzed in 120 children aged from 8 to 15 years. The prognostication of periapical abscess was implemented by stepwise regression technique using parameters of blood and systemic cellular immunity. The mathematical models are developed for prognostication of periapical abscess in children with chronic periodontitis on the basis of indices of peripheral blood and systemic cellular immunity permitting to prognosticate development of the given complication with needed quality. The prognostication periapical abscess requires using the given models, absolute number of lymphocytes, percentage of stab bond neutrophils, ESR, absolute number of T-lymphocytes in blood, T-helpers, T-suppressors and relative content of T-suppressors.

Key words: chronic periodontitis; children; periapical abscess; prognostication; stepwise regression technique

For citation: Agarkov N.M., Tkachenko P.V., Zamulin D.O., Aksenov V.V., Gontareva I.S., Kicha D.I., Mishenin M.O. The prognostication of development of peri-apical abscess under chronic periodontitis by blood parameters and cell immunity in children. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63 (1): 31-34. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-31-34>

For correspondence: Agarkov N.M., doctor of medical sciences, professor of the chair of biomedical engineering of the Federal state budget educational institution of higher education "The South-Western state university". e-mail: vitalaxen@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 10.06.2017
Accepted 21.06.2017

Введение. Хронический периодонтит (ХП) характеризуется высокой распространенностью среди детей и подростков [1]. Данная патология в 85—98% случаев становится причиной других заболеваний зубочелюстной системы и потери самих зубов [2]. В странах Латинской Америки периодонтит у детей встречается в 10% случаев [3]. ХП в Российской Федерации среди детского контингента составляет 8—11% [4]. Кроме того, в настоящее время по-прежнему сложной остается диагностика ХП у детей, что приводит к выбору неэффективных методов терапии и развитию различных осложнений [1].

Наиболее частым осложнением неадекватной терапии ХП у детей является развитие периапикального абсцесса, лечение которого считается более финансово затратным и более сложным, чем терапия ХП. Снизить частоту периапикального абсцесса у больных детей с ХП позволяет метод прогнозирования по конкретным клиническим и лабораторным показателям. Прогнозирование течения ХП в детском возрасте даёт возможность на ранних этапах, в первые два дня консервативной терапии, включить дополнительные лечебные мероприятия для предупреждения возникновения осложнения — периапикального абсцесса. Однако в научной литературе отсутствуют данные о прогнозировании периапикального абсцесса у детей при ХП по показателям крови и системного клеточного иммунитета.

Цель настоящего исследования — разработать ре-

грессионные модели для прогнозирования периапикального абсцесса при ХП у детей по показателям периферической крови и системного клеточного иммунитета.

Материал и методы. ХП, осложненный периапикальным абсцессом, изучен у 120 больных детей в возрасте от 8 до 15 лет, обратившихся за медицинской помощью в детскую стоматологическую поликлинику Белгорода в 2013—2015 гг. Комплексная терапия ХП, осложненного периапикальным абсцессом, включала местное применение метрогилдента, 0,12% раствора хлоргексидина биглюконата, инстиляции геля Атридокос или Элизол, чистку зубов пастами Parodontax, Lacalut active, рассасывание таблеток с лизоцимом «Ларипронт» 4—6 раз в день. Для подавления агрессивной микрофлоры использовались суспензия амоксиклава по одной чайной ложке 3 раза в день и метронидазол по 0,1 г 3 раза в день в течение семи дней.

Обследование пациентов включало оценку клеточного иммунитета и периферической крови. Последняя анализировалась на автоматическом гематологическом анализаторе QuiktuS (Швеция). Показатели системного клеточного иммунитета изучались с помощью иммунофлуоресцентного метода и моноклональных антител. Активность нейтрофилов крови определялась по реакции восстановления нитросинего тетразолия спонтанного (НСТ сп.) и нитросинего тетразолия стимулированного (НСТ ст.). Прогнозирование развития периапикального

Таблица 1

Регресс показателей общего анализа крови у больных с периапикальным абсцессом, развившимся вследствие ХП у детей, на фоне проводимой терапии ($M \pm m$)

Показатель крови	При поступлении	После окончания терапии	p
Лейкоциты, $\bullet \cdot 10^9/\text{л}$	12,4 \pm 1,3	6,8 \pm 0,7	< 0,001
Лимфоциты, $\bullet \cdot 10^9/\text{л}$	4,1 \pm 0,5	1,8 \pm 0,3	< 0,001
Лимфоциты, %	58,7 \pm 1,6	32,5 \pm 1,4	< 0,001
Сегментоядерные нейтрофилы, %	65,9 \pm 2,3	39,7 \pm 2,2	< 0,001
Палочкоядерные нейтрофилы, %	12,3 \pm 0,4	1,6 \pm 0,5	< 0,001
Моноциты, %	3,6 \pm 0,2	3,0 \pm 0,1	> 0,05
Базофилы, %	1,1 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2	> 0,05
Эозинофилы, %	2,4 \pm 0,2	2,3 \pm 0,2	> 0,05
Гемоглобин, г/л	112,5 \pm 2,6	115,6 \pm 2,1	> 0,05
Эритроциты, $\bullet \cdot 10^{12}/\text{л}$	4,0 \pm 0,5	4,2 \pm 0,6	> 0,05
СОЭ, мм/час	32,4 \pm 2,1	10,5 \pm 0,8	< 0,001

Таблица 2

Состояние параметров системного иммунитета у пациентов с периапикальным абсцессом при ХП у детей ($M \pm m$)

Иммунологический показатель	Исходный показатель	Завершение терапии	p
CD3+, $\bullet \cdot 10^9/\text{л}$	2,2 \pm 0,3	1,1 \pm 0,2	< 0,05
CD3+, %	65,2 \pm 1,4	49,3 \pm 0,8	< 0,001
CD4+, $\bullet \cdot 10^9/\text{л}$	0,2 \pm 0,08	0,7 \pm 0,05	< 0,001
CD4+, %	21,5 \pm 1,3	38,4 \pm 2,0	< 0,001
CD8+, $\bullet \cdot 10^9/\text{л}$	0,2 \pm 0,06	0,5 \pm 0,04	< 0,001
CD8+, %	12,3 \pm 1,2	23,6 \pm 1,4	< 0,001
НСТсп., у.е.	72,8 \pm 2,4	93,2 \pm 1,5	< 0,001
НСТст., у.е.	103,5 \pm 2,7	159,6 \pm 2,2	< 0,001
НСТст./НСТсп.	1,4 \pm 0,2	1,7 \pm 0,3	> 0,05

абсцесса осуществлялось методом пошаговой регрессии с использованием стандартного статистического пакета «Statistica 6.0», т. е. последовательно подставлялись изученные показатели крови и системного клеточного иммунитета до получения адекватных математических моделей с исключением параметров, при которых они являлись неадекватными.

Результаты и обсуждение. Исследование параметров крови для определения результативности терапии и прогнозирования развития периапикального абсцесса при ХП у детей свидетельствует о достижении большинства показателей границ референсных значений (табл. 1). Под влиянием проведённой терапии произошло достоверное снижение абсолютного количества лейкоцитов, абсолютного и относительного количества лимфоцитов. К концу завершения лечения уменьшилось содержание сегментоядерных нейтрофилов. Особенно значительно снизился процент палочкоядерных нейтрофилов — более чем в 7,6 раза. Репрезентативно уменьшилась СОЭ на фоне проведённой комбинированной терапии. Перечисленные выше показатели достигли границ нормы. Вместе с тем некоторые показатели пе-

риферической крови не претерпели существенных изменений и находились в границах нормы. Это относится к количеству моноцитов, базофилов, эозинофилов, гемоглобина и эритроцитов.

Показатели периферической крови, имевшие наибольшие различия, использованы при разработке математической модели для прогнозирования развития периапикального абсцесса при ХП у детей. В результате работы регрессионного анализа получена математическая функция:

$$y_1 = 42,581 + 4,692x_1 + 12,231x_2 + 8,054x_3,$$

где y_1 — периапикальный абсцесс при ХП у детей, x_1 — абсолютное количество лимфоцитов, x_2 — процент палочкоядерных нейтрофилов, x_3 — величина СОЭ.

Математическая модель адекватна по критерию Фишера ($F_{\text{расч}} = 82,7, p < 0,001$). Согласно полученной математической модели развитие периапикального абсцесса при ХП у детей прогнозируется при $y_1 = 354,2—473,1$, а отсутствие периапикального абсцесса — при $y_1 = 354,1$ и менее.

Другие исследователи, используя результаты опросников для прогнозирования осложнений лечения острого периодонтита у детей — периапикального абсцесса, — методом пошаговой регрессии создали математическую модель $Y_1 = -0,036X_1 + 0,129X_2 + 1,835X_3 + 35,347$, где Y_1 — периапикальный абсцесс, X_1 — выраженный «сухой» блеск, X_2 — белая линия по краю композита, X_3 — наличие множественных пор в пломбировочном материале [5]. Регрессионная модель адекватна по критерию Фишера и позволяет прогнозировать развитие периапикального абсцесса при $Y_1 = 80$ и более и благоприятный исход — при $Y_1 = 79$ и менее [5].

Определение содержания миелопероксидазы в ротовой жидкости позволяет прогнозировать развитие одонтогенного периапикального абсцесса [5]. С использованием регрессионного анализа создано уравнение для определения вероятности (шанса) отнесения пациента к группе с одонтогенным периапикальным абсцессом $y = e^{0,107x + 1,76}/(1 + e^{0,107x + 1,76})$, где y — шанс развития одонтогенного периапикального абсцесса; e — const = 2,72; x — значение миелопероксидазы в ротовой жидкости [2].

Определение средних значений показателей системного клеточного иммунитета при периапикальном абсцессе, связанном с ХП у детей, позволило установить, что реализованная терапия приводит к существенному улучшению иммунограммы в периферической крови (табл. 2). Статистически достоверно снизилось абсолютное и относительное количество Т-лимфоцитов, соответствовавшее референсным значениям. Напротив, у больных репрезентативно возросло как абсолютное, так и относительное содержание Т-хелперов и Т-супрессоров, что также указывает на хороший исход заболевания и результативность терапии. Отмеченное выше относится и к динамике тестов НСТсп. и НСТст., значения которых статистически значимо возросли за период комбинированной терапии. Недостоверным оказалось только повышение соотношения тестов НСТст./НСТсп. ($p > 0,05$).

Анализ Т-клеточного звена иммунной системы больных ХП другими исследователями [6] выявил наличие 12,14 \pm 3,22% клеток с фенотипом CD3⁺ 4⁺ 8⁺, что значительно больше, чем у здоровых доноров. Показано, что увеличение содержания в крови лимфоцитов с таким фенотипом характерно для воспалительных процессов различного генеза и возникает при функциональной не-

достаточности антигенпрезентирующих клеток. Содержание естественных киллерных клеток (CD16⁺) у больных ХП не увеличено, однако доля их активированных форм (CD56⁺) повышена вдвое, что отражает интенсивный активационный процесс в иммунной системе [6].

Используя показатели кластеров дифференцировки на системном уровне методом пошаговой регрессии, построили регрессионную модель вида:

$$y_2 = 15,397 + 4,908x_4 - 8,542x_5 - 7,425x_6 - 2,463x_7,$$

где y_2 — периапикальный абсцесс при ХП у детей, x_4 — абсолютное количество в крови Т-лимфоцитов, x_5 — абсолютное содержание в крови Т-хелперов, x_6 — абсолютное число в крови Т-супрессоров, x_7 — относительное число в крови Т-супрессоров.

Построенная регрессионная модель адекватна ($F_{\text{расч}} = 71,2, p < 0,001$). Модель может быть использована для прогнозирования периапикального абсцесса у больных ХП детей. Согласно данной модели и составляющим иммунограммы периферической крови при $y_2 = -12,345 - 27,179$ прогнозируется с вероятностью безошибочного уровня развитие периапикального абсцесса, а при $y_2 = -12,344$ и менее отсутствие данного осложнения ХП у детей.

Под влиянием выполненной терапии у больных острым одонтогенным остеомиелитом челюстей достоверно повысилось содержание IgA, IgG в крови и снизился уровень IgM, циркулирующих иммунных комплексов [7]. Показатели сдвига гуморального иммунитета уменьшились с $-257,7\%$ до $-12,2\%$. С помощью регрессионного анализа построена математическая модель $Y_3 = 31,862 - 4,725X_8 + 11,241X_9 + 8,072X_{10}$, где Y_3 — развитие периапикального абсцесса вследствие острого одонтогенного остеомиелита челюстей, X_8 — содержание в периферической крови IgG, X_9 — содержание в периферической крови IgM, X_{10} — содержание в периферической крови IgA. Модель адекватна и вероятность осложнения острого одонтогенного остеомиелита челюстей развитием периапикального абсцесса прогнозируется при величинах $Y_3 = 18,254 - 31,087$. При $Y_3 = 31,088$ и более исход благоприятный — выздоровление [7].

Заключение. Разработанные регрессионные модели позволяют с высокой вероятностью безошибочно прогнозировать у детей с ХП развитие периапикального абсцесса. Для осуществления прогнозирования необходимо использовать абсолютное количество лимфоцитов, процент палочкоядерных нейтрофилов, величину СОЭ, абсолютное количество в крови Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-супрессоров и относительное содержание Т-супрессоров. В случае прогнозируемой вероятности развития при ХП периапикального абсцесса у детей необходимо к стандартной терапии дополнительно добавить иммуностимуляторы, мембранопротекторы и селективные антибактериальные препараты.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нацвлишвили Т.Т., Цимбалистов А.В., Шторина Г.Б. Клинико-рентгенологические параллели генерализованных форм агрессивного и хронического пародонтита. *Вестник Северо-западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова*. 2011; 3(4): 97—100.
2. Дорофеева Н.Г., Ильяно В.М. Иммунный и метаболический статус пациентов с хроническим периодонтитом. *Загальна патологія та патологічна фізіологія*. 2009;4(4): 130—8.
3. Botero J.E., Rösing C.K., Duque A., Jaramillo A., Contreras A. Periodontal disease in children and adolescents of Latin America. *Periodontol*. 2015; 67(1): 34—57.
4. Агарков Н.М., Гонтарев С.Н., Глаголева Я.В., Луценко В.Д. Математическое моделирование диагностики остеомиелита челюстей и периодонтита у детей. *Системный анализ и управление в биомедицинских системах*. 2014; 13(3): 720—4.
5. Глаголева Я.В. *Моделирование и прогнозирование заболеваемости и исходов терапии острого периодонтита у детей*. Дис. ... канд. мед. наук. Курск; 2015.
6. Воложин А.И., Порядин Г.В., Казимирский А.Н. Иммунологические нарушения в патогенезе хронического генерализованного пародонтита. *Стоматология*. 2005; 84(3): 4—7.
7. Шамборский В.Н. *Рациональные модели, алгоритмы диагностики и анализа лечения острого одонтогенного остеомиелита челюстей*. Дис. ... канд. мед. наук. Курск; 2014.

REFERENCES

1. Natsvlishvili T.T., Tsimbalistov A.V., Shtorina G.B. Clinical and radiological Parallels generalized aggressive and chronic parodontitis. *Vestnik Severo-Zapadnogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta im. I.I. Mechnikova*. 2011; 3(4): 97—100. (in Russian)
2. Dorofeeva N.G., Ilyano V.M. Immune and metabolic status of patients with chronic periodontitis. *Zagal'na patologiia ta patologiczna fiziologiya*. 2009; 4(4): 130—8.
3. Botero J.E., Rösing C.K., Duque A., Jaramillo A., Contreras A. Periodontal disease in children and adolescents of Latin America. *Periodontol*. 2015; 67(1): 34—57.
4. Agarkov N.M., Gontarev S.N., Glagoleva Ya.V., Lutsenko V.D. Mathematical modelling the diagnosis of osteomyelitis of the jaws and periodontitis in children. *Sistemny analiz i upravlenie v biomeditsinskikh sistemakh*. 2014; 13(3): 720—4. (in Russian)
5. Glagoleva Ya.V. *Modeling and forecasting of incidence and outcomes of those-rapii acute periodontitis in children [Modelirovanie I prognozirovanie zaboлеваemosti I iskhodov terapii ostrogo periodontita u detey]*. Diss. Kursk; 2015. (in Russian)
6. Volozhin A.I., Poryadin G.V., Kazimirskiy A.N. Immunological disorders in the pathogenesis of chronic generalized periodontitis. *Stomatologiya*. 2005; 84(3): 4—7. (in Russian)
7. Shamborskiy V.N. *Rational models, algorithms, diagnostics and analysis of treatment of acute odontogenic osteomyelitis of the jaws [Ratsional'nye modeli, algoritmy diagnostiki I analiza lecheniya ostrogo odontogenno osteomiелita chelyustey]*. Diss. Kursk; 2014. (in Russian)

Поступила 10.06.17

Принята к печати 21.06.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:578.825.111-078

Марданлы С.Г.^{1,2}, Арсеньева В.А.¹, Марданлы С.С.¹, Ротанов С.В.^{1,2,3}, Амелина Е.А.¹

СИНХРОННАЯ ДЕТЕКЦИЯ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЁРОВ ОСНОВНЫХ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА

¹ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск Московская обл.;

²ГОУ ВО МО ГГТУ, г. Орехово-Зуево Московская обл.;

³ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, Москва

Разработан новый оригинальный отечественный набор реагентов «Лайн-Блот ВГЧ-профиль» для определения антител (IgG — комплект № 1 и IgM — комплект № 2) к основным возбудителям герпесвирусных инфекций (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV) в формате линейного иммуноблоттинга. Проведены предварительные клинические испытания с использованием 319 сывороток крови: ВИЧ-инфицированных (n = 128), беременных (n = 86) и людей, проходивших лечение или диагностическое обследование (n = 105). В отношении каждого инфекционного агента проведены исследования в ИФА и линейном иммуноблоттинге с новым набором и его аналогами германского производства, рассчитаны показатели диагностической информативности по ГОСТ Р 53022.3—2008. Полученные данные позволили начать регистрацию в Российской Федерации нового набора реагентов, предназначенного для синхронного скрининга моноспецифических антител к основным возбудителям герпесвирусных инфекций человека, установления активности проявления инфекции и сроков инфицирования некоторыми из них.

Ключевые слова: герпесвирусные инфекции; линейный иммуноблоттинг; ИФА; клиническая информативность.

Для цитирования: Марданлы С.Г., Арсеньева В.А., Марданлы С.С., Ротанов С.В., Амелина Е.А. Синхронная детекция серологических маркеров основных герпесвирусных инфекций человека. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (1): 35-40. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-35-40>

Mardanly S.G.^{1,2}, Arsenieva V.A.¹, Mardanly S.S.¹, Rotanov S.V.^{1,2,3}, Amelina E.A.¹

THE SYNCHRONOUS DETECTION OF SEROLOGICAL MARKERS OF MAIN HERPES VIRAL HUMAN INFECTIONS

¹The closed corporation "ECOLab", Elektrogorsk, Moscow oblast, Russia

²The state educational institution of higher education "The state humanitarian technological university", 142611 Orekhovo-Zuyevo of the Moscow oblast, Russia

³Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU) of Minzdrav of Russia, Moscow

The new original national set of reagents "Line-Blot human herpesvirus-profile" was developed to detect antibodies (IgG - set 1 and IgM - set 2) to main agents of herpesvirus infections (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV) in the format of linear immunoblotting. The preliminary clinical trials were implemented using 319 samples of blood serum: HIV-infected patients (n=128), pregnant women (n=86) and persons undergoing treatment or diagnostic examination (n=105). In the case of every infection agent analyzes were implemented using enzyme-linked immunosorbent assay and linear immunoblotting with new set and its analogues of German manufacturer. The indices of diagnostic informativeness were calculated according GOST R 53022.3-2008. The obtained data permitted to begin registration in the Russian Federation the new set of reagents intended to synchronous screening of mono-specific antibodies to main agents of human herpesviral infections and establishment of activity of manifestation of infection and time of infection by some of them.

Key words: herpesviral infections; linear immunoblotting; enzyme-linked immunosorbent assay; clinical informativeness.

For citation: Mardanly S.G., Arsenieva V.A., Mardanly S.S., Rotanov S.V., Amelina E.A. The synchronous detection of serological markers of main herpes viral human infections. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63 (1): 35-40. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-35-40>

For correspondence: Mardanly S.G., doctor of medical sciences, academician of the Russian academy of medical technical sciences, professor of the chair of pharmacology and pharmaceutical disciplines of the state educational institution of higher education "The state humanitarian technological university". e-mail: ekolab-president@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 15.08. 2017
Accepted 01.09.2017

Введение. Согласно обновленной классификации Международного комитета таксономии вирусов (ICTV), семейство *Herpesviridae* включает около 120 видов

ДНК-вирусов, подразделяемых на 3 подсемейства: α-, β- и γ-герпесвирусов [1], представители которых различаются по тропности к поражаемым ими клеткам макроорганизма, структуре генома, характеру репродукции, молекулярно-биологическим и иммунологическим особенностям [2]. Восемь вирусов этого семейства патогенны для человека. Из подсемейства α-герпесвирусов к числу патогенных относят: вирусы простого герпеса

Для корреспонденции: Марданлы Сейфаддин Гашимович, д-р мед. наук, акад. АМТН, проф. каф. фармакологии и фармацевтических дисциплин ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет»; ekolab-president@mail.ru

1-го и 2-го типа (HSV-1 и HSV-2, или human herpes virus — HHV-1 и HHV-2) и вирус ветряной оспы и опоясывающего герпеса (VZV, или HHV-3); из β -подсемейства: цитомегаловирус (CMV или HHV-5), вирус герпеса 6-го типа (HHV-6), являющийся возбудителем внезапной экзантемы и ассоциирующийся с синдромом хронической усталости, и вирус герпеса 7-го типа (HHV-7), также выявляемый у больных с синдромом хронической усталости; из подсемейства γ : вирус Эпштейна—Барр (EBV или HHV-4) и вирус герпеса 8-го типа (HHV-8), причастный к возникновению саркомы Капоши. Кроме того, имеются публикации о том, что вирус герпеса обезьян В при поражении человека вызывает энцефаломиелит, как правило, со смертельным исходом [1—3].

По данным ВОЗ, вызываемые герпесвирусами заболевания как причина смерти от вирусных инфекций занимают 2-е место после гриппа (этот показатель достигает 15,8%) [4]. Установлено, что к 18 годам более 90% жителей городов инфицированы одним или несколькими герпесвирусами и у 50% из них ежегодно наблюдают клинические рецидивы заболевания в связи с отсутствием защитного иммунитета [5—7].

Сохраняющийся интерес к изучению герпесвирусных инфекций обусловлен тем, что они активно проявляют себя у людей с иммунодефицитными состояниями (относятся к оппортунистическим инфекциям), приводят к развитию нейроинфекций с высоким уровнем инвалидизации (50%) и летальных исходов (20%) [8, 9], а также обладают высокой онкогенной активностью (HSV, CMV, EBV, HHV-8 и, возможно, HHV-6) [10], а при инфицировании беременных способны приводить к развитию внутриутробных инфекций и гибели плода (HSV, CMV) [8, 9, 11].

Герпесвирусы могут поражать практически все ткани и системы органов хозяина (эритроциты, тромбоциты, лейкоциты и макрофаги), где они непрерывно или циклично размножаются, обеспечивая постоянную готовность к клиническому обострению инфекционного процесса (персистенция). Как правило, герпесвирусы пожизненно сохраняются в морфологически и иммунохимически измененной форме в нервных клетках регионарных (по отношению к месту первичного внедрения) ганглиев чувствительных нервов (латенция). У каждого герпесвируса выделяют свой темп персистенции и латенции (наиболее активны HSV1 и HSV2, наименее — EBV) [12, 13].

Иммунная система человека в ответ на инфицирование герпесвирусами реагирует выработкой специфических антител разных классов, но это не приводит к полной элиминации вирусов из организма. Выработка вируснейтрализующих антител поддерживается в течение всей последующей жизни человека, иногда в довольно высоких титрах, что препятствует проявлению ин-

фекции, но не предупреждает возникновения клинических рецидивов при ослаблении защиты [14—17].

Спектр клинических проявлений при герпесвирусных инфекциях зависит от локализации патологического процесса, его распространенности, состояния иммунной системы больного и антигенного типа вируса. Заболевание как СПИД-индикаторные в связи с их частым обнаружением при этой патологии; кроме того, установлено, что многие HHV могут активировать ВИЧ, находящийся в стадии провируса, и являются кофакторами прогрессирования ВИЧ-инфекции и СПИДа [18]. В последние годы за рубежом активно изучают различные аспекты эпидемиологии, клиники и профилактики инфекций, вызванных малоизвестными герпесвирусами человека: HHV-6, HHV-7 и HHV-8 [19]. Предполагается участие HHV-6 в этиологии рака, хронических демиелинизирующих заболеваний центральной нервной системы, рассеянного склероза, синдрома хронической усталости, внезапных экзантем у детей [20].

Одна из основных задач современной клинической лабораторной диагностики — обеспечение достоверной этиологической диагностики внутри группы герпесвирусных инфекций, особенно при наличии неясных клинических симптомов заболевания (например, неспецифических проявлений хронических форм инфекций, обусловленных EBV и CMV), а также для дифференциальной диагностики с другими персистирующими инфекциями (хламидийной, иерсиниозной и др.) и в случаях выявления микст-инфекций.

Современные подходы к этиологической диагностике герпесвирусных инфекций у человека включают вирусологический (золотой стандарт), молекулярно-биологический (полимеразная цепная реакция) и серологические методы (иммуноферментный анализ), каждый из которых имеет свои показания к применению [21, 22].

Выявление в крови пациента специфических антител

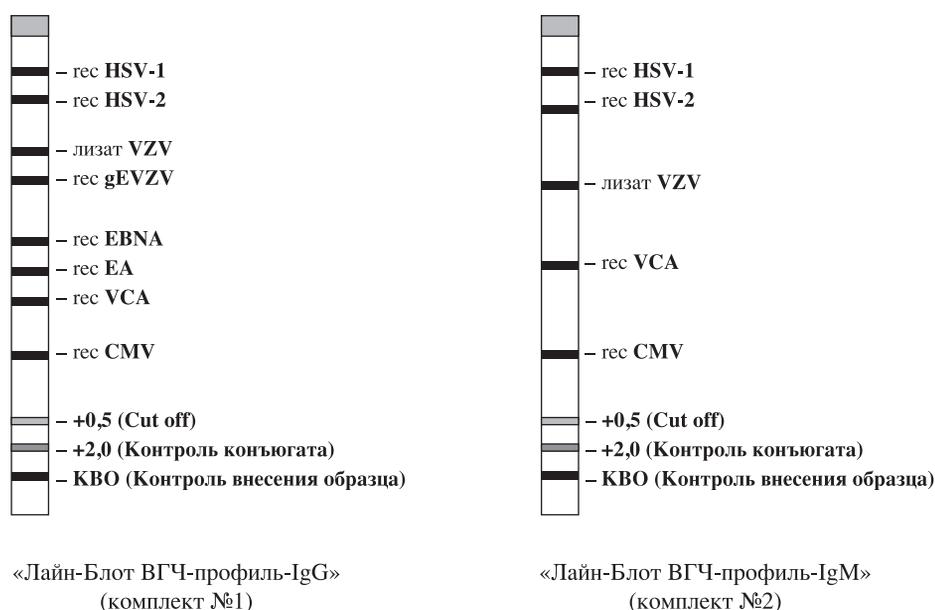


Рис. 1. Схема нанесения на иммуносорбенте антигенов основных возбудителей герпесвирусных инфекций человека для определения специфических IgG и IgM.

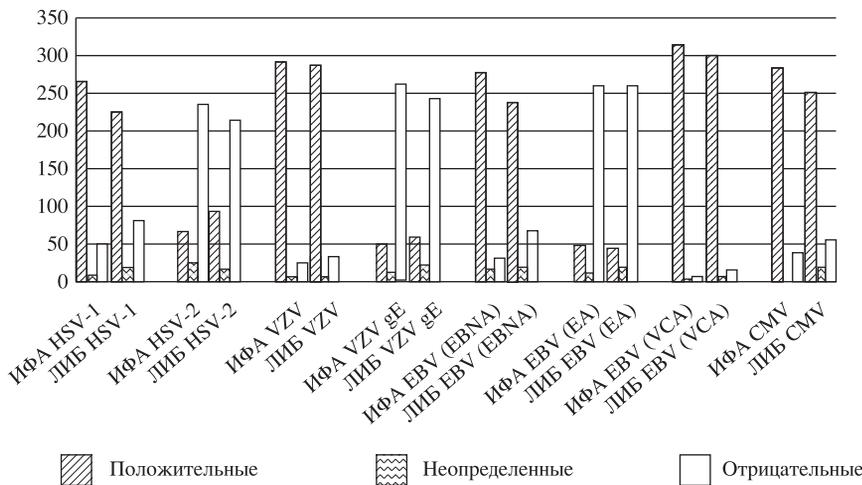


Рис. 2. Сопоставление результатов исследования 319 сывороток крови в ИФА-IgG и ЛИБ (с набором «Лайн-Блот ВГЧ-профиль-IgG»).

иммунохимическими методами не характеризует активность вирусной инфекции, поскольку специфический гуморальный ответ при герпесвирусных инфекциях отражает инфицированность организма патогеном, а не защищённость от него. Необходимо также учитывать, что длительная персистенция возбудителей нередко приводит к иммуносупрессии, в результате чего соответствующие IgM и IgG к антигенам вирусов могут не выявляться или определяться в невысоких титрах. Это обстоятельство снижает информативность серологических методов при хронических герпесвирусных инфекциях, поскольку не позволяет дифференцировать латентную и хроническую инфекции, прогнозировать течение заболевания, определять тактику терапии больных. Тем не менее, сопоставление серологических показателей в динамике (по титру определяемых антител в парных сыворотках, полученных с интервалом 14—21 сут и более) важно для установления этиологического диагноза в сложных случаях [21, 22].

Цель настоящего исследования — разработка нового набора реагентов, позволяющего в рамках одного

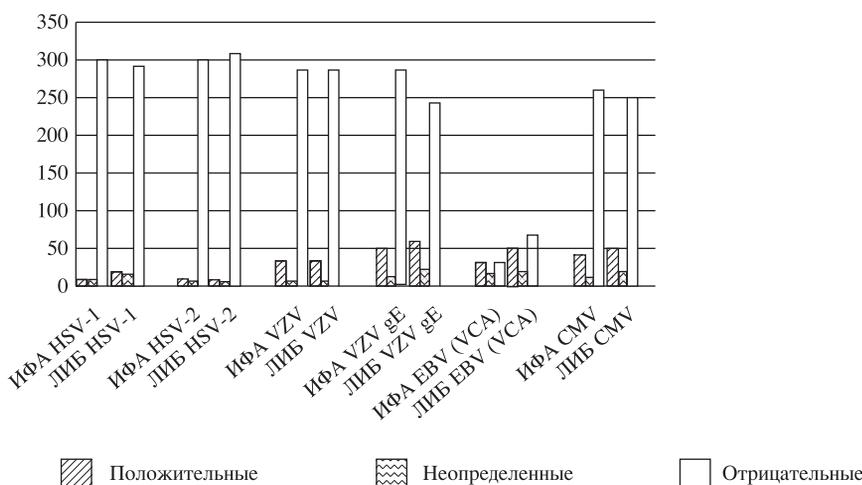


Рис. 3. Сопоставление результатов исследования 319 сывороток крови в ИФА-IgM и ЛИБ (с набором «Лайн-Блот ВГЧ-профиль-IgM»).

диагностического лабораторного исследования дифференцированно определять в крови пациента антитела (IgG или IgM) к основным возбудителям герпесвирусных инфекций человека (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV).

Материал и методы. Для осуществления поставленной цели использовали технологию линейного иммуноблоттинга (ЛИБ), поскольку указанный формат лабораторного исследования позволяет отдельно выявить специфические антитела одновременно к нескольким возбудителям и дифференцированно оценить вклад каждого антигена в существующий гуморальный иммунитет. Этот современный метод исследования является высокоспецифичным и высокочувствительным, основан на технологии иммуноферментного анализа (ИФА) и для своего выполнения не требует дополнительного лабораторного оборудования, что в большей мере обеспечивает возможность его внедрения в практику здравоохранения. Иммуносорбент в ЛИБ представлен в виде узких нитроцеллюлозных мембран, на которые в процессе производства в виде отдельных полос нанесены отобранные наиболее специфические и иммунореактивные антигены соответствующих возбудителей [23—25].

На основании изучения литературы и имеющегося опыта конструирования ИФА наборов для размещения на иммуносорбенте в составе нового набора реагентов для ЛИБ были использованы очищенные нативные и рекомбинантные (гес) белковые антигены основных возбудителей герпесвирусных инфекций человека: гес мозаичный антиген HSV-1, TRX-гибрид (содержащий иммунодоминантные последовательности белка gG-1), гес мозаичный антиген HSV-2, TRX-гибрид (последовательности белка gG-2), гес VZV, TRX-гибрид (последовательности белка gE), нативный антиген VZV, гес антигены EBV (ранний — EA, капсидный — VCA и ядерный — EBNA), гес мозаичный антиген CMV (последовательности белков pp150, pp52, pp28 и gB). Использование в структуре иммуносорбента одновременно трёх антигенов EBV обусловлено особенностями хронологии развития иммунологической реактивности у человека после первичного инфицирования этим вирусом.

Предварительные клинические испытания нового набора реагентов проводили с сыворотками крови 128 ВИЧ-инфицированных людей (МНИКИ им. М.Ф. Владимирского), 86 беременных (Центр охраны здоровья матери и ребенка имени В.И. Кулакова) и 105 человек, проходивших обследование или лечение (ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи РАМН). В соответствии с современ-

ИММУНОЛОГИЯ

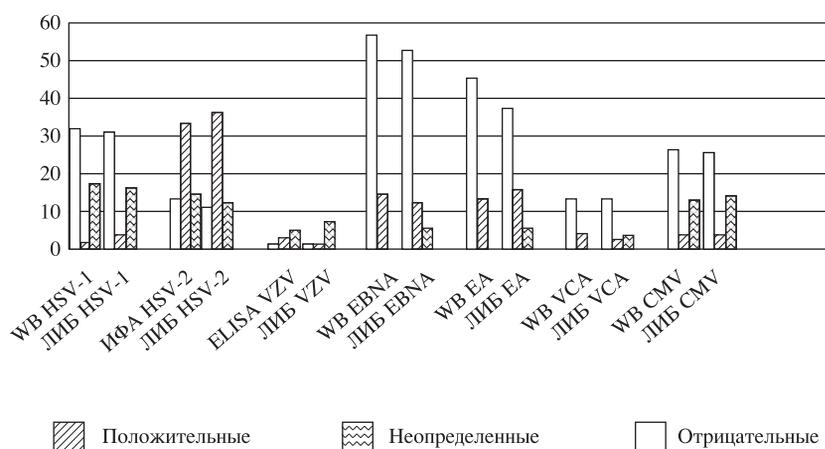


Рис. 4. Результаты исследования 336 сывороток крови (с несовпадающими результатами определения IgG в ИФА и ЛИБ) с наборами реагентов сравнения производства фирмы EUROIMMUN (Германия) и «Лайн-Блот ВГЧ-профиль-IgG».

ным законодательством венозную кровь получали после письменного информированного согласия пациентов на проведение необходимого ему диагностического исследования и возможности последующего хранения и исследования полученного образца в научных целях при обезличенном учёте метаданных.

В качестве наборов реагентов сравнения использовали разрешенные к применению в России тест-системы для определения в ИФА антител к антигенам каждого из возбудителей герпесвирусных инфекций отдельно.

Результаты и обсуждение. В результате исследований в отделе перспективных разработок ЗАО «ЭКОлаб» был создан набор реагентов «Лайн-Блот ВГЧ-профиль» (комплект № 1 — IgG, комплект № 2 — IgM). Размещение антигенов на стрипах представлено на схеме (рис. 1), различия в структуре иммуносорбента в комплектах №№ 1 и 2 обусловлены особенностями выявления специфических IgG и IgM при диагностических лабораторных исследованиях.

Разработанная процедура лабораторного исследо-

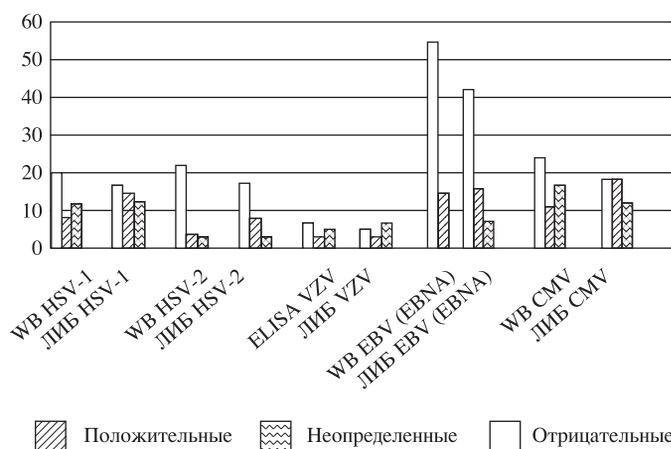


Рис. 5. Результаты исследования 197 сывороток крови (с несовпадающими результатами определения IgM в ИФА и ЛИБ) с наборами реагентов сравнения производства фирмы EUROIMMUN (Германия) и «Лайн-Блот ВГЧ-профиль-IgM».

вания образцов сыворотки или плазмы крови человека осуществляется в следующей последовательности: 1) перед определением антител класса М исследуемые образцы предварительно обрабатывают РФ-сорбентом для удаления ревматоидного фактора и избытка IgG; 2) готовят рабочее разведение исследуемых образцов, вносят их в реакционные канавки планшета, туда же погружают иммуносорбент (стрип с нанесёнными антигенами); планшет инкубируют на горизонтальном шейкере, что обеспечивает образование иммунных комплексов, фиксированных в соответствующих участках стрипа; 3) при последующем 4-кратном промывании из реакционных канавок и со стрипов удаляются все не вступившие в реакцию белки исследуемых образцов; 4) в реакционные канавки вносят конъюгат, что приводит к формированию на

стрипах более сложных иммунных комплексов, не диссоциирующих при последующем промывании, в то время как не вступившие в реакцию компоненты удаляются; 5) исследование завершается добавлением субстрата, содержащего хромоген и окислитель, инкубацией стрипов и остановкой окислительно-восстановительного процесса. В местах локализации на стрипах антигенов возбудителей герпесвирусных инфекций и на контрольных линиях в результате индуцированного восстановления хромогена происходит локальное образование окрашенных формазанов; интенсивность окрашивания пропорциональна содержанию специфических антител в испытуемых образцах.

Общее время исследования составляет 3,5 ч с учётом этапов промывания стрипов между инкубациями. Конструкция рамки планшета позволяет проводить дробные постановки (от 1 до 8 стрипов), что делает удобным использование набора как в крупных, так и в небольших лабораториях, где поток исследований невелик.

Учёт и интерпретация результатов исследования.

Окрашивание контрольных линий («0,5⁺ или cut off», «2⁺» и «КВО») позволяет оценить правильность проведения процедуры исследования и контроль внесения образца в реакционную канавку. Сопоставление выраженности окраски контролей с линиями, где нанесены антигены возбудителей, оценивает количественное содержание специфических антител соответствующего класса к антигенам HSV-1, HSV-2, VZV, EBV и CMV в условных единицах «плюсах»: от «0,5⁺» до «4⁺». Менее интенсивное по сравнению с cut off (0,5⁺) окрашивание расценивают как отрицательный результат.

Антигены VZV представлены 2 и EBV — 3 антигенными линиями, что направлено на более точное определение стадии заболевания. Дополнительное определение IgG к gE VZV является маркером активной репликации вируса и подтверждает острую стадию заболевания, недавно перенесённую или бессимптомную инфекцию с активным размножением вируса. Выявление IgM и/или IgG к разным гес антигенам EBV позволяет уточнить клиническую форму течения инфекции по гуморальному отклику на капсидные или ядерные антигены вируса [4, 26].

Показатели диагностической информативности набора реагентов «Лайн-Блот ВГЧ-профиль» при определении IgG и IgM к основным возбудителям герпесвирусных инфекций человека

Показатель информативности	Величина показателя при определении IgG/IgM в отношении антигенов, %						
	HSV-1	HSV-2	VZV	EBV			CMV
				EBNA	EA	VCA	
Клиническая чувствительность	100/100	100/100	100/100	98,3	100	99,3/97,1	99,6/97,7
Клиническая специфичность	97,5/98,7	99,5/98,7	96,6/98,7	91,0	97,1	88,9/95,4	93,0/98,5
Диагностическая эффективность	99,3/98,7	99,7/98,7	98,3/98,7	96,7	97,50	98,8/95,6	98,4/98,4

Клинические испытания нового набора реагентов проведены с 319 образцами сыворотки крови; в качестве наборов сравнения использовали разрешённые к применению в России ИФА тест-системы (для каждого вида вируса отдельно). Результаты, полученные в отношении каждой из герпесвирусных инфекций приведены на рис. 2 и 3.

Совпадение показателей для положительных, неопределённых и отрицательных результатов в ИФА и ЛИБ при выявлении специфических IgG в отношении каждого патогена варьировало от 80 до 95%, а при определении IgM — от 79 до 91%. Несовпадающие результаты выявления IgG наблюдали с 336 сыворотками крови в 394 случаях: к HSV-1 в 51, к HSV-2 — в 59, к VZV — в 12, к gE VZV — в 28, EBNA EBV — в 72, EA EBV — в 59, VCA EBV — в 69 и к CMV — в 44 случаях, а при определении IgM расхождение результатов получено с 319 сыворотками в 197 случаях: к HSV-1 — в 41, к HSV-2 — в 28, к VZV — в 12, к VCA EBV — в 66 и к CMV — в 50 случаях.

Все образцы сыворотки крови, с которыми наблюдались расхождения результатов в ИФА и ЛИБ, были дополнительно протестированы в вестерн-блоте (WB) с наборами Anti-HSV-1/HSV-2 EUROLINE-WB (IgG), Anti-HSV-1/HSV-2 EUROLINE-WB (IgM), EUROLINE Anti-EBV-Profile 2 (IgG), EUROLINE Anti-EBV-Profile 2 (IgM), Anti-CMV (IgG) WESTERNBLOT, и Anti-CMV (IgM) WESTERNBLOT) и наборами для иммуноферментного анализа (ELISA) в отношении антител к ZVZ производства фирмы Euroimmun AG (Германия). Полученные данные проанализированы и приведены на рис. 4 и 5. Установлено совпадение результатов от 80 до 90%.

По совокупности совпадающих результатов исследования клинических образцов в ИФА и ЛИБ с 2 наборами реагентов разных производителей проведена завершающая аттестация клинических образцов по содержанию в них специфических IgG и IgM, что стало основанием для расчёта показателей клинической информативности применения разработанного набора реагентов (таблица). Полученные в исследовании высокие показатели диагностической информативности (клиническая чувствительность, клиническая специфичность и диагностическая эффективность) нового оригинального набора реагентов соответствуют современным требованиям к

диагностическим наборам для выявления маркёров инфекционных заболеваний у человека. Это позволило представить набор реагентов «Лайн-Блот ВГЧ-профиль» для официальной регистрации в Российской Федерации в установленном законом порядке.

Выводы

1. Разработан новый оригинальный набор реагентов «Лайн-Блот ВГЧ-профиль» (комплект № 1 — IgG и комплект № 2 — IgM), предназначенный для скрининга антител к специфическим антигенам герпесвирусных инфекций человека, применение которого в практике здравоохранения позволяет в рамках одного диагностического лабораторного теста определять состояние гуморального иммунитета пациента дифференцированно в отношении каждого антигена

основных возбудителей герпесвирусных инфекций человека (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV), а также устанавливать предположительные сроки инфицирования в отношении VZV.

2. Клинические испытания, проведённые разработчиками набора реагентов, показали высокую диагностическую информативность определения IgG (96,7—99,7%) и IgM (95,6—98,7%) с использованием набора реагентов «Лайн-Блот ВГЧ-профиль», что позволило представить его к регистрации в Российской Федерации в качестве оригинального медицинского изделия для применения в учреждении здравоохранения.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davison A.J., Eberle R., Ehlers B., Hayward G.S., McGeoch D.J., Minson A.C., Thiry E. The order herpesvirales. *Archives of virology*. 2009; 154(1): 171—7.
2. Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. *Герпесвирусные инфекции человека: руководство для врачей (2-е издание)*. Исаков В.А., ред. СПб.: СпецЛит; 2013.
3. Whitley R.J. *Herpesviruses*. Baron S., ed. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. 1996; 68. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8157/>
4. Мурзич А.В., Голубев М.А. Герпетическая инфекция. *Южно-Российский медицинский журнал*. 1998; 3.
5. Gottlieb S.L., Douglas Jr.J.M., Schmid D.S., Bolan G., Iatesta M., Malotte C.K., Peterman T.A. Seroprevalence and correlates of herpes simplex virus type 2 infection in five sexually transmitted—disease clinics. *The Journal of infectious diseases*. 2002; 10: 1381—9.
6. Chayavichitsilp P., Buckwalter J.V., Krakowski A.C., Friedlande S.F. Herpes simplex. *Pediatrics in Review*. 2009; 4: 119—64.
7. Staras S.A., Dollard S.C., Radford K.W., Flanders W.D., Pass R.F., Cannon M.J. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988—1994. *Clinical Infectious Diseases*. 2006; 9: 1143—51.
8. Кускова Т.К., Белова Е.Г. Семейство герпесвирусов на современном этапе. *Лечащий врач*. 2004; 5: 611—9.
9. Шульженко А.Е., Викулов Г.Х., Тутушкина Т.В. Герпетические инфекции — настоящее и будущее. *Трудный пациент*. 2003; 4: 6—15.
10. Косова И.В. Факторы онкогенности возбудителей некоторых герпесвирусных инфекций. *Урология*. 2016; 3: 92—9.
11. Новикова С.В., Логотова Л.С., Бочарова И.И. Оптимизация ве-

- дения беременных с высоким инфекционным риском. *Русский медицинский журнал*. 2015; 1: 6—9.
12. Adams M.J., Carstens E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of virology*. 2012; 157(7): 1411—22.
13. Whitley R.J., Griffiths P.D. *Herpesviruses: An Introduction with a focus of Herpes simplex virus. Practical guidelines in antiviral therapy*. Amsterdam: Elsevier Science BV. 2002; 127—49.
14. Парахонский А.П. Герпесвирусные инфекции-иммунодефицитные заболевания XXI века. В сб.: *В мире научных открытий: Материалы XV Международной научно-практической конференции*. М.: Центр научной мысли; 2015; 14—7.
15. Самгин М.А., Халдин А.А. *Простой герпес (дерматологические аспекты)*. М.: МЕДпресс-информ. 2002.
16. Исаков В.А., Ермоленко Д.К., Ермоленко Е.И. *Герпесвирусные и папилломавирусные инфекции. Инфекции, передаваемые половым путем*. В.А. Аковбян, В.И. Прохоренков, Е.В. Соколовский, ред. М.: Медиа Сфера. 2007: 448—513.
17. Серебряная Н.Б., Егорова В.Н. *Новые подходы к терапии герпесвирусной инфекции*. СПб.: Новая альтернативная полиграфия; 2007.
18. Рахманова А.Г., Неверов В.А., Пригожина В.К. *Инфекционные болезни: Руководство для врачей общей практики. 2-е издание*. СПб.: Питер. 2001.
19. Ward K.N., Andrews N.J., Verity C.M., Miller E., Ross E.M. Human herpesviruses-6 and-7 each cause significant neurological morbidity in Britain and Ireland. *Archives of disease in childhood*. 2005; 90(6): 619—23.
20. Калугина М.Ю., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Бошьян Р.Е., Ермакова Т.М., Тебен'ков А.В. Актуальность диагностики инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6-го типа. *Детские инфекции*. 2012; 11(1): 60—3.
21. *Медицинская вирусология: Руководство*. Д.К. Львов, ред. М.: Медицинское информационное агентство; 2008.
22. *Методы лабораторной диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы: учебно-методическое пособие*. Л.И. Давыдов, ред. Астрахань: Астраханская медицинская академия; 2009.
23. Марданлы С.Г. Иммуноферментные тест-системы ЗАО «ЭКОлаб» для диагностики простого герпеса. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 2: 35—8.
24. Марданлы С.Г., Асратян А.А. Иммуноферментные тест-системы для диагностики цитомегаловирусной инфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008; 3: 98—9.
25. Марданлы С.Г., Арсеньева В.А., Акиншина Ю.А., Амелина Е.А., Захаров М.В., Никитина А.В. Разработка нового набора реагентов для скрининговой диагностики с целью одновременного обнаружения антител к каждому из основных возбудителей инфекций TORCH-группы методом линейного иммуноблоттинга. *Эпидемиология и инфекционные болезни: Актуальные вопросы*. 2014; 6: 24—9.
26. Balfour H.H. Jr., Dunmire S.K., Hogquist K.A. Infectious mononucleosis. *Clinical & Translational Immunology*. 2015; 4, e33.
- United States, 1988—1994. *Clinical Infectious Diseases*. 2006; 9: 1143—51.
8. Kuskova T.K., Belova E.G. The Family of herpes viruses at the present stage. *Lechashchiy vrach*. 2004; 5: 611—9. (in Russian)
9. Shul'zhenko A.E., Vikulov G.H., Tutushkina T.V. Herpes infections in humans — present and future [Gerpeticheskie infektsii u cheloveka — nastoyashchee i budushchee]. *Trudnyj patsient*. 2003; 4: 6—15. (in Russian)
10. Kosova I.V. Factors of oncogenic agents of some herpesvirus infections. *Urologiya*. 2016; 3: 92—9. (in Russian)
11. Novikova S.V., Logutova L.S., Bocharova I.I. Optimization of the management of pregnant women with high infectious risk. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; 1: 6—9. (in Russian)
12. Adams M.J., Carstens E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012). *Archives of virology*. 2012; 157(7): 1411—22.
13. Whitley R.J., Griffiths P.D. *Herpesviruses: An Introduction with a focus of Herpes simplex virus. Practical guidelines in antiviral therapy*. Amsterdam: Elsevier Science BV. 2002; 127—49.
14. Parakhonskiy A.P. The herpes simplex virus- is immunodeficiency disease of the XXI century [Gerpesvirusnye infektsii-immunodefitsitnye zabolevaniya XXI veka]. In: *V mire nauchnykh otkrytij Materialy XV Mezhduнародной nauchno-prakticheskoy konferentsii*. Moscow: Centr nauchnoy mysli; 2015. 14—17. (in Russian)
15. Samgin M.A., Khaldin A.A. *Herpes simplex (dermatological aspects) [Prostoy gerpes (dermatologicheskie aspekty)]*. Moscow: Medpress-inform; 2002. (in Russian)
16. Isakov V.A., Ermolenko D.K., Ermolenko E.I. Herpes and human papilloma virus infection [Gerpesvirusnye i papillomavirusnye infektsii]. In: Akoubian V.A., Prokhorenkov V.I., Sokolowski E.V., eds. *Sexually transmitted Infections [Infektsii, peredavaemye polovym putem]*. Moscow: Media-Sphere; 2007. (in Russian)
17. Serebryanaya N.B., Egorova V.N. *New approaches to the treatment of herpes infections [Novye podhody k terapii herpesvirusnoi infektsii]*. St. Petersburg: Novaya alternativnaya poligrafiya. 2007. (in Russian)
18. Rahmanova A.G., Neverov V.A., Prigozhina V.K. *The infectious diseases: A guide for general practitioners. [Infektsionnye bolezni: Rukovodstvo dlya vrachey obshchey praktiki. 2-e izdanie]*. St. Petersburg: Piter. 2001. (in Russian)
19. Ward K.N., Andrews N.J., Verity C.M., Miller E., Ross E.M. Human herpesviruses-6 and-7 each cause significant neurological morbidity in Britain and Ireland. *Archives of disease in childhood*. 2005; 90(6): 619—23.
20. Kalugina M.Yu., Karazhas N.V., Rybalkina T.N., Bosh'yan R.E., Ermakova T.M., Teben'kov A.V. The Relevance of diagnosis of infection caused by the human herpes virus-6th. *Detskie infektsii*. 2012; 11(1): 60—3. (in Russian)
21. L'vov D.K., ed. *Medical virology. Handbook [Meditsinskaya virusologiya: Rukovodstvo]*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2008. (in Russian)
22. Mardanly S.G. *Methods of laboratory diagnosis of infectious diseases of bacterial and viral nature: teaching manual [Metody laboratornoj diagnostiki infektsionnykh zabolevaniy bakterial'noj i virusnoj prirody: uchebno-metodicheskoe posobie*. L.I. Davydov, ed.]. Astrahan: Astrahanskaya gos. med. akad. 2009: 68. (in Russian)
23. Mardanly S.G. Immunoassay test systems CJSC «Ekolab» for the diagnosis of herpes simplex. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2008; 2: 35—8. (in Russian)
24. Mardanly S.G., Asratyan A.A. Enzyme Immunoassay system for the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Zhurnal mikrobiologii, ehpidemiologii i immunobiologii*. 2008; 3: 98—9. (in Russian)
25. Mardanly S.G., Arsen'eva V.A., Akinshina Yu.A., Amelina E.A., Zaharov M.V., Nikitina A.V. The Development of a new set of reagents for screening diagnostics with the aim of simultaneous detection of antibodies to each of the major turn-agents of infections of TORCH-group by the method of linear Western blot sections. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni: Aktual'nye voprosy*. 2014; 6: 24—9. (in Russian)
26. Balfour H.H. Jr., Dunmire S.K., Hogquist K.A. Infectious mononucleosis. *Clinical & Translational Immunology*. 2015; 4, e33.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.993.192.6-053.2-055.26-078

Боронина Л.Г.^{1,2}, Блинова С.М.², Саматова Е.В.²

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ТОКСОПЛАЗМОЗА У ДЕТЕЙ И БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН ИММУНОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ НА ТЕСТ-СИСТЕМАХ РАЗНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, кафедра клинической лабораторной диагностики и бактериологии, 620028, Екатеринбург, Россия;

²ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», лаборатория клинической микробиологии, 620149, Екатеринбург, Россия

Токсоплазмоз — заболевание, представляющее потенциальный риск для плода, поэтому при подозрении на внутриутробную инфекцию необходимо выявлять антитела к возбудителю данной инфекции. При исследовании 65 сывороток новорожденных, детей первого года жизни и беременных женщин антитела IgG обнаружены у 21,5 и 26,2% обследованных на тест-системах Euroimmun AG и Virion-Serion. IgM обнаружены у 9,4% обследованных на тест-системах обоих производителей. Для более достоверной верификации результатов выявления антител к токсоплазме необходимо исследовать avidность специфических IgG.

Ключевые слова: токсоплазмоз; антитела; внутриутробные инфекции.

Для цитирования: Боронина Л.Г., Блинова С.М., Саматова Е.В. Серологическая диагностика токсоплазмоза у детей и беременных женщин иммунохимическим методом на тест-системах разных производителей. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(1): 41-44. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-41-44>

Boronina L.G.^{1,2}, Blinova S.M.², Samatova E.V.²

THE SEROLOGICAL DIAGNOSTIC OF TOXOPLASMOSIS IN CHILDREN AND PREGNANT WOMEN USING IMMUNE CHEMICAL TECHNIQUE BY TEST-SYSTEMS OF VARIOUS MANUFACTURERS

¹The Federal state budget educational institution of higher education "The Ural state medical university" of Minzdrav of Russia, 620028 Yekaterinburg, Russia

²The state budget institution of health care "The oblast children clinical hospital №1", 620149 Yekaterinburg, Russia

The toxoplasmosis is a disease representing a potential risk for fetus. This is the reason to detect antibodies to agent of the given infection in case of any suspicion to intrauterine infection. The analysis was applied to 65 samples of blood serum of newborns, children of the first year of life and pregnant women. The IgG antibodies were detected in 21.5% and 26.2% of individuals examined by test-systems Euroimmun AG and Virion-Serion. The IgM antibodies were detected in 9.4% of individuals examined by test systems of both manufacturers. To make verification of the results of detection of antibodies to toxoplasmosis even more reliable avidity of specific IgG antibodies is to be analyzed.

Key words: toxoplasmosis; antibodies; intrauterine infection

For citation: Boronina L.G., Blinova S.M., Samatova E.V. The serological diagnostic of toxoplasmosis in children and pregnant women using immune chemical technique by test-systems of various manufacturers. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63 (1): 41-44. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-41-44>

For correspondence: Boronina L.G., doctor of medical sciences, professor, of the chair of clinical laboratory diagnostic and bacteriology of the Federal state budget educational institution of higher education "The Ural state medical university". e-mail: boroninalg@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 20.07. 2017

Accepted 01.08.2017

Введение. Токсоплазмоз — заболевание, представляющее потенциальный риск для плода и новорожденного. Обнаружение антител имеет принципиальное значение для прогнозирования опасности развития токсоплазмоза у плода и новорожденного и входит в диагностику TORCH-комплекса [1—3]. В Германии до 75% женщин фертильного возраста не имеют антител к токсоплазмам, это может привести к тяжёлым порокам развития плода или спонтанному аборт. При инфицировании

во время беременности возможна трансплацентарная передача *Toxoplasma gondii* на любой стадии развития плода, и последствия для новорожденного бывают разными в зависимости от времени инфицирования. Однако опасность трансплацентарной передачи возбудителя существует только у беременных, у которых обнаружены антитела (ранее инвазии не было) и возникла первичная инфекция [4, 5]. Анализ образцов крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики острой фазы инфекции у детей в большинстве случаев недостаточно информативен, отрицательный результат не позволяет достоверно исключить недавнее инфицирование. Серологические методы более предпочтительны как при диагностике острой фазы инфекции, так и

Для корреспонденции: Боронина Любовь Григорьевна, д-р мед. наук, проф. каф. клин. лаб. диагностики и бактериологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»; e-mail: boroninalg@mail.ru

ИММУНОЛОГИЯ

изучении специфического иммунитета, при этом стандартным методом является метод иммуноферментного анализа (ИФА). Наибольшую трудность представляет серологическая диагностика инфекций у недоношенных новорождённых с массой тела менее 1000 г [6, 7].

Целью настоящего исследования явилось сравнение результатов выявления антител к *T. gondii* в сыворотках крови методом ИФА на тест-системах разных производителей.

Материал и методы. Исследовали 65 сывороток крови, полученных от детей первого года жизни, а также беременных женщин перинатального центра, в 2016 г. Исследования проводились на тест-системах «Euroimmun AG», Германия — *Toxoplasma gondii* IgM, *Toxoplasma gondii* IgG; «Virion-Serion», Германия — «Serion ELISA classic», *T. gondii* G/M; аналитическая чувствительность ИФА на «Euroimmun AG» к *Toxoplasma gondii* IgG составляет 0,3 МЕ/мл в соответствии с третьим международным стандартом. В тест-системе «Virion-Serion», Германия, «SERION ELISA classic» *T. gondii* G/M результаты определялись в ЕД/мл, отличных от международных стандартов. Исследования на тест-системах «Euroimmun AG» проводились по мере поступления сывороток от больных в течение трех месяцев, рутинно, учёт результатов выполняли при длине волны 450 нм (согласно инструкции к тест-системам) на спектрофотометре

Labsystems Multiscan Plus, Финляндия; на тест-системах «Virion-Serion», Германия — одномоментно, для сравнения, учёт результатов при длине волны 405 нм на автоматическом ИФА-анализаторе Lazurite, США.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программного пакета Statistica, версия 6.0 («StatSoft Inc.», США).

Результаты и обсуждение. Поскольку результат количественных исследований на разных тест-системах оценивается в различных единицах, разработанных производителями, приведена только качественная сравнительная оценка. Сравнительная оценка результатов выявления антител к токсоплазме представлены в таблице 1. При исследовании IgM выявлены антитела у 9,4% обследованных как на тест-системе «Euroimmun AG», так и на «Virion-Serion». IgM обнаружены у двух детей в возрасте 3 и 6 мес, у трёх детей старше года и у одной беременной женщины. Сомнительные результаты обнаружены у 7,8% пациентов, обследованных на тест-системе «Euroimmun AG», тогда как у обследованных на тест-системе «Virion-Serion» сомнительных результатов не было. Не обнаружены антитела IgM у 82,8 и 90,6% обследованных на тест-системах «Euroimmun AG» и «Virion-Serion» соответственно.

IgG к токсоплазме не выявлены у 76,9% обследованных («Euroimmun AG») и 72,3% («Virion-Serion»),

Таблица 1

Сравнительные исследования наличия антител к *Toxoplasma gondii*

Результат ИФА	Антитела IgM к <i>T. gondii</i> (n = 64)			Антитела IgG к <i>T. gondii</i> (n = 65)		
	«Euroimmun», абс./%	p	«Virion-Serion», абс./%	«Euroimmun», абс./%	p	«Virion-Serion», абс./%
Антитела не обнаружены	53/82,8	0,2	58/90,6	50/76,9	0,54	47/72,3
Антитела обнаружены	6/9,4	1	6/9,4	14/21,5	0,54	17/26,2
Результат сомнительный	5/7,8	0,02	—/—	1/1,5	1	1/1,5
Совпадение результатов	Результаты не совпали в 5(8%) случаях			Результаты не совпали в 6 (9%) случаях		

Таблица 2

Результаты исследования сыворотки крови ребёнка с подозрением на внутриутробную инфекцию

Дата направления на исследование/тест-системы	03.11.2016	07.12.2016	12.01.2017	05.04.2017	03.11.2016
	«Euroimmun AG»	«Euroimmun AG»	«Euroimmun AG»	«Euroimmun AG»	«Virion-Serion»
Направительный диагноз	ВУИ*, гепатит	Гепатит	Гепатит	ЦМВ-инфекция	ВУИ, гепатит
ЦМВ IgM	+	+	+	—	#
ЦМВ IgG	#	+	+	+	#
ЦМВ авидность IgG, %	41,4 погр.	46 погр.	50,8 погр.	55 погр.	#
ВПГ 1/2 IgM	#	#	—	#	#
ВПГ IgG	#	#	+	#	#
ВПГ IgA	#	#	—	#	#
<i>T. gondii</i> IgM	+	—	—	#	—
<i>T. gondii</i> IgG	+	+	погр.	#	—
ВЭБ капсидный АГ IgM	#	#	+	#	#
ВЭБ капсидный АГ IgG	#	#	+	#	#
ВЭБ ранний АГ IgM	#	#	—	#	#
ВЭБ ранний АГ IgG	#	#	+	#	#
ВЭБ ядерный АГ IgG	#	#	+	#	#

Примечание. * — внутриутробная инфекция; «—» — антитела не обнаружены; «+» — антитела обнаружены; погр. — результат пограничный (в соответствии с инструкцией к тест-системе); # — тест не назначался.

сомнительный результат обнаружен у 1,5% обследованных на тест-системах обоих производителей.

Несмотря на то что при сравнении результатов, полученных на разных тест-системах, не получено значительных достоверных различий, вопрос об интерпретации каждого исследования важен для верификации диагноза, особенно при исследовании сыворотки крови новорождённых с подозрением на внутриутробную инфекцию и признаками инфекции TORCH.

При выявлении специфических антител к какому-либо возбудителю есть факторы, снижающие специфичность и ограничивающие возможности достоверной оценки результатов. Одна из причин сложностей в интерпретации — возможное присутствие в сыворотке крови так называемых ревматоидных антител. Ревматоидные факторы — это чаще всего аутоантитела класса М (IgM), связывающие иммунные комплексы антител класса G (IgG). Присутствие ревматоидных факторов — неспецифических антител IgM — может привести к ложноположительным результатам при определении специфических антител IgM. Также существует вероятность вытеснения специфических антител IgM с более слабыми связями специфическими же IgG-антителами с более сильными связями, конкурирующими за связывание с молекулами антигенов; в этом случае результаты определения IgM окажутся ложноотрицательными.

Для исключения влияния ревматоидных факторов пробы материала (сыворотки) необходимо предварительно обработать абсорбентом ревматоидного фактора (или каким-либо другим способом), который должен прилагаться к тест-системе или входить в её состав. В тест-системах многих производителей этап для нивелирования ревматоидных факторов не предусмотрен. В тест-системах «Euroimmun AG» и «Virion-Serion» предусмотрена предварительная инкубация исследуемой сыворотки с абсорбентом ревматоидного фактора, приложенным к тест-системе.

Среди возможных причин несовпадений результатов можно назвать активность антител к потенциально перекрёстным параметрам в исследуемой панели сывороток, например, поликлональная стимуляция выработки IgM вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ), парвовирусом В19, *Lues*-инфекции.

Одним из наиболее вероятных способов, увеличивающих достоверность диагностических исследований при определении этиологии инфекции, является, несомненно, неоднократное исследование сывороток крови.

У пациента С.Л. (мальчик, возраст на момент первого обследования 1,5 мес. определены антитела к цитомегаловирусу (ЦМВ) — IgM, IgG, авидность IgG; вирусу простого герпеса (ВПГ) ½ типа — IgM, IgA, IgG; *T. gondii* — IgM, IgG; ВЭБ — антител к капсидному антигену (АГ) — IgM, IgG, раннему АГ — IgM, IgG, ядерному АГ — IgG на тест-системах «Euroimmun AG», Германия. В тест-системе «Virion-Serion», Германия, *T. gondii* — IgM, *T. gondii* — IgG исследована сыворотка от 3.11.16. Результаты выявления антител у ребёнка с подозрением на внутриутробную инфекцию в цитомегаловирусу, герпесу 1, 2 типа, вирусу Эпштейн—Барра и токсоплазме представлены в табл. 2.

В инструкции к тест-системе сообщается об отсутствии перекрёстных взаимодействий с антителами к различным бактериям и вирусам, в том числе к вирусам герпес-группы (ЦМВ, вирус Эпштейна—Барр — ВЭБ). Но известно, что эти вирусы обладают поликлональной стимуляцией иммунного ответа. При исследовании ре-

зультатов определения антител у пациента С.Л. к различным инфектам, возможно, связанных с внутриутробным инфицированием, обращает на себя внимание, что в крови ребёнка выявлены как антитела к цитомегаловирусу, так и антитела к вирусу Эпштейна—Барр, свидетельствующие об инфицировании и, возможно, развитии заболевания, связанного с этим вирусом. При этом антитела IgG и IgM к *T. gondii* выявлены в крови от 03.11.16 и 07.12.16 и не были обнаружены позднее. При использовании тест-систем «Virion-Serion», Германия, *T. gondii* G/M антитела не были выявлены и в исследовании от 03.11.16. По-видимому, IgG к *T. gondii* в крови ребёнка являлись материнскими, а выявление IgM к *T. gondii* в сыворотке крови явилось следствием поликлональной стимуляции, характерной для вирусов герпес-группы, инфицирование которыми и последующее развитие инфекции, вызванной ими, было доказано.

Выявление антител IgM к *T. gondii* не является абсолютным доказательством протекающей первичной свежей инфекции. По литературным данным, IgM к *T. gondii* при первичном инфицировании могут сохраняться в течение года и более, IgA — в течение 45 мес. Благодаря поликлональной стимуляции, например ВЭБ, хотя IgM к токсоплазме могут быть выявлены, это не будет являться доказательством инвазии. Необходимо проводить дополнительное исследование, например, в сыворотках крови, взятых с интервалом 7—14 дн, или исследовать авидность специфических антител. Авидность специфических антител повышается с течением времени в процессе созревания антител.

При сравнении результатов, полученных на разных тест-системах, статистически достоверных различий не выявили. Возможно, несоответствие результатов обнаружения IgM и IgG к токсоплазме на тест-системах разных производителей связано, в том числе, с различиями в оценке единиц учёта и диапазоном пограничных значений. Необходимо отметить трудности в оценке результатов, связанные с не всегда корректным переводом оригинальной инструкции к тест-системе производителя.

Заключение. При исследовании 65 сывороток новорождённых, детей первого года жизни и беременных женщин антитела IgG обнаружены у 21,5 и у 26,2% обследованных в тест-системах «Euroimmun AG» и «Virion-Serion». IgM обнаружены у 9,4% обследованных на тест-системах обоих производителей. В 7,8% случаев обнаружены сомнительные результаты в тест-системе «Euroimmun AG» — IgM и в 1,5% при выявлении IgG («Virion-Serion» и «Euroimmun AG»).

Таким образом, для диагностики внутриутробной инфекции, вызванной токсоплазмами, недостаточно выявить только IgM и IgG, необходимо изучать авидность антител IgG к *T. gondii*.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 6 см. REFERENCES)

1. Заводнова О.С., Безроднова С.М., Боташева В.С., Кальная Т.В. Врожденный токсоплазмоз. *Российский педиатрический журнал*. 2005; 1: 13—6.
2. Боровкова Е.И., Сидорова И.С. Факторы и условия, влияющие на процесс инфицирования плода на разных сроках беременности. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2004; 1: 48—50.

4. Лобзин Ю.В., Васильев В.В. Токсоплазмоз у беременных: клинические проявления, терапия и медикаментозная профилактика врожденного токсоплазмоза. *Российский медицинский журнал*. 2001; 5: 40—1.
5. Макаров О.В., Бахарева И.В., Ганковская Л.В., Идрисова Л.В. Современные представления о диагностике внутриутробной инфекции. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2006; 6(6): 11—5.
7. Меньшиков В.В., ред. *Методики клинических лабораторных исследований: Справочное пособие*. М.: Лабора; 2009.
3. Karen E.J. *Overview of Torch infections (Perinatal TORCH infections)*. Yu.M. Bogdanov. UpToDate; 2002.
4. Lobzin Yu.V., Vasilyev V.V. Toxoplasmosis in pregnant women: clinical manifestations, therapy and medicamentous prophylaxis of congenital toxoplasmosis. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal*. 2001; 5: 40—1. (in Russian)
5. Makarov O.V., Bakhareva I.V., Gankovskaya L.V., Idrisova L.V. Modern concepts of the diagnosis of intrauterine infection. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*. 2006; 6(6): 11—5. (in Russian)
6. Lappalainen M., Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Ann. Ist. Super Sanita*. 2004; 40(1): 81—8.
7. Menshikov V.V., ed. *Methods of clinical laboratory research: A reference manual [Metody klinicheskikh issledovaniy. Spravochnik]*. M.: Labora; 2009. (in Russian)

REFERENCES

1. Zavodnova O.S., Bezrodnova S.M., Botasheva V.C., Kalnaya T.V. Congenital toxoplasmosis. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal*. 2005; 1: 13—6. (in Russian)
2. Borovkova E.I., Sidorova I.S. Factors and conditions affecting the process of infection of the fetus at different periods of pregnancy. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2004; 1: 48—50. (in Russian)

Поступила 20.07.17

Принята к печати 01.08.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.344-002-031.84-078.33

Гурина О.П.¹, Степанова А.А.¹, Дементьева Е.А.¹, Блинов А.Е.¹, Варламова О.Н.¹, Блинов Г.А.²

ОСОБЕННОСТИ АУТОИММУННЫХ РЕАКЦИЙ ПРИ БОЛЕЗНИ КРОНА У ДЕТЕЙ

¹Научно-исследовательский центр ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава РФ, 194100, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава РФ, 194100, Санкт-Петербург, Россия

Цель исследования — выявить особенности аутоиммунного реагирования у детей, страдающих болезнью Крона (БК). Обследованы 62 пациента в возрасте 2—17 лет с диагнозом болезни Крона (БК). Проведена оценка концентрации в сыворотке крови иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG, IgE, антител к *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) классов IgA, IgG и IgE, антител к *Candida albicans* классов IgA, IgM, IgG и IgE, антинейтрофильных цитоплазматических антител (ANCA) к миелопероксидазе (MPO), к протейназе 3 (PR3), антиядерных антител (ANA), антител к DNAs, DNAss (к двуспиральной и одноцепочечной ДНК), антител к антигенам тонкого и толстого кишечника, поджелудочной железы, циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). У 47(75,8%) из 62 пациентов с БК диагностирована гипериммуноглобулинемия. У большого числа (29, или 46,8%) пациентов выявлен повышенный уровень IgM в крови. Гипериммуноглобулинемия E зафиксирована у 19(30,6%) из 62 детей. Гипоиммуноглобулинемия отмечена у 22(35,5%) пациентов, из них у 17(77,3%) выявлена дисиммуноглобулинемия IV типа (изолированное снижение концентрации IgA).

Оценка частоты встречаемости специфических антител в сыворотке крови показала, что наиболее часто (в 70,9%) у пациентов отмечается наличие специфических IgE к *Saccharomyces cerevisiae*. У 22(35,5%) пациентов выявлен повышенный уровень ASCA (IgA, IgG). Концентрация антител к DNAs, DNAss в крови превышала норму у 4,8 и 16,1% пациентов соответственно. Повышенный уровень ЦИК выявлен у 20(32,3%) больных. Концентрация ANA у всех 62(100%) пациентов соответствовала норме.

При оценке результатов корреляционного анализа обращают на себя внимание сильная положительная корреляция концентраций в крови антител к антигенам тонкого и толстого кишечника; средней степени положительная корреляция уровня антител к антигенам тонкого кишечника и IgM, ANCA PR3, ASCA IgE, антител к *Candida albicans* классов IgM, IgG, IgE, антител к антигенам поджелудочной железы; средняя степень положительной корреляции между концентрациями антител к антигенам толстого кишечника и IgA, IgM, ЦИК, ANCA PR3, DNAss, ASCA IgE, антителами к антигенам поджелудочной железы; сильная положительная корреляционная связь между концентрациями IgA к *Candida albicans* и ANA. Обнаружение аутоантител к *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, ANCA, антигенам тонкого и толстого кишечника, поджелудочной железы и выраженная степень корреляции многих показателей аутоиммунного реагирования указывают на интенсивность иммунопатологического процесса при БК. Появление антител к ASCA при БК является прогностически неблагоприятным признаком. Иммунологическая диагностика при БК необходима для оценки тяжести течения заболевания, дифференциальной диагностики, определения прогноза и подбора индивидуальной иммунокорректирующей терапии.

Ключевые слова: болезнь Крона; аутоиммунная реакция; иммуноглобулин; аутоантитела; дети.

Для цитирования: Гурина О.П., Степанова А.А., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Блинов Г.А. Особенности аутоиммунных реакций при болезни Крона у детей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(1): 44-50

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821.0869-2084-2018-63-1-44-50>

Gurina O.P., Stepanova A.A., Dementieva E.A., Blinov A.E., Varlamova O.N., Blinov G.A.

THE CHARACTERISTICS OF AUTOIMMUNE REACTIONS UNDER CROHN'S DISEASE

The Federal state budget educational institution of higher education "The St. Petersburg state pediatric medical university" of Minzdrav of Russia, 194100 St. Petersburg, Russia

The purpose of study is to establish features of autoimmune reaction of children with Crohn's disease. The sampling included 62 patients aged from 2 to 17 years with diagnosis of Crohn's disease. The evaluation was carried out concerning concentration in blood serum of immunoglobulins IgA, IgM, IgG, IgE, antibodies to Saccharomyces cerevisiae (ASCA) classes IgA, IgG u IgE, antibodies to Candida albicans classes IgA, IgM, IgG u IgE, anti-neutrophilic cytoplasmic antibodies (ANCA) to myeloperoxidase (MPO), to proteinase 3 (PR3), anti-nuclear antibodies (ANA), antibodies to DNAs, DNAss (to double-helical and single-stranded DNA), antibodies to antigens of small and large intestines, pancreas, circulating immune complexes. The hyperimmunoglobulinemia was diagnosed in 47 (75.8%) out of 62 patients with Crohn's disease. The increased level of IgM in blood was detected in 29 patients (46.8%). The hyperimmunoglobulinemia Y was established in 19 (30.6%) out of 62 children. The hypimmunoglobulinemia was detected in 22 (35.5%) of patients and in 17 (77.3%) out of them the disimmunoglobulinemia type IV (isolated decreasing of concentration of IgA). The evaluation of rate of occurrence of specific antibodies in blood serum demonstrated that in patients most frequently was detected presence of specific IgE to Saccharomyces cerevisiae (70.9%). The increased level of ASCA (IgA, IgG) was detected in 22 (35.5%) patients. The concentration of antibodies to DNAs, DNAss in blood exceeded standard value in 4.8% and 16.1% patients correspondingly. The increased level of circulating immune complex was established in 20 (32.3%) patients. The concentration of ANA corresponded to standard values in all 62 (100%) patients.

The evaluation of results of correlation analysis established a strong positive correlation of concentration in blood of antibodies to antigens of small and large intestines; average positive correlation of level of antibodies to antigens of small intestine and IgM, ANCA PR3, ASCA IgE, antibodies to Candida albicans classes IgM, IgG, IgE, antibodies to antigens of pancreas; average degree of positive correlation between concentration of antibodies to antigens of large intestine and IgA, IgM, circulating immune complex, ANCA PR3, DNAss, ASCA IgE, antibodies to antigens of pancreas; strong positive correlation between concentrations of IgA to Candida albicans and ANA. The detection of auto- to antibodies Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans, ANCA, antigens of small and large intestines, pancreas and expressed degree of correlation of many indices of autoimmune reaction indicate to intensity of immune pathological process under Crohn's disease. Under Crohn's disease, the formation of antibodies to ASCA is a prognostically unfavorable sign. The immune diagnostic under Crohn's disease is necessary for evaluating severity of course of disease, differential diagnostic, establishment of prognosis and selection of individual immune correcting therapy.

Key words: Crohn's disease; autoimmune reaction; immunoglobulin; auto-antibody; children

For citation: Gurina O.P., Stepanova A.A., Dementieva E.A., Blinov A.E., Varlamova O.N., Blinov G.A. The characteristics of autoimmune reactions under Crohn's disease. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic)* 2018; 63 (1): 44-50. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-44-50>

For correspondence: Stepanova A.A., candidate of medical sciences, junior researcher of the laboratory of clinical immunology of the Federal state budget educational institution of higher education "The St. Petersburg state pediatric medical university". e-mail: doktor.aas@gmail.com

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 28.07.2017
Accepted 03.08.2017

Введение. Болезнь Крона — хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта с прогрессирующим поражением кишечника, развивающееся на фоне потери толерантности к нормальным антигенам пищи, в основе патогенеза которого лежат аутоиммунные реакции [1—3]. Тяжесть течения болезни Крона определяется тяжестью текущего обострения, наличием внекишечных проявлений и осложнений, развитием гормонозависимости и гормонорезистентности [1—8]. По данным эпидемиологических исследований, в 20% случаев болезнь Крона дебютирует в возрасте до 18 лет [2, 4, 9, 10]. Отмечается тенденция к неуклонному росту частоты заболевания со значительным увеличением числа детей среди наблюдаемых пациентов, что указывает на необходимость ранней диагностики и назначения адекватной терапии [3, 8—10].

В настоящее время большое значение имеет поиск иммунологических маркеров, позволяющих диагностировать болезнь Крона на ранних стадиях развития заболевания [3, 4, 11, 12]. Выявление специфических аутоантител при иммунологической диагностике у пациентов с болезнью Крона доказывает аутоиммунный характер заболевания [1—3, 6, 11, 13]. Повышенная проницаемость слизистой оболочки кишечника создаёт предпосылки для усиленной антигенной нагрузки и, как следствие, ло-

кального и системного высвобождения медиаторов воспаления [2, 3, 13]. В диагностике болезни Крона оценка иммунологического статуса является необходимой для совершенствования точности дифференциального диагноза с большим спектром воспалительных заболеваний кишечника различной этиологии и системными васкулитами [2—7].

При иммунологическом обследовании у ряда пациентов с болезнью Крона выявляют признаки недостаточности иммунного ответа, проявляющиеся в виде гипои муноглобулинемии [14, 15]. Классификация типов дисиммуноглобулинемии в зависимости от варианта гипои муноглобулинемии представлена в табл. 1 [16—19].

В ряде исследований подчёркивается, что иммунодефицит является не тотальным снижением всех иммунных реакций, а снижением конкретных функций на фоне усиления других в виде реакций гиперчувствительности и аутоиммунных процессов [14, 16, 19]. Данные сведения указывают на возможность существования патогенетической взаимосвязи иммунодефицита и болезни Крона [14].

Цель исследования: выявить особенности аутоиммунного реагирования у детей, страдающих болезнью Крона.

Таблица 1

Типы дисиммуноглобулинемии в зависимости от варианта гипоиммуноглобулинемии

Тип дисиммуноглобулинемии	Ig A	Ig M	IgG
I	↓	↓	N
II	↓	N	↓
III	N	N	↓
IV	↓	N	N
V	N	↓	N
VI	N	↓	↓
VII	↓	↓	↓

Примечание. N — концентрация в норме.

Материал и методы. Обследованы 62 пациента с ранее установленным диагнозом болезни Крона (БК), из них 33 мальчика и 29 девочек.

В условиях специализированной лаборатории клинической иммунологии НИЦ СПбГПМУ определена концентрация в сыворотке крови иммуноглобулинов классов IgA, IgM, IgG, IgE (реакция преципитации, иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием набора «Алкор-Био», Россия), антител к *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) классов IgA, IgG и IgE, антител к *Candida albicans* классов IgA, IgM, IgG и IgE, антинейтрофильных цитоплазматических антител (ANCA) к миелопероксидазе (MPO) и протеиназе 3 (PR3), антинуклеарных антител (ANA), антител к DNAds, DNAss (к двухспиральной и одноцепочечной ДНК) (ИФА с использованием набора «Orgentic», Германия), антител к антигенам тонкого и толстого кишечника, поджелудочной железы (ИФА с использованием набора «Навина», Россия), циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Оценка концентраций IgA, IgM, IgG, общего и специфических (к *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida albicans*) IgE в сыворотке крови проводилась в соответствии со стандартными нормами, установленными в зависимости от возраста обследуемого пациента [9, 14, 18]. Допустимые значения концентраций антител к DNAds, DNAss в сыворотке крови — 0—20 Ед/мл [18]. Нормой концентрации ЦИК в сыворотке крови считали 0—54 усл. ед. [14, 18]. Нормальные значения концентрации ASCA IgA и IgG в сыворотке крови — 0—10 Ед/мл [11]. Концентрации в сыворотке крови антител к *Candida albicans* (IgA, IgM, IgG), ANCA MPO, ANCA PR3, ANA оценивали в соответствии с коэффициентом позитивности — 0—1 [13, 18]. Коэффициент позитивности для антител к антигенам тонкого и толстого кишечника, поджелудочной железы — 0—1,1.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием стандартных пакетов программ прикладного статистического анализа (Microsoft Office Excel 2010, Statistica for Windows v. 6.1). Методы описательной статистики включали оценку среднего арифметического (M), ошибки среднего значения (m) и среднеквадратичного отклонения (σ) для признаков, имеющих нормальное распределение. Для оценки взаимозависимости величин использованы методы корреляционного анализа. Сила корреляционной связи оценивалась по следующей классификации: сильная связь — ±0,7—1; средняя — ±0,3—0,699; слабая — ±0—0,299.

Результаты. Возраст 62 пациентов с БК на момент обследования колебался в интервале 2—17 лет (средний возраст 11,9 ± 0,5 года). У 56(90,3%) из 62 больных с БК выявлены изменения концентрации иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG, IgE в сыворотке крови (табл. 2).

Гипериммуноглобулинемия с различными сочетаниями повышенных концентраций иммуноглобулинов диагностирована у 47(75,8%) из 62 пациентов. Повышенный уровень IgM (1,46 ± 0,10 г/л) в сыворотке крови выявлен у наибольшего числа пациентов с БК — у 29(46,8%) из 62 больных. Гипериммуноглобулинемия E (301,9 ± 49,9 МЕ/мл) зафиксирована у 19(30,6%) из 62 детей. У 3(4,8%) из 62 больных диагностирован «иммуноглобулиновый взрыв», характеризующийся сочетанным повышением концентраций IgA, IgM и IgG в крови. Гипоиммуноглобулинемия отмечена у 22(35,5%) из 62 обследованных пациентов, из них I тип дисимму-

ноглобулинемии (сочетанное снижение концентраций IgA и IgM) выявлен у 1(4,55%) пациента, II тип (сочетанное снижение содержания IgA и IgG) — у 3(13,6%), III тип (гипоиммуноглобулинемия G) — у 1(4,55%), IV тип (снижение концентрации IgA) — у 17(77,3%).

Проведена оценка частоты встречаемости диагностически значимых концентраций специфических антител в сыворотке крови у больных с БК (рис. 1). Установлено, что наиболее часто у пациентов отмечалось наличие специфических IgE к *Saccharomyces cerevisiae* — в 70,9% (у 44 из 62 пациентов), IgE к *Candida albicans* — в 66,1% (у 41 из 62 детей), антител к антигенам толстого кишечника — в 59,7% случаев (у 37 из 62 больных).

У 22(35,5%) из 62 обследованных пациентов с БК диагностировано повышение концентрации ASCA (IgA, IgG). Уровень ASCA IgA (19,7 ± 2,8 Ед/мл) превышал норму у 10(16,1%) из 62 больных, повышенный уровень ASCA IgG (29,2 ± 4,7 Ед/мл) выявлен у 20(32,3%) из 62 детей.

Превышающая норму концентрация антител к DNAds (42,9 ± 4,2 Ед/мл), DNAss (43,8 ± 7,6 Ед/мл) в сыворотке крови диагностирована у 3(4,8%) и у 10(16,1%) из 62 больных соответственно. Повышенный уровень ЦИК (78,6 ± 7,0 усл.ед.) в сыворотке крови выявлен у 20(32,3%) из 62 больных.

У 62 обследованных пациентов проведена диагностика наличия в сыворотке крови антител к *Candida albicans* (IgA, IgM, IgG), ANCA MPO, ANCA PR3, анти-

Таблица 2

Частота и уровень изменения концентрации иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG, IgE в сыворотке крови у 62 пациентов с БК, %

Наименование	IgA, г/л	IgM, г/л	IgG, г/л	IgE, МЕ/мл
Повышение концентрации				
Концентрация	3,10 ± 0,07	1,46 ± 0,10	16,7 ± 0,6	301,9 ± 49,9
Частота	12,9%	46,8%	33,9%	30,6%
	(n = 8)	(n = 29)	(n = 21)	(n = 19)
Понижение концентрации				
Концентрация	1,1 ± 0,04	0,6	8,1 ± 0,1	—
Частота	33,9%	1,6%	6,5%	—
	(n = 21)	(n = 1)	(n = 4)	

Таблица 3

Корреляционные связи между концентрациями антител в сыворотке крови у пациентов с БК (коэффициент Пирсона r)

№	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	0,40	0,12	-0,16	-0,01	0,31	0,07	-0,09	-0,22	0,41	0,16	0,39	-0,10	-0,03	-0,01	0,42	0,23	0,44	0,19	0,25	
2		0,40	-0,15	0,36	-0,07	-0,27	0,16	-0,12	0,16	0,28	0,38	0,13	-0,01	0,10	0,12	0,32	0,54	0,39	-0,37	
3			-0,02	0,27	0,07	0,03	0,16	-0,24	-0,14	0,32	0,07	-0,10	-0,16	0,01	0,27	0,14	0,36	0,07	-0,49	
4				-0,07	0,03	0,04	0,06	0,23	-0,12	-0,33	-0,05	0,31	0,37	0,46	-0,30	0,11	-0,01	-0,05	0,67	
5					-0,18	0,13	0,53	0,21	-0,04	0,60	0,49	0,37	0,22	0,43	0,06	0,08	0,32	0,40	-0,15	
6						0,66	0,00	-0,06	-0,06	-0,05	0,20	-0,10	-0,03	-0,25	0,26	0,14	0,22	0,19	0,68	
7							0,03	-0,01	-0,03	-0,04	0,05	-0,24	-0,15	-0,02	-0,07	-0,01	0,15	0,17	0,59	
8								0,35	0,06	0,58	0,32	0,11	-0,17	0,49	-0,06	0,44	0,54	0,29	0,01	
9									-0,13	-0,04	-0,12	-0,12	-0,27	0,20	-0,34	0,04	0,15	-0,12	0,44	
10										0,19	-0,07	-0,01	-0,10	0,08	0,14	0,17	0,28	0,14	-0,63	
11											0,28	0,35	0,13	0,44	0,06	0,29	0,30	0,51	0,03	
12												0,43	0,51	0,25	0,20	0,40	0,53	0,63	0,69	
13													0,73	0,28	-0,04	0,30	0,17	0,40	0,15	
14														0,22	0,11	0,33	0,13	0,54	-0,07	
15															-0,19	0,30	0,25	0,19	0,20	
16																	-0,20	-0,01	-0,14	0,83
17																		0,78	0,57	-0,43
18																			0,56	0,06
19																				-0,25

Примечание. Условные обозначения заголовков строк и столбцов: 1 — IgA; 2 — IgM; 3 — IgG; 4 — IgE; 5 — ЦИК; 6 — ASCA IgA; 7 — ASCA IgG; 8 — ANCA PR3; 9 — ANCA MPO; 10 — DNAds; 11 — DNAss; 12 — ASCA IgE; 13 — *Candida albicans* IgM; 14 — *Candida albicans* IgG; 15 — *Candida albicans* IgE; 16 — *Candida albicans* IgA; 17 — антитела к антигенам тонкого кишечника; 18 — антитела к антигенам толстого кишечника; 19 — антитела к антигенам поджелудочной железы; 20 — ANA.

тел к антигенам тонкого и толстого кишечника, поджелудочной железы. Частота выявления диагностически значимых титров этих антител у больных и соотношения их коэффициентов позитивности представлены на рис. 1 и 2.

Установлено, что концентрация ANA у пациентов в 100% случаев соответствует норме (коэффициент позитивности $0,40 \pm 0,06$).

При корреляционном анализе у пациентов с БК установлен ряд корреляционных связей различной интенсивности и направления, указывающих на наличие зависимости между концентрациями в крови антител, участвующих в аутоиммунных механизмах патогенеза БК (табл. 3).

При оценке результатов корреляционного анализа обращают на себя внимание:

— сильная положительная корреляция концентраций в крови антител к антигенам тонкого и толстого кишечника (коэффициент Пирсона $r = 0,78$);

— положительная корреляция средней степени уровня антител к антигенам тонкого кишечника и IgM, ANCA PR3, ASCA IgE, антител к *Candida albicans* Ig M, G, E, антител к антигенам поджелудочной железы (коэффициенты Пирсона $r = 0,3—0,57$);

— положительная корреляция средней степени между концентрациями антител к антигенам толстого кишечника и IgA, IgM, ЦИК, ANCA PR3, DNAss, ASCA IgE, антител к антигенам поджелудочной железы (коэффициенты Пирсона $r = 0,3—0,56$);

— сильная положительная корреляционная связь

между концентрациями IgA к *Candida albicans* и ANA (коэффициент Пирсона $r = 0,83$);

— положительная корреляция средней степени, по интенсивности приближающаяся к сильной связи, между ANA и IgE (коэффициент Пирсона $r = 0,67$);

— положительные корреляции средней степени, близкие по интенсивности к сильной, между ANA и антителами к *Saccharomyces cerevisiae* ASCA IgE, ASCA IgA и ASCA IgG (коэффициенты Пирсона $r = 0,69$; $0,68$ и $0,59$ соответственно).

Обсуждение. Мы представили результаты оценки концентраций иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG, IgE, ASCA IgA, IgG и IgE, антител к *Candida albicans* IgA, IgM, IgG и IgE, ANCA MPO и PR3, антиядерных антител ANA, антител к DNAds, DNAss, антител к антигенам тонкого и толстого кишечника, поджелудочной железы, ЦИК в крови у 62 пациентов с болезнью Крона в возрасте 2—17 лет и анализ корреляционных взаимосвязей данных показателей у обследованных пациентов.

В результате исследования обнаружен ряд признаков иммуноагрессии при БК. У больных с БК выявлены изменения в гуморальном звене иммунной защиты. У 47(75,8%) пациентов диагностирована гипериммуноглобулинемия с различными сочетаниями повышенных концентраций иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG, IgE. Это указывает на выраженную активность хронического аутоиммунного воспалительного процесса, что характерно для БК [2, 3, 13, 20]. Наиболее часто — у 29(46,8%) пациентов с БК отмечается повышенный уровень IgM в сыворотке крови. Гипериммуноглобулинемия E зафик-

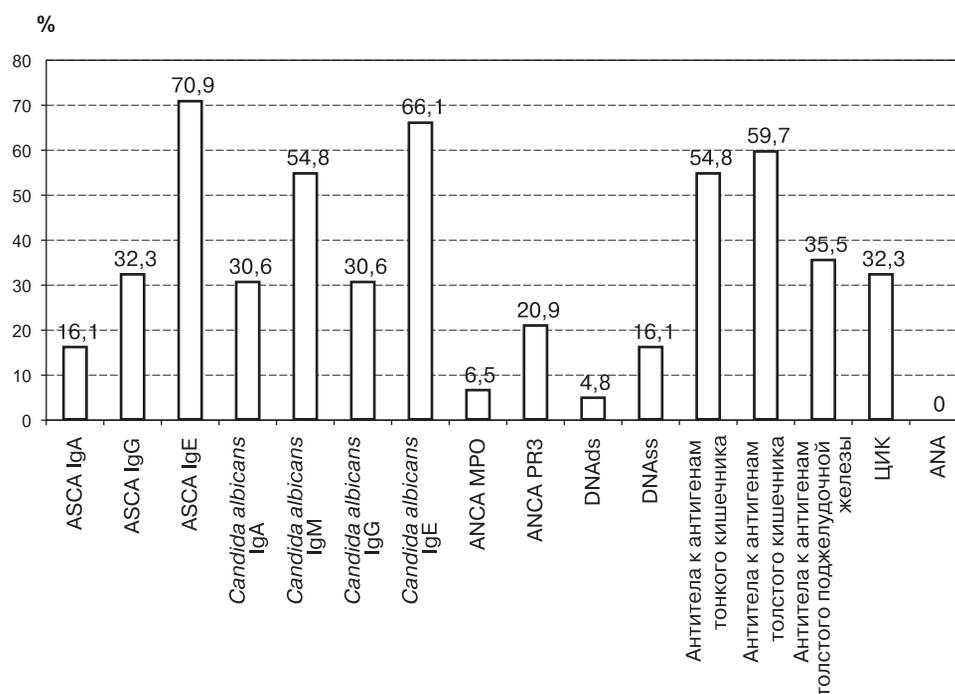


Рис. 1. Частота выявления диагностически значимых концентраций специфических антител у 62 пациентов с БК, %.

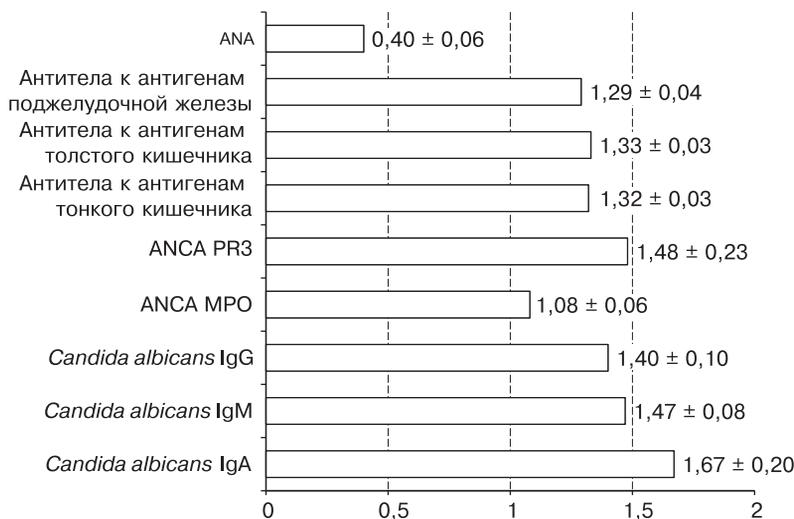


Рис. 2. Коэффициент позитивности специфических антител у пациентов с БК.

сирована у 19(30,6%) из 62 детей, средняя концентрация общего IgE в сыворотке крови этих пациентов достигала 301,9 МЕ/мл. У 3(4,8%) обследованных больных диагностирован «иммуноглобулиновый взрыв», что указывает на выраженную интенсивность иммунной реакции при БК с вовлечением комплекса факторов гуморального звена иммунной системы.

У 22(35,5%) из 62 обследованных пациентов отмечено снижение концентрации IgA, IgM, IgG в сыворотке крови. У 17(77,3%) из них выявлена дисиммуноглобулинемия IV типа (изолированное снижение концентрации IgA), что согласуется с данными исследований, указывающих на то, что дисиммуноглобулинемия IV типа явля-

ется наиболее часто встречающимся вариантом гипои- муноглобулинемии [14—16, 18]. Выявленное наличие гипои- муноглобулинемии у обследованных больных с БК согласуется с данными исследований, указывающих на тесную взаимосвязь гипои- муноглобулинемии как проявления снижения части функций иммунной системы и аутоиммунных реакций как варианта гиперфунк- ции в других отделах иммунной системы [14, 16].

Оценка частоты встречаемости диагностически зна- чимых концентраций специфических антител в сыво- ротке крови у 62 больных с БК показала, что наиболее часто у пациентов отмечалось наличие специфических IgE к *Saccharomyces cerevisiae* — в 70,9% случаев (у 44

человек). Появление аутоантител ASCA при болезни Крона расценивается как прогностически неблагоприятный признак, сопровождающий осложнённое течение заболевания с частыми эпизодами кишечной непроходимости [11, 21—24]. Установлено, что концентрация ASCA IgE в крови имеет прямые корреляционные связи средней степени интенсивности с IgA, IgM, ЦИК, ANA и рядом специфических антител, и среди данных показателей наиболее сильная прямая корреляция выявлена между ASCA IgE и ANA. Отмечено, что ANA также в значительной степени коррелирует с ASCA IgA и IgG. При этом, согласно полученным нами результатам, из всех рассмотренных показателей иммунного реагирования концентрация ANA у 62 пациентов в 100% случаев соответствует норме.

Анализ коэффициентов позитивности специфических антител в сыворотке крови у 62 пациентов с БК выявил, что антитела IgA к *Candida albicans* имеют наиболее высокую концентрацию среди рассмотренных специфических антител. Концентрация IgA к *Candida albicans* в крови имеет сильную прямую корреляцию с уровнем ANA и обратные корреляции средней степени с IgE и ANCA MPO. Также обращает на себя внимание высокий коэффициент позитивности антител ANCA PR3, являющихся прогностически неблагоприятным показателем течения аутоиммунного процесса [13, 16, 25, 26].

Повышенный уровень ЦИК, рассматриваемых как предиктор аутоиммунного воспалительного процесса, выявлен в сыворотке крови у 20(32,3%) из обследованных больных, концентрация ЦИК коррелировала с уровнями ANCA PR3, DNAss и ASCA IgE в крови. Это подтверждает участие аутоиммунного механизма в патогенезе воспалительной реакции при БК [3, 13, 21, 22, 25, 27].

Отмечено, что уровни специфических аутоантител к антигенам тонкого и толстого кишечника имеют между собой сильную прямую корреляционную взаимосвязь, а также значительное количество прямых корреляционных связей средней степени интенсивности с концентрациями других рассмотренных нами показателей (IgA, IgM, ЦИК, ANCA PR3, DNAss, ASCA IgE, антител к *Candida albicans* Ig M,G,E), что указывает на их выраженную роль в формировании аутоиммунного воспаления при БК [13, 21, 22, 26].

Заключение. Полученные результаты подтверждают наличие аутоиммунного воспаления у детей, страдающих болезнью Крона. Обнаружение аутоантител к *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, антигенам цитоплазмы нейтрофилов, антигенам тонкого и толстого кишечника, поджелудочной железы и выраженная степень корреляции многих показателей аутоиммунного реагирования позволяют судить об интенсивности иммунопатологического процесса при БК. Выявление гипериммуноглобулинемии свидетельствует об активности аутоиммунного хронического воспалительного процесса. Наличие аутоантител ASCA при БК является прогностически неблагоприятным признаком.

Иммунологическая диагностика при болезни Крона необходима для оценки тяжести течения заболевания, оптимизации дифференциальной диагностики, определения прогноза и подбора индивидуальной иммунокорректирующей терапии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ивашкин В.Т., Лапина Т.Л., ред. *Гастроэнтерология. Национальное руководство*. М.: ГЭОТАР Медиа; 2008.
2. Денисова М.Ф., Дыба М.Б. Болезнь Крона у детей. Особенности клиники и диагностики. *Современная педиатрия*. 2009; 6(28): 83.
3. Маев И.В., Андреев Д.Н., Дичева Д.Т., Великанов Е.В. *Болезнь Крона: этиопатогенез, диагностика и консервативное лечение. Пособие для врачей*. М: Прима Принт; 2016.
4. Березенко В.С. К вопросу об особенностях течения, диагностики и лечения болезни Крона у детей. *Современная педиатрия*. 2010; 5(33): 167.
5. Венедиктова М.М. *Взаимосвязь клинических, лабораторных и эндоскопических критериев активности болезни Крона у детей*. Дис. ... канд. мед. наук. М.; 2014.
6. Корниенко Е.А., Ломакина Е.А., Залетова Н.К., Факина С.А. Топические стероиды в лечении воспалительных заболеваний кишечника у детей. *Современная педиатрия*. 2012; 8(48): 111.
7. Мацукова Б.О., Эрдес С.И., Ратникова М.А. Системные проявления хронических воспалительных заболеваний кишечника у детей. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2009; 19(2): 65—9.
8. Назаренко О.Н., Манулик Н.А., Тимошенко Е.С., Данькова Т.Н. Некоторые клинические особенности болезни Крона у детей. *Вопросы детской диетологии*. 2016; 14(3): 53—4.
9. Турчунович М.В., Бовбель И.Э. Особенности клинической картины и диагностики болезни Крона в подростковом возрасте. *Педиатрия. Восточная Европа*. 2015; 2(10): 138—48.
10. Cosnes J., Gower-Rousseau C., Seksik P., Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011; 140: 1785—94.
11. Bertin D., Grimaud J.C., Lesavre N., Benelmouloud C., Desjeux A., Garcia S. et al. Targeting Tissue Immune Response Improves Diagnostic Performance of Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibodies (ASCA) in Crohn's Disease. *PLOS ONE*. 2013; 8(11): e80433.
12. Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin. Chem*. 2006; 52(2): 171—81.
13. Prideaux L., De Cruz P., Ng S.C., Kamm M.A. Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Inflamm. Bowel Dis*. 2012; 18: 1340—55.
14. Корниенко Е.А., Крупина А.Н., Калинина Н.М., Бычкова Н.В. Иммунодефицитные состояния при воспалительных заболеваниях кишечника у детей. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2015; 5(117): 94.
15. Гурина О.П., Деметьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Тихомирова В.И. Некоторые иммунологические аспекты болезни Крона у детей. В кн.: *Материалы VIII российского форума с международным участием «Педиатрия Санкт-Петербурга: опыт, инновации, достижения»*. СПб.: ИТС «Символ»; 2016: 37—8.
16. Васильев А.Г., Чурилов Л.П. *Иммунология и иммунопатология*. СПб.: СОТИС; 2006.
17. Галактионов В.Г. *Иммунология: учебник для студентов ВУЗов*. 3-е изд. М.: Издательский центр «Академия»; 2004.
18. Калинина Н.М., Кетлинский С.А., Оковитый С.В., Шуленин С.Н. *Заболевания иммунной системы. Диагностика и фармакотерапия*. М.: Эксмо; 2008.
19. Пампура А.Н. Фармакотерапия аллергических заболеваний и первичных иммунодефицитов у детей. В кн.: Царегородцев А.Д., Таболин В.А., ред. *Руководство по фармакотерапии в педиатрии и детской хирургии: В 8 т.* М.: Медпрактика-М; 2006; 7.
20. Гурина О.П., Деметьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Блинов Г.А. Иммунологический профиль у детей с болезнью Крона. *Медицинская иммунология*. 2017; 19 (Специальный выпуск): 111.
21. Israeli E., Grotto I., Gilburd B., Balicer R.D., Goldin E., Wiik A. et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Gut*. 2005; 54(9): 1232—6.
22. Rinaldi M., Perricone R., Blank M., Perricone C., Shoenfeld Y. Anti-Saccharomyces cerevisiae autoantibodies in autoimmune diseases: from bread baking to autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol*. 2013; 45(2): 152—61.

23. Zhang Z., Li C., Zhao X., Lv C., He Q., Lei S. et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies associate with phenotypes and higher risk for surgery in Crohn's disease: a meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.* 2012; 57(11): 2944—54.
24. Gologan S., Iacob R., Preda C., Vadan R., Cotruta B., Catuneanu A.M. et al. Higher titers of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies IgA and IgG are associated with more aggressive phenotypes in Romanian patients with Crohn's disease. *J. Gastrointest. Liver Dis.* 2012; 21(1): 39—44.
25. Danese S., Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology.* 2006; 12(30): 4807—12.
26. Lewis J.D. The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2011; 140(6): 1817—26.
27. Гурина О.П., Дементьева Е.А., Блинов А.Е., Варламова О.Н., Блинов Г.А. Аутоиммунные реакции при болезни Крона у детей. В кн.: *Материалы XI российского форума «Здоровье детей: профилактика и терапия социально-значимых заболеваний. Санкт-Петербург — 2017».* СПб.: ИТЦ «Символ»; 2017.
14. Kornienko E.A., Krupina A.N., Kalinina N.M., Bychkova N.V. Immunodeficiency states in inflammatory bowel diseases in children. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya.* 2015; 5(117): 94. (in Russian)
15. Gurina O.P., Dement'eva E.A., Blinov A.E., Varlamova O.N., Tikhomirova V.I. *Some immunological aspects of Crohn's disease in children. VIII Russian forum with international participation «Pediatrics of St. Petersburg: experience, innovations, achievements».* [VIII Rossiyskiy forum s mezhdunarodnym uchastiem «Pediatriya Sankt-Peterburga: opyt, innovatsii, dostizheniya»]. St. Petersburg: ITC «Simvol»; 2016. (in Russian)
16. Vasil'ev A.G., Churilov L.P. *Immunology and immunopathology. [Imunologiya i immunopatologiya].* St. Petersburg: SOTIS; 2006. (in Russian)
17. Galaktionov V.G. *Immunology: a textbook for university students. [Imunologiya: uchebnik dlya studentov VUZov].* 3d ed. Moscow: Izdatel'skiy tsentr «Akademiya»; 2004. (in Russian)
18. Kalinina N.M., Ketlinskiy S.A., Okovityy S.V., Shulenin S.N. *Diseases of the immune system. Diagnosis and pharmacotherapy. [Zabolevaniya immunoj sistemy. Diagnostika i farmakoterapiya].* Moscow: Eksmo; 2008. (in Russian)
19. Pampura A.N. Pharmacotherapy of allergic diseases and primary immunodeficiency in children. [Farmakoterapiya allergicheskikh zabolevanij i pervichnykh immunodefitsitov u detej]. In: Tsaregorodtsev A.D., Tabolin V.A., ed. *Guide to pharmacotherapy in pediatrics and pediatric surgery. [Rukovodstvo po farmakoterapii v pediatrii i detskoj khirurgii].* Moscow: Medpraktika-M; 2006; 7. (in Russian)
20. Gurina O.P., Dement'eva E.A., Blinov A.E., Varlamova O.N., Blinov G.A. Immunological profile in children with Crohn's disease. *Meditinskaya immunologiya.* 2017; 19 (Special edition): 111. (in Russian)
21. Israeli E., Grotto I., Gilburd B., Balicer R.D., Goldin E., Wiik A. et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Gut.* 2005; 54(9): 1232—6.
22. Rinaldi M., Perricone R., Blank M., Perricone C., Shoenfeld Y. Anti-Saccharomyces cerevisiae autoantibodies in autoimmune diseases: from bread baking to autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2013; 45(2): 152—61.
23. Zhang Z., Li C., Zhao X., Lv C., He Q., Lei S. et al. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies associate with phenotypes and higher risk for surgery in Crohn's disease: a meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.* 2012; 57(11): 2944—54.
24. Gologan S., Iacob R., Preda C., Vadan R., Cotruta B., Catuneanu A.M. et al. Higher titers of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies IgA and IgG are associated with more aggressive phenotypes in Romanian patients with Crohn's disease. *J. Gastrointest. Liver Dis.* 2012; 21(1): 39—44.
25. Danese S., Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology.* 2006; 12(30): 4807—12.
26. Lewis J.D. The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2011; 140(6): 1817—26.
27. Gurina O.P., Dement'eva E.A., Blinov A.E., Varlamova O.N., Blinov G.A. Autoimmune reactions in Crohn's disease in children. *XI Russian forum «Children's health: prevention and diseases. St. Petersburg—2017 therapy of socially significant «. [XI Rossiyskiy forum «Zdorov'e detej: profilaktika i terapiya sotsial'no-znachimyykh zabolevanij. Sankt-Peterburg — 2017».* St. Petersburg: ITC «Simvol»; 2017. (in Russian)

REFERENCES

МИКРОБИОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:578.825.17]-092:612.017.1]-078

Жукова Л.И.¹, Ковалевская О.И.², Городин В.Н.^{1,2}, Шахвердян Ю.Г.³

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРВИЧНОЙ ОСТРОЙ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У НЕИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ

¹ФГБОУВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 350063, Краснодар;

²ГБУЗ «Специализированная клиническая инфекционная больница» Минздрава Краснодарского края, 350000, Краснодар;

³ГБУЗ «Клинический центр профилактики и борьбы со СПИД» Минздрава Краснодарского края, 350015, Краснодар

Цель — клинико-лабораторная характеристика приобретённой острой цитомегаловирусной инфекции у неиммунокомпromетированных взрослых больных. Госпитализированные в ГБУЗ «Специализированная клиническая инфекционная больница» Минздрава Краснодарского края 75 больных приобретённой острой цитомегаловирусной инфекцией. Верификация диагноза проводилась серологическими тестами и полимеразной цепной реакцией.

Продемонстрировано, что в Краснодарском крае острой цитомегаловирусной инфекцией чаще болеют мужчины молодого возраста. Заболевание протекает в генерализованной форме. В клинической картине преобладают симптомы интоксикации (длительное повышение температуры, слабость), гепатомегалия с повышением активности печёночных ферментов, спленомегалия, монолимфоцитоз. У большинства пациентов наблюдают признаки поражения верхних дыхательных путей и реже — внебольничной очаговой пневмонии. Изменения иммунного статуса больных в динамике заболевания были типичными для острой фазы вирусного инфекционного процесса с переходом последнего в латентный. В то же время у части пациентов в ранний реконвалесцентный период сохранялось угнетение нейтрофильного звена иммунитета, создающего угрозу бактериальных осложнений. Комплексное лечение с включением этиотропного противовирусного препарата ганцикловир продолжительностью 8,4 ± 0,4 дня приводило к нормализации температуры, купированию органных поражений, а также исчезновению ДНК вируса из крови.

Частота ошибочных предварительных диагнозов (85,3%), выставленных при направлении в стационар, свидетельствует о сложностях клинической диагностики острой цитомегаловирусной инфекции, обусловленных отсутствием при данном заболевании патогномоничных симптомов. Последнее определяет целесообразность включения в алгоритм обследования больных с неустановленным генезом лихорадки, гепатоспленомегалией, лимфаденопатией, монолимфоцитозом, повышением активности печёночных ферментов исследование антител к антигенам цитомегаловируса (IgM CMV, IgG CMV, авидность IgG CMV) методом иммуноферментного анализа, а также выявление ДНК CMV в крови и моче методом полимеразной цепной реакции. Изменения иммунного статуса в реконвалесцентный период, наблюдаемые у трети пациентов, определяют необходимость диспансерного наблюдения за ними.

Ключевые слова: острая цитомегаловирусная инфекция; клинические симптомы; противовирусная терапия.

Для цитирования: Жукова Л.И., Ковалевская О.И., Городин В.Н., Шахвердян Ю.Г. Клинико-лабораторная характеристика первичной острой цитомегаловирусной инфекции у неиммунокомпromетированных взрослых больных. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (1): 51-54. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-51-54>

Zhukova L.I.¹, Kovalevskaya O.I.², Gorodin V.N.^{1,2}, Shakhverdyan Yu.G.³

THE CLINICAL LABORATORY CHARACTERISTIC OF PRIMARY ACUTE CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN NON-IMMUNOCOMPROMISED ADULT PATIENTS

¹The Federal state budget educational institution of higher education "The Kuban state medical university" of Minzdrav of Russia, 350063 Krasnodar, Russia

²The state budget institution of health care "The specialized clinical infection hospital" of the Minzdrav of the Krasnodar kraii, 350000 Krasnodar, Russia

³The state budget institution of health care "The clinical center of prevention and struggle with AIDS" of the Minzdrav of the Krasnodar kraii, 350015 Krasnodar, Russia

The purpose of study is the clinical laboratory characteristic of acquired acute cytomegalovirus infection in non-immunocompromised adult patients. The sampling included 75 patients with acquired acute cytomegalovirus infection admitted to the specialized clinical infection hospital of the Minzdrav of the Krasnodar kraii. The verification of diagnosis was implemented using serological tests and polymerase chain reaction.

It is demonstrated that males of younger age are most often infected with acute cytomegalovirus infection in the Krasnodar kraii. The disease takes its course in a generalized form. In clinical picture symptoms of intoxication (long-term temperature increasing, weakness), hepatomegaly with increasing of activity of hepatic enzymes, splenomegaly, monolymphocytosis prevail. In most of patients, manifestation of affection of upper respiratory tracts are observed and less frequently - community-acquired pneumonia.

Для корреспонденции: Жукова Лариса Ивановна, д-р мед. наук, проф. каф. инфекционных болезней и эпидемиологии; e-mail: goukova@mail.ru

The alteration of immune status of patients in dynamics of disease was typical for acute phase of viral infection process with transition to a latent one. At the same time, certain percentage of patients preserved inhibition of neutrophil chain of immunity during re-convalescent period, hence developing menace of bacterial complications. The complex treatment with inclusion of etiotropic anti-viral pharmaceutical Gancyclovir with duration of $8,4 \pm 0,4$ days resulted in normalization of fever, relief of organic affections and also disappearance of viral DNA from blood.

The rate of wrong preliminary diagnoses (85.3%) at referral of patient to hospital testifies complicacy of clinical diagnostic of acute cytomegalovirus infection, conditioned by absence of pathognomonic symptoms under this disease. The last circumstance determines expediency of inclusion into algorithm of examination of patients with unidentified genesis of fever, hepatosplenomegaly, lymphadenopathy, monolymphocytosis, increasing of activity of hepatic enzymes the analysis of antibodies to antigens of cytomegalovirus (IgM CMV, IgG CMV, avidity of IgG CMV) using enzyme-linked immunosorbent assay and also detection of DNA CMV in blood and urine using polymerase chain reaction technique. The alterations of immune status during re-convalescent period observed in one third of patients determine necessity of their dispensary observation.

Key words: acute cytomegalovirus infection; clinical symptoms; anti-viral therapy.

For citation: Zhukova L.I., Kovalevskaya O.I., Gorodin V.N., Shakhverdyan Yu.G. The clinical laboratory characteristic of primary acute cytomegalovirus infection in non-immunocompromised adult patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63 (1): 51-54. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-51-54>*

For correspondence: Zhukova L.I., doctor of medical sciences, professor of the chair of infection diseases and epidemiology of the Federal state budget educational institution of higher education "The Kuban state medical university". e-mail: goukova@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 12.10.2017
Accepted 20.10.2017

Растущая актуальность цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции в клинической медицине обусловлена прежде всего повсеместным распространением и частотой инфицирования людей [1]. Клиническое значение имеют преимущественно манифестные формы ЦМВ-инфекции, которые типичны для иммунодефицитных состояний (ВИЧ-инфекции, трансплантации органов, неопластических процессов, беременности и др.) [2—4]. Значительно реже в доступной литературе встречается описание клинических наблюдений острой ЦМВ-инфекции у иммуносохраняемых больных, но чаще обсуждается возможная роль ЦМВ-инфекции в патогенезе различных соматических заболеваний — язвенного колита, атеросклероза, пролонгированной нейтропении, периодонтита и др. [5—10]. Представляется, что большинство случаев острых форм ЦМВ-инфекции остаются недиагностированными, замаскированными под различными неверными диагнозами. В этой связи целью нашего исследования явилась клиническая характеристика приобретённой острой ЦМВ-инфекции у неиммунокомпрометированных взрослых больных.

Материал и методы. Клиническое течение заболевания проанализировано у 75 больных приобретённой острой ЦМВ-инфекцией, лечившихся в ГБУЗ «Специализированная клиническая инфекционная больница» (ГБУЗ СКИБ) Минздрава Краснодарского края в 2005—2016 гг. (средний возраст $30,2 \pm 0,8$ года, мужчин было 59 (78,7%), женщин — 16 (21,3%).

Диагноз подтверждали методом иммуноферментного анализа (ИФА), в котором определяли антитела к антигенам цитомегаловируса (IgM CMV, IgG CMV + авидность), используя сертифицированные наборы реагентов ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ» ВектоЦМВ-IgM, ВектоЦМВ-IgG, ВектоЦМВ-IgG-авидность, а также обнаружением ДНК ЦМВ в крови с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Амплиценс®CMV-FL» [11]. Приобретённую первичную острую ЦМВ-инфекцию верифицировали в случае обнаружения ДНК ЦМВ в крови, а также антител IgM CMV при отрицательных IgG CMV (DNA CMV+, IgM CMV+, IgG CMV-) либо антител IgM CMV и низ-

ковидных IgG CMV (DNA CMV+, IgM CMV+, низкоавидные IgG CMV+). Низкоавидными считали антитела с авидностью $\leq 30\%$.

Из наблюдения исключались пациенты с фоновыми иммунодефицитными заболеваниями и состояниями (с ВИЧ-инфекцией, онкологическими заболеваниями, после трансплантации органов, получавшие иммунодепрессанты, беременные женщины), а также пациенты с клинически сходными по ведущему синдрому лихорадки инфекционными заболеваниями. У части больных 19 (25,3%) изучали иммунный статус.

Статистическая обработка проводилась с помощью критерия Стьюдента и непараметрического коэффициента ассоциации Q.

Результаты и обсуждение. У всех пациентов диагностировали генерализованную форму ЦМВ-инфекции среднетяжелого течения. Заболевших госпитализировали в стационар в среднем на $13,7 \pm 0,8$ день (2—74 дни) болезни, средний койко-день составил $14,6 \pm 0,6$ дня. Частота ошибочных направительных диагнозов, выставленных врачами амбулаторно-поликлинического звена и скорой помощи, составляла 85,3%. Большинство из госпитализированных пациентов, несмотря на молодой возраст, имели сопутствующие заболевания пищеварительной системы (26,7%), урогенитальной системы (8,0%), ЛОР-органов и дыхательных путей (28%), нервной системы (5,3%), эндокринной системы (9,3%), опорно-двигательной системы (5,3%), кожные болезни (6,7%), болезни сердца и сосудов (12%), прочие (2,7%).

В 59 (78,7%) случаях заболевание начиналось остро с повышения температуры до фебрильных значений. Затем у 50 (66,7%) больных температура снижалась и сохранялась на субфебрильных показателях. У 11 (14,7%) пациентов субфебрилитет наблюдали на протяжении всей болезни, а у 5 (6,7%) человек заболевание начиналось с субфебрилитета, после которого температура повышалась до фебрильных показателей. Длительность фебрильной лихорадки составляла в среднем $13,7 \pm 0,6$ дня, общая продолжительность температурной реакции $20,1 \pm 0,9$ дня. Наиболее часто повышение температуры сопровождала слабость 92 (98,7%), реже — потливость

— 27(36%), ломота в теле — 26(34,7%), головная боль — 24(32%), озноб — 20(26,7%), снижение аппетита — 14(18,7%), мышечные и суставные боли — 5(6,7%), головокружение — 2(2,7%), сухость во рту — 2(2,7%) и нарушение сна — 1(1,3%). Частым симптомом у обследованных нами пациентов были выявляемые при физикальном исследовании увеличение печени (62—82,7%) и селезенки (43—57,3%).

Признаки поражения дыхательных путей наблюдали у 45(60,0%) больных: гиперемия ротоглотки (36—48,0% пациентов), першение и боли в горле (24—32%), сухой кашель (20—26,7%), реже кашель с отделением мокроты (10—13,3%), насморк (3—4%), явления тонзиллита (2—2,7%), ослабленное дыхание (16—21,3%), жесткое дыхание (11—14,7%) и сухие хрипы (у 6—8%), сопутствующая внебольничная пневмония (13—17,3%).

Лимфатические узлы пальпировались у 24(32,0%) пациентов, чаще заднешейные (18—24%), подчелюстные и переднешейные (9—12%), реже — подмышечные 1(1,3%) и паховые 1(1,3%). В 1(1,3%) случае отмечалась полилимфоаденопатия. Симптоматика поражения пищеварительной системы встречалась нечасто. Больные предъявляли жалобы на тошноту — 6(8%), рвоту — 4(5,3%), жидкий стул — 6(8%), боли в животе различной локализации — по 4(5,3%), боли и тяжесть в правом подреберье — 3(4%). В редких случаях (8,1%) появлялась экзантема, которая сохранялась 2—6 дней и исчезала бесследно.

Следует отметить, что мы не наблюдали у больных с острой первичной ЦМВ-инфекцией таких синдромов, как ретинит, специфический пневмонит, энцефалит, сиалоаденит, которые часто встречаются при данном заболевании на фоне ВИЧ-инфекции [12, 13].

По результатам дополнительных исследований в общем анализе крови в 1-ю декаду заболевания отмечались лейкоцитоз (6,7%), палочкоядерный сдвиг (56,7%), лимфоцитоз (66,7%), моноцитоз (13,3%), умеренное ускорение СОЭ (13,8%), наличие плазматических клеток (6,7%) и атипичных мононуклеаров (33,3%). Во 2-ю декаду болезни в 27,4% случаев встречался лейкоцитоз, в 32,4% — палочкоядерный сдвиг, в 83,3% — лимфоцитоз, в 19,3% — моноцитоз, в 17,1% — плазматические клетки, в 34,1% — атипичные мононуклеары, в 34,4% — умеренное ускорение СОЭ. В 3-ю декаду заболевания лейкоцитоз наблюдали в 5,3% анализов крови, лейкопению — в 1,7%, лимфоцитоз — в 86%, моноцитоз — в 14,3%, плазматические клетки — в 15,8%, атипичные мононуклеары — в 7%, ускорение СОЭ — в 31%. Аналогичные изменения общего анализа крови сохранялись и в более поздние сроки заболевания (32—91-й дни болезни): лейкоцитоз — в 3,7%, палочкоядерный сдвиг — в 9,5%, лимфоцитоз — в 77,8%, наличие плазматических клеток — в 7,4%, атипичных мононуклеаров — в 14,8%, ускорение СОЭ — в 30%. Изменения в общем анализе мочи почти не различались в разные сроки заболевания и были представлены протеинурией (28,3%), эритроцитурией (37,8%), цилиндрурией (5,5%), лейкоцитурией (14,2%), бактериурией (29,1%) и наличием слизи (55,1%) без других субъективных и объективных клинических симптомов поражения мочевыделительной системы и без прироста уровня мочевины и креатинина. При этом фоновые хронические заболевания мочевыделительной системы в анамнезе регистрировали только у 8,0% больных.

В большинстве случаев острой ЦМВ-инфекции от-

мечали повышение активности ферментов (АЛТ, АСТ). Так, в 1-ю декаду заболевания повышение активности АЛТ составляло $121 \pm 13,8$ Ед/л (41—345 Ед/л) в 81,1% результатов исследования, АСТ — $83,4 \pm 7,2$ Ед/л (42—162 Ед/л) в 86,5% результатов исследования; во 2-ю декаду соответственно $154,8 \pm 17,7$ (46—765 Ед/л) в 83,8% и $106,5 \pm 15,4$ Ед/л (44—982 Ед/л) в 77,3%; в 3-ю декаду — $147,9 \pm 15,8$ Ед/л (42—611 Ед/л) в 95,2% и $96,3 \pm 10,7$ Ед/л (41—413 Ед/л) в 81,0%; в 4-ю декаду — $106 \pm 12,9$ Ед/л (49—415 Ед/л) в 89,5% и $60,6 \pm 5,6$ Ед/л (41—170 Ед/л) в 71,1%; в 5-ю декаду — $67 \pm 9,5$ Ед/л (45—415 Ед/л) в 68,2% и $42,9 \pm 4,9$ Ед/л (42—107 Ед/л) в 54,5% результатов исследования.

УЗИ органов брюшной полости проведено 71(94,7%) пациенту: гепатомегалия выявлена у 62(87,3%), спленомегалия — у 57(80,3%), признаки диффузных изменений в печени — у 23(32,4%), диффузные изменения в поджелудочной железе — у 28(39,4%), жировой гепатоз — у 19(26,8%), хронический холецистит — у 2(2,8%), дискинезии желчевыводящих путей — у 2(2,8%). Отклонения от нормы при сонографии почек были выявлены у 10,3% обследованных: реномегалия (3,4%), кисты почки (3,4%), признаки хронического воспалительного процесса (3,4%). Изменения на ЭКГ найдены у 62%, преобладали умеренные диффузные изменения миокарда (59,2%).

Изменения иммунного статуса по иммунограммам представляли собой снижение числа CD4+ (57,9%), увеличение числа Т-цитотоксических лимфоцитов CD3+ (84,2%) и CD8+ (88,9%), снижение CD19+ (77,8%), что в совокупности удостоверяло самоограничивающуюся острую инфекцию, сдерживание поликлональной активности В-лимфоцитарного звена и отсутствие аутоиммунной перестройки. Глубина снижения соотношения CD4+/CD8+ в среднем до $0,7 \pm 0,1$ свидетельствовала о значимом повреждении противовирусного звена иммунитета, что согласуется с результатами других исследований [14—16]. В то же время у обследованных нами больных происходило увеличение иммунорегуляторного индекса в реконвалесцентный период, что отличало иммунодефицит при острой ЦМВ-инфекции у иммуносохранных пациентов от ЦМВ-инфекции у иммунокомпрометированных больных. Динамика иммуноглобулинов класса М (от $978,8 \pm 420,3$ мг/дл до $1164,7 \pm 998,2$ мг/дл) при отсутствии существенных изменений иммуноглобулинов других классов у наших пациентов также подчеркивала первичную острую инфекцию, а активация С4-компонента комплемента у 100% обследованных больных на 2—3-й неделе заболевания прогнозировала самоограничение острой фазы инфекционного процесса и переход последнего в латентный. У трети обследованных нами больных угнетение нейтрофильного звена иммунитета сохранялось на протяжении всего заболевания, что наряду с усугубляющимся в динамике снижением уровня В-лимфоцитов и количества IgM без достоверного нарастания IgG могло указывать на опасность присоединения бактериальных инфекций в реконвалесцентном периоде.

Лечение больных с острой ЦМВ-инфекцией включало препарат этиотропной терапии — ганцикловир, который назначали в среднетерапевтических дозах продолжительностью в среднем $8,4 \pm 0,4$ дня. В динамике противовирусной терапии исследовали ДНК ЦМВ в крови, она исчезала в среднем через $8,1 \pm 1$ день лечения, что и определяло сроки назначения ганцикловира.

Большинство (62,8%) пациентов вследствие относительно продолжительного диагностического периода и в соответствии с предварительными диагнозами получали антимикробные препараты. Комплекс лечения дополняли дезинтоксикационной терапией, симптоматическими средствами.

Заключение. Проведённые клинические наблюдения позволили сделать вывод о том, что приобретённая острая манифестная ЦМВ-инфекция у иммунокомпromетированных больных г. Краснодара протекает преимущественно в генерализованной среднетяжелой форме, характеризуется опорными симптомами — лихорадкой, признаками интоксикации, гепатоспленомегалией, относительным монолимфоцитозом и повышением активности ферментов (АЛТ, АСТ), чаще встречается у мужчин молодого возраста. Частота ошибочных предварительных диагнозов свидетельствует о сложностях клинической диагностики острой ЦМВ-инфекции, обусловленной отсутствием при данном заболевании патогномоничных симптомов. В этой связи целесообразно включение в алгоритм обследования больных с неустановленным генезом лихорадки, гепатоспленомегалией, лимфаденопатией, монолимфоцитозом, повышением активности печёночных ферментов определение антител к антигенам CMV и выявление ДНК CMV в крови и моче методом ПЦР.

Комплексная терапия больных с приобретённой острой манифестной ЦМВ-инфекцией должна включать препараты, оказывающие противовирусное действие, прежде всего ганцикловир, который в сочетании со средствами патогенетической и симптоматической терапии приводит к элиминации вируса из крови, нормализации температуры и купированию органных поражений.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 3, 6, 8—10, 13, 14, 16 см. REFERENCES)

1. Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я., ред. *Инфекционные болезни: национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015.
 2. Асатурова О.Р., Никонов А.П. Цитомегаловирусная инфекция и беременность. *Consilium medicum*. 2008; 6: 34—7.
 3. Барышников Е.Н., Дроздов В.Н., Шулятьев И.С., Парфенов А.И. Цитомегаловирусная инфекция у больных язвенным колитом. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2010; (10): 25—8.
 4. Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н., Силкин Н.И., Салахов М.Х. Инфекционная природа атеросклероза: факты и гипотезы. *Ученые записки Казанского университета*. 2010; 1: 136—54.
 5. Жукова Л.И., Ковалевская О.И., Лебедев В.В., Горodin В.Н., Еремина Г.А. Приобретённая манифестная цитомегаловирусная инфекция (первичная форма и реактивация) у взрослых иммуносохранных больных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014. 8(59): 48—52.
 6. Кочкина С.С., Ситникова Е.П. Актуальные вопросы патогенеза, клинического течения и диагностики цитомегаловирусной инфекции. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2016; 3: 57—68.
 7. Барычева Л.Ю., Голубева М.В., Огузова Э.Ю. Роль врожденной цитомегаловирусной инфекции в нарушении механизмов иммунной адаптации. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2008; 3: 15—9.
-
- ## REFERENCES
1. Yushuk N.D., Vengerov Yu.Ya., eds. *Infectious Diseases: National Leadership [Инфекционные болезни: национальное руководство]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2015. (in Russian)
 2. Rahbar A., Orrego A., Peredo I., Dzabic M., Wolmer-Solberg N., Strååt K. et al. Human cytomegalovirus infection levels in glioblastoma multiforme are of prognostic value for survival. *J. Clin. Virol*. 2013; 57(1): 36—42.
 3. Tomasiak T., Zawilińska B., Pawlik D., Ferek J., Ferek J., Wójtowicz A., Rybak-Krzyszowska M., Lauterbach R., Pietrzyk J.J. Congenital cytomegaly in one twin — a case report. *Med. Wiek Rozwoj*. 2012; 16(3): 252—60.
 4. Astaturova O.R., Nikonov A.P. Cytomegalovirus infection and pregnancy. *Consilium medicum*. 2008; 6: 34—7. (in Russian)
 5. Baryshnikov E.N., Drozdov V.N., Shulyat'ev I.S., Parfenov A.I. Cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis. *Experimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2010; 10: 25—8. (in Russian)
 6. Kojima Tetsu, Watanabe Toshiaki, Hata Keisuke, Shinozaki Masaru et al. Cytomegalovirus infection in ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol*. 2006; 41(6): 706—11.
 7. Yarullina D.R., Il'inskaja O.N., Silkin N.I., Salahov M.H. The infectious nature of an atherosclerosis: the facts and hypotheses. *Uchenye zapiski Kazanskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2010; 1: 136—54. (in Russian)
 8. Sheen Jiunn-Ming, Kuo Ho-Chang, Yu Hong-Ren, Huang Eng-Yen et al. Prolonged acquired neutropenia in children. *Pediatr. Blood and Cancer*. 2009; 53(7): 1284—8.
 9. Abukawa Daiki, Takeyama Junji, Miura Katsushi Eosinophilic gastroenteritis with cytomegalovirus infection in an immunocompetent child. *World J. Gastroenterol*. 2007; 13(34): 4653—4.
 10. Hernádi K., Szalmás A., Mogyorósi R., Czompa L., Veress G, Csoma E. et al. The prevalence of herpes viruses in human apical periodontitis samples. *Fogorv. Sz*. 2012; 105(4): 135—40.
 11. Zhukova L.I., Kovalevskaja O.I., Lebedev V.V., Gorodin V.N., Eremina G.A. Got sharp manifesting cytomegalovirus the infection at adult patients with normal immunity. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 8(59):48—52. (in Russian)
 12. Kochkina S.S., Sitnikova E.P. The pathogenesis, clinical course, and diagnosis of cytomegalovirus infection: Topical aspects. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2016; 3: 57—68. (in Russian)
 13. Chee S.P., Jap A. Cytomegalovirus anterior uveitis: Outcome of treatment. *Brit. J. Ophthalmol*. 2010; 94(12): 1648—52.
 14. Alonso Arias R., Moro-García M.A., Echeverría A., Solano-Jaurrieta J.J., Suárez-García F.M., López-Larrea C. Intensity of the humoral response to cytomegalovirus is associated with the phenotypic and functional status of the immune system. *J. Virol*. 2013; 87(8): 4486—95.
 15. Barycheva L.Yu., Golubeva M.V., Oguzova Ye.Yu. The role of congenital cytomegalovirus infection in disorders of immune adaptation mechanisms. *Meditinskiy vestnik Severnogo Kavkaza*. 2008; 3: 15—9. (in Russian)
 16. Lopez-Vergès S., Milush J.M., Schwartz B.S., Pando M.J., Jarjoura J., York V.A. et al. Expansion of a unique CD57⁺NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*. 2011; 36(108): 14725—32.

Поступила 12.10.17

Принята к печати 20.10.17

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:579.873.211-078

Сароянц Л.В.¹, Арнаудова К.Ш.¹, Абрамов Д.Д.², Трофимов Д.Ю.²

РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛЕПРЫ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

¹ФГБУ «НИИ по изучению лепры» Минздрава РФ, 414057, Астрахань, Россия;

²ООО «НПФ ДНК-Технология», 115478, Москва, Россия

Цель исследования — разработка методов лабораторной диагностики лепры на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Отработаны методы экстракции ДНК из различного клинического материала (биоптаты и скарификаты кожи, соскобы со слизистой поверхности носа и с трофических язв, сыворотки крови). Сконструированы системы олигонуклеотидов к 16S рРНК и зонда для идентификации Mycobacterium leprae в формате Real-time для амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), отработан оптимальный режим амплификации. Для контроля за ходом ПЦР вводили систему внутреннего контроля. Оценка специфичности и чувствительности тест-системы проводилась на 17 штаммах различных видов микобактерий и клинических образцах от 32 больных лепрой и 15 здоровых лиц, находящихся в семейном контакте с больными лепрой. Установлена 100% чувствительность обнаружения Mycobacterium leprae в биоптатах кожи методом ПЦР по сравнению со стандартным бактериоскопическим методом (88,9%). Во всех других клинических образцах также определялась более высокая чувствительность разработанной тест-системы на основе ПЦР. Предложенная тест-система обладает высокой чувствительностью и специфичностью, что позволяет решить вопрос быстрой идентификации Mycobacterium leprae, и может быть использована в эпидемиологических исследованиях при изучении распространения возбудителя заболевания.

Ключевые слова: Mycobacterium leprae; тест-система; Real-time ПЦР; биоптаты; скарификаты.

Для цитирования: Сароянц Л.В., Арнаудова К.Ш., Абрамов Д.Д., Трофимов Д.Ю. Разработка лабораторной диагностики лепры с помощью полимеразной цепной реакции. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (1): 55-59.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-55-59>

Saroyants L.V.¹, Arnaudova K.Sh.¹, Abramov D.D.², Trofimov D.Yu.²

THE DEVELOPMENT OF LABORATORY DIAGNOSTIC OF LEPROSY USING POLYMERASE CHAIN REACTION

¹Leprosy research institute of Minzdrav of Russia, 414057 Astrakhan, Russia

²DNA-Technology LLC, 115478 Moscow, Russia

The purpose of study is to develop techniques of laboratory diagnostic of leprosy on the basis of polymerase chain reaction. The techniques were worked through such as extraction of DNA from various clinical material (bioplates and scarificate of skin, scrapes from mucous surface of nose and trophic ulcers, blood serum). The systems of oligonucleotides were constructed to 16S pRNA and probe for identification of Mycobacterium leprae in real-time format for amplifier DT-96 ("The DNA-Technology", Russia). The optimal regimen of amplification was worked out. To control polymerase chain reaction processing a system of internal control was introduced. The evaluation of specificity of test-system was implemented using 17 strains of various types of mycobacteria and clinical samples from 32 patients with leprosy and 15 healthy individuals being in family contact with patients with leprosy. The 100% sensitivity was established concerning detection of Mycobacterium leprae in bioplates of skin using polymerase chain reaction technique as compared with standard bacterioscopic technique (88.9%). In all other clinical samples, a higher sensitivity of developed test-system on the basis of polymerase chain reaction was detected too. The proposed test-system has higher sensitivity and specificity that permits to resolve an issue of fast identification of Mycobacterium leprae. It can be applied in epidemiological studies at investigation of prevalence of agent of disease.

Key words: Mycobacterium leprae; test-system; polymerase chain reaction in real-time; bioplate; scarificate

For citation: Saroyants L.V., Arnaudova K.Sh., Abramov D.D., Trofimov D.Yu. The development of laboratory diagnostic of leprosy using polymerase chain reaction. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63 (1): 55-59. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-55-59>

For correspondence: Saroyants L.V., doctor of medical sciences, leading researcher, the head of the laboratory experimental department of the Federal state budget scientific institution "Leprosy Research Institute". e-mail: luda_saroyants@mail.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support

Received 31.07.2017

Accepted 01.08.2017

Для корреспонденции: Сароянц Людмила Валентиновна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр., зав. лабораторно-экспериментальным отделом ФГБУ «НИИ по изучению лепры» Минздрава РФ; e-mail: luda_saroyants@mail.ru

Введение. Лепра — инфекционное заболевание, вызываемое микобактериями лепры, отличающееся упорным хроническим, прогрессирующим течением и характеризующееся поражением кожи, периферической нервной системы и внутренних органов. Несмотря на долгую историю заболевания, известную с библейских

времен [1], ранняя диагностика лепры по-прежнему остается серьезной проблемой из-за низкой чувствительности стандартных методов диагностики и невозможности культивирования микобактерий лепры.

Возбудителем заболевания является *Mycobacterium leprae*, открытая Хансеном в 1874 г. [2], она относится к роду *Mycobacterium*, семейству *Mycobacteriaceae*, порядку *Actinomycetales* и классу *Actinomycetes* [3]. Наружный слой представлен электронно-плотной микрокапсулой толщиной от 5 до 15 нм, состоящей из мукополисахаридов, что определяет антигенность *M. leprae* и формирование лекарственной устойчивости. Под микрокапсулой находится трехслойная клеточная стенка толщиной от 8 до 20 нм, к которой примыкает трехслойная цитоплазматическая мембрана. Способ размножения *M. leprae*, как правило, поперечное деление, скорость одного деления около 12 сут. Основной путь распространения лепры — воздушно-капельный.

Попытки культивирования *M. leprae* и заражение лепрой экспериментальных животных начались сразу после открытия возбудителя и продолжают до настоящего времени. Особое место среди экспериментальных моделей заняла модель, предложенная С. Shepard в 1960 г. [4]. Моделирование заключалось в заражении мышей дозированным количеством *M. leprae* в подушечки лапок и дальнейшим размножением микобактерий в месте инокуляции. После завершения эксперимента (период 8—12 мес) подсчитывалось число микобактерий в лапке по методу С. Shepard и D. McRae [5] и сравнивалось с числом введенных микобактерий. Несмотря на то что данная модель общепризнана и занимает значимое место в экспериментальной лепрологии, особенно при изучении новых лекарственных препаратов и получении антигенного материала, она имеет и ряд недостатков: длительность эксперимента из-за медленного локального размножения микобактерий, а также отсутствие генерализации процесса. Кроме того, при моделировании лепрозной инфекции не было возможности с достаточной степенью достоверности подтвердить, что микобактерии, пассируемые на животных, идентичны микобактериям, выделенным от больного лепрой. Поэтому вопрос идентификации микобактерий при смене организма-хозяина является актуальным.

Лепра представляет собой сложный спектр клинических форм, которые развиваются после инкубационного периода длительностью от 2 до 30 лет [6]. В клинической практике диагноз основывается на оценке кожных проявлений, гистологическом исследовании образцов кожи и положительном бактериоскопическом анализе (мазок по Цилю—Нильсену). Однако чувствительность бактериоскопического анализа невелика, что существенно затрудняет диагностику лепры на ранних стадиях болезни и при малобактериальных формах заболевания.

Многие из методов, используемых в диагностике других микобактериальных инфекций, недоступны при лепре [7], что связано с невозможностью культивирования *M. leprae* на искусственных питательных средах и с тем, что единственным признанным природным резервуаром являются девятипоясные броненосцы (*Dasypus novemcinctus*) [8, 9], обитающие в Южной Америке.

По данным ВОЗ ежегодно в мире регистрируются около 300 тыс новых случаев заболевания лепрой [10]. В нашей стране в последние годы отмечается значительное снижение числа зарегистрированных больных лепрой, при этом поток мигрантов из эндемичных по ле-

пре стран увеличивается. Значительный полиморфизм клинических проявлений, разнообразный характер течения, а также длительный инкубационный период практически исключают возможность постановки диагноза на ранних стадиях болезни. В связи с этим диагностика лепры остаётся актуальной проблемой для общественного здравоохранения. Решению проблем идентификации возбудителя инфекционных заболеваний, особенно некультивируемых форм, помогли разработанные в последнее время молекулярно-генетические методы, которые открыли принципиально новые возможности для создания высокочувствительных и специфичных методов диагностики вирусных и бактериальных заболеваний, в том числе и лепры [11—15].

Цель данного исследования — сконструировать систему олигонуклеотидов для идентификации *M. leprae*, отработать методы пробоподготовки, экстракции ДНК из различного клинического материала, режимы ПЦР-амплификации ДНК, и апробировать чувствительность и специфичность разработанной тест-системы.

Материал и методы. Для оценки чувствительности и специфичности разработанной тест-системы использовали ДНК из клеток различных видов организмов: *M. intracellulare*, *M. Кедровского (белый утам)*, *M. avium*, *M. vaccae*, *M. clegg*, *M. duvalli*, *M. kansasii*, *M. phlei*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. gastri*, *M. gordona*, *M. lufu*, *M. Кедровского (розовый утам)*, *M. smegmatis*, *M. bovis*, *M. paratuberculosis*.

Выделение ДНК проводили тремя методами: М1 — с помощью комплекта реагентов «ПРОБА-НК» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия); М2 — использовали комплект реагентов «ПРОБА-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия); М3 — автоматический методом выделения ДНК набором реагентов (GXT DNA/RNA GenoExtraction Kit, «Hain Lifescience», Германия) на станции GenoXtract («Hain Lifescience», Германия), при котором микобактерии связываются с магнитными частицами, происходит лизис и осаждение ДНК на частицах, а последующей магнитной сепарацией и удалением остатков клеток, отмывкой и переносом образцов в пробирки. Процедура пробоподготовки и метода экстракции зависели от природы исследуемого образца.

Соскоб со слизистой носа и с поверхности трофических язв производили с помощью стерильных одноразовых зондов. Биоптат кожи после иссечения разрезали на мелкие кусочки и гомогенизировали. При взятии скарификатов на пораженных участках кожи скальпелем делали небольшой разрез (глубиной 1—2 мм) и стерильным одноразовым зондом собирали тканевую жидкость. Все пробы после забора материала помещали в пробирки с 300 мкл стерильного физиологического раствора.

Выбор олигонуклеотидных праймеров для ПЦР осуществлялся путём анализа последовательностей ДНК *M. leprae*, полученных из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), а также с использованием данных литературы [16—18]. Праймеры для ПЦР были подобраны с учётом GC состава матрицы, расчётной температуры гибридизации, наличия гомологичных участков последовательностей ДНК у других организмов. Для подбора праймеров и олигонуклеотидных проб использовано программное обеспечение Oligo 6.0.

Синтез праймеров и олигонуклеотидных флуоресцентномеченых зондов для ПЦР в реальном времени проводили на синтезаторах ДНК ASM-800 и ASM-102 (Россия, Новосибирск), позволяющих синтезировать

Характеристика праймеров, зонда и размера ампликона для детекции *M. leprae*

Праймер	Нуклеотидная последовательность праймеров и зондов	Размер продукта ПЦР, п.н.
16s-U	5'- CGA ACG GAA AGG TCT CTA AA -3'	290
16s-U	5'- GTC GAA CGG AAA GGT CTC TAA A -3'	
16s-P	(FAM)- 5'- CTT CAA GGC GCA TGT CTT GTG GTG GAA -3'-(BHQ1)	

как экспериментальные (20 нмоль), так и препаративные количества (0,5 мкмоль). Использовали флуорофоры (FAM, HEX) и гасители флуоресценции (BHQ1), синтезированные в лаборатории изотопных методов анализа Института биоорганической химии им. академикова М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Олигонуклеотиды очищали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием обращеннофазных колонок Диасфер-110-С18 (Россия). Чистоту полученных олигонуклеотидов контролировали методом аналитического вертикального гель-электрофореза в полиакриламидном геле (табл. 1).

ПЦР проводили в 35 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл образца ДНК и следующие компоненты: 10 пмоль каждого праймера; 1,1 мкмоль каждого dNTP; 64 мкмоль TRIS-HCl (pH 8,6); 25 мкмоль (NH₄)₂SO₄; 2,5 мкмоль — MgCl₂, а также 5 единиц Taq-полимеразы. Для предотвращения изменения концентрации компонентов реакционную смесь покрывали 20 мкл минерального масла. Для осуществления «горячего старта» и предотвращения неспецифического отжига праймеров использовали парафиную прослойку, разделяющую компоненты реакционной смеси.

Отработанный режим амплификации: 80°C — 30 с, 94°C — 1 мин 30 с 1 цикл; 94°C — 30 с, 64°C — 15 с 5 циклов; 94°C — 10 с, 64°C — 15 с 45 циклов; 10°C — хранение. Амплификацию ДНК проводили в термоциклере «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология, Россия») для дальнейшей постановки в электрофорезе. Учёт реакции проводился в трансиллюминаторе. При использовании ПЦР в реальном времени амплификация и детекция ДНК проводили в амплификаторе ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Детекцию флуоресценции проводили при 64°C.

Для контроля за ходом ПЦР вводили систему внутреннего контроля — ВК (клонированный фрагмент гена рецептора фактора роста человека, пара праймеров и олигонуклеотидный зонд, комплементарные ему). Критерием пригодности системы ВК служило отсутствие ингибирования специфической реакции, при этом ВК должен работать в случае отсутствия специфической реакции.

Метод ПЦР был апробирован на клиническом материале от 32 больных лепрой и 15 здоровых лиц, находящихся в семейном контакте с больными лепрой. Для проведения бактериоскопического и молекулярно-генетического исследований использовали биоптаты кожи (18), соскобы со слизистой поверхности носа (47), скарификаты кожи (54), соскобы с трофических язв (15) и сыворотки крови (29). Всего исследовано 148 образцов диагностического материала. Одновременно одни и те же образцы исследовали различными методами. У группы больных диагноз подтверждён клинически, бактериоскопически и гистологически.

Результаты. Первоначально оценку специфичности

тест-системы на основе ПЦР к 16S рРНК проводили электрофоретически в агарозном геле с использованием ДНК различных видов микроорганизмов (см. выше), ДНК от больных лепрой и экспериментальных животных (модель Шепарда). В результате проведения ПЦР и последующего электрофореза был зафиксирован синтез ампликона размером 290 п.н. только в биологических образцах от больных лепрой (скарификаты и биоптаты кожи, соскобы со слизистой носа и с трофических язв). Во всех случаях результаты совпали со стандартными бактериоскопическими и гистологическими методами исследования.

После установления высокой степени чувствительности и специфичности данных праймеров была разработана последовательность флуоресцентных зондов для создания тест-системы в Real time. Клиническое апробирование тест-системы для выявления *M. leprae* методом ПЦР в реальном времени также проведено у больных лепрой и здоровых лиц, находящихся в семейном контакте с больными лепрой. Чувствительность метода зависела от характера модельного образца клинического материала (табл. 2).

Чувствительность бактериоскопического метода составила 88,9%. Самая высокая частота обнаружения ДНК *M. leprae* отмечалась в биоптатах кожи от больных лепрой, причём более эффективный метод выделения ДНК был М1. При выделении ДНК методом М1 *M. leprae* идентифицировалась во всех 18(100%) гистологически подтверждённых биоптатах кожи, методом М2 — в 17(94,4%). Таким образом, методом ПЦР *M. leprae* об-

Таблица 2

Частота выявления *M. leprae* различными методами идентификации

Клинический материал	Число исследуемых образцов	Бактериоскопия		ПЦР Real time на 16S рРНК	
		абс.	%	абс.	%
Скарификаты кожи	54	+	32 59,3	36	66,7
		-	22 40,7	18	33,3
Биоптаты кожи	18	+	16 88,9	18	100
		-	2 11,1	0	0
Соскобы со слизистой носа	32	+	20 62,5	22	68,8
		-	12 37,5	10	31,2
Соскобы с язв	15	+	0 0	3	20,0
		-	15 100	12	80,0
Пробы сыворотки крови	29	+	0 0	0	0
		-	29 100	29	100
Всего ...	148	+	68 45,9	79	53,4
		-	80 54,1	69	46,6

наруживалась в биоптатах кожи даже в бактериоскопически негативных образцах: методом М1 — в 2(11,1%) случаях, а методом М2 — в 1(5,5%).

При исследовании 32 соскобов со слизистой поверхности носа *M. leprae* также идентифицировалась чаще при ПЦР-анализе, чем при бактериоскопии. При выделении ДНК методами М1 и М2 в 22(68,8%) случаях идентифицировалась *M. leprae*, что на 2(6,3%) случая больше, чем при бактериоскопическом исследовании. В 54 скарификатах кожи от больных лепрой при экстракции методами М1 и М2 ДНК *M. leprae* детектировались в 36(66,7%) случаях, в отличие от 32 бактериоскопически позитивных образцов. При проведении ПЦР-анализа в соскобах с трофических язв ДНК *M. leprae* обнаруживалась при использовании методов выделения М1 и М2 в 3(20%) случаях, хотя при бактериоскопии все 15 соскобов были отрицательны.

При выделении ДНК методом М3 *M. leprae* идентифицировалась в соскобах со слизистой поверхности носа, а также в биоптатах и скарификатах кожи только в бактериоскопически положительных образцах. В образцах сывороток крови от больных лепрой при использовании всех методов экстракции ДНК *M. leprae* не выделялась.

Специфичность теста проверялась на биологических образцах (биоптаты, скарификаты кожи, сыворотка крови, соскобы со слизистой поверхности носа), полученных от здоровых лиц. Специфичность праймеров составила 100%. Ни в одном из образцов ДНК *M. leprae* не обнаруживалась, что и подтвердилось стандартными методами.

Таким образом, при сопоставлении результатов, полученных различными методами идентификации *M. leprae* в разных биологических образцах, метод ПЦР показал более высокую чувствительность при сравнении со стандартным бактериоскопическим исследованием. При этом во всех случаях идентификации *M. leprae* бактериоскопическим и гистологическим методами результаты ПЦР были положительными (коэффициент ассоциации Пирсона $r_a + 1$).

Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения сконструированной нами системы праймеров, методики подготовки образцов, параметров протокола экстракции ДНК в зависимости от клинического материала, а также протокола проведения реакции амплификации для детекции *M. leprae* методом ПЦР на 16S рРНК. Предложенная тест-система обладает высокой чувствительностью и специфичностью и может использоваться как для диагностики активной протекающей лепрозной инфекции, так и для выявления асимптомного носительства возбудителя у клинически здоровых людей.

Обсуждение. Одним из наиболее перспективных направлений в изучении биологии *M. leprae* в последнее время является применение молекулярно-генетических методов. Эти методы помогают расшифровать генетические структуры *M. leprae*, охарактеризовать их место среди многочисленных видов микобактерий и выявлять возбудителя лепры в разных биологических образцах, т. е. имеют не только фундаментальное, но и прикладное значение.

На данный момент охарактеризованы и используются в качестве мишени различные специфические для *M. leprae* последовательности, позволяющие дифференцировать *M. leprae* от других видов. В то же время создание

высокоспецифичной и чувствительной тест-системы на основе ПЦР для идентификации возбудителя лепры, как и для идентификации любого возбудителя инфекционного заболевания, зависит от нескольких этапов.

Первый этап — экстракция ДНК. Основной задачей на этом этапе является получение максимального количества ДНК возбудителя в зависимости от биологического образца (соскобы со слизистой носа, скарификаты и биоптаты кожи, пробы сыворотки крови от больных лепрой и здоровых) с наименьшими экономическими затратами. На этом этапе нами были отработаны три метода экстракции ДНК как отечественного, так и зарубежного производства. Показано, что все методы экстракции ДНК имеют практически сопоставимую эффективность при выделении ДНК из биоптатов после их предварительного гомогенизирования. Для разработки скринингового теста идентификации возбудителя лепры особенно важным является использование образцов, полученных неинвазивным способом, таких как соскобы со слизистой поверхности носа. В этом случае наиболее информативными оказались метод выделения с использованием спиртовой преципитации нуклеиновых кислот («ПРОБА-НК» ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и метод выделения с использованием сорбента («ПРОБА-ГС» ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). При экстракции ДНК из скарификатов кожи и соскобов с трофических язв эти методы также показали высокую чувствительность. Ограничением метода М3 является невозможность выделения ДНК из образцов крови и необходимость использовать для работы только наборы реагентов фирмы «Hain Lifescience» (Германия).

Второй этап — подбор специфических праймеров. Правильный выбор ДНК-мишени позволяет добиться высокой чувствительности и специфичности. При лепре для идентификации *M. leprae* методом ПЦР применялись различные праймеры, в частности, фланкирующие участки генов белков 18 кДа [11], 65 кДа [12], супероксиддисмутазы *M. leprae* [13].

Однако особое внимание уделяется праймерам, фланкирующим участок гена 16S рРНК, который является компонентом микобактериальных рибосом и экспрессируется в большом количестве копий (от 10^3 до 10^4 на клетку). Бактериальный ген 16S рРНК содержит не только общие для всех бактерий последовательности, но и специфические для каждого вида [19], поэтому наиболее широко используется для идентификации бактерий. Исследования с использованием этого гена внесли большой вклад в открытие новых видов микобактерий и продолжают служить в качестве важного инструмента как альтернатива фенотипическим методам идентификации.

При выявлении *M. leprae* методом ПЦР с праймерами, фланкирующими участок гена 16S рРНК [20—24], было показано отсутствие перекрестной реакции микобактерий лепры со штаммами 22 других различных микобактерий. М. De Wit и Р. Klaster [21] сообщали, что микобактерии лепры из различных источников имеют идентичные по 16S рРНК межгенные спейсерные области.

В настоящее время на смену визуальной оценке результатов ПЦР методом электрофореза и для снижения риска контаминации уверенно приходят флуоресцентные методы детекции продуктов амплификации. Одним из таких методов является метод ПЦР в реальном времени, который стал признанным стандартом при исследовании

довании ДНК и РНК. Поэтому в дальнейшем разработка метода детекции возбудителя лепры проводилась с использованием праймеров и зондов для регистрации результатов в режиме реального времени [14, 15].

Разработанная нами тест-система на основе амплификации участка гена 16S рРНК в режиме реального времени показала высокую специфичность и чувствительность, что позволит решить вопрос быстрой идентификации *Mycobacterium leprae*, она может быть использована в эпидемиологических исследованиях при изучении распространения возбудителя заболевания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hulse E.V. Leprosy and ancient Egypt. *Lancet*. 1972; 2: 1024—5.
2. Hansen G.A. *Spedalshedens Arsager. Norsk Magazin for Laevidenskaben*. 1874; 4: 76—9.
3. Shinnick T.M., Good R.C. Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microb.* 1990; 13(3): 884—901.
4. Shepard C.C. The experimental disease that follows the infection of human leprosy bacilli into footpads of mice. *J. Exp. Med.* 1960; 112: 445—54.
5. Shepard C.C., McRae D.H. A method for counting acid-fast bacteria. *Int. J. Lepr.* 1968; 36: 78—82.
6. Ridley D.S., Jopling W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr.* 1966; 34: 255—73.
7. Domínguez J., Blanco S., Lacoma A., García-Sierra N., Prat C., Ausina V. Utility of molecular biology in the microbiological diagnosis of mycobacterial infections. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 2008; 26(9): 33—41.
8. Kirchheimer W.F., Sanchez R.M. Quantitative aspects of leprosy in armadillos. *Lepr. India*. 1977; 49: 48—53.
9. Scollard D.M., Adams L.B., Gillis T.P., Krahenbuhl J.L., Truman R.W., Williams D.L. The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19: 338—81.
10. *World Health Organization*. Global leprosy: situation 2016—2020. 2016: 1—20.
11. Lamb F.I., Singh N.B., Colston M.J. The specific of 18 kDa antigen of *Mycobacterium leprae* is present in *Mycobacterium habana* and functions as a heat-shock protein. *J. Immunol.* 1990; 144: 1922—5.
12. Shinnick T.M., Vodkin M.H., Williams J.C. The *Mycobacterium tuberculosis* 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen to the *Escherichia coli* GroEl protein. *Infect. Immun.* 1988; 56: 446—51.
13. Mostafa H.M., Kazda M.V.D., Irgens L.M., Luesse H.G. Acid-fast bacilli from former leprosy regions in coastal Norway showing PCR positivity for *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr.* 1995; 63: 97—9.
14. Martinez N.A., Lahiri R., Pittman L.T., Scollard D., Truman R., Moraes M.O. et al. Determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47: 2124—30.
15. Sharma R., Lavania M., Katoch K., Chauhan D.S., Gupta A.K., Gupta U.D. et al. Development and evaluation of real-time RT-PCR assay for quantitative estimation of viable mycobacterium leprae in clinical samples. *Indian J. Lepr.* 2008; 80: 315—21.
16. Santos A.R., Balassiano V., Oliveira M.L., Pereira M.A., Santos P.B., Degraive W.M. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eight years after completion of anti-leprosy therapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2001; 96: 1129—33.
17. Ebenezer G.J., Daniel S., Norman G., Daniel E., Job C.K. Are viable *Mycobacterium leprae* present in lepromatous patients after completion of 12 months and 24 months multi-drug therapy? *Indian J. Lepr.* 2004; 76(3): 199—206.
18. Martinez A.N., Ribeiro-Alves M., Sarno E.N., Moraes M.O., Ozcel M.A. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5: e1354.
19. Turrene C.Y., Tschetter L., Wolfe J., Kabani A. Necessity of Quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *Clin. Microbiol.* 2001; 39: 3637—48.
20. Cox R.A., Kempell K., Fairclough L., Corston M.S. The 16S ribosomal RNA of *Mycobacterium leprae* contains unique sequence, which can be used for identification by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* 1991; 35: 284—90.
21. De Wit M.Y.L., Klatser P.R. *Mycobacterium leprae* isolates from different sources have identical sequences of the spacer region between the 16S and 23S ribosomal RNA genes. *Microbiology*. 1994; 140: 1982—7.
22. Dobner P., Feldmann K., Rifai M., Löscher T. Rapid identification of mycobacterial species by PCR amplification of hypervariable 16S rRNA gene promoter regions. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 806—9.
23. Haile Y., Ryon J.J. Colorimetric microtitre plate hybridization assay for the detection of *Mycobacterium leprae* 16S rRNA in clinical specimens. *Lepr. Rev.* 2004; 75: 40—9.
24. Rampini S.K., Bloemberg G.V., Keller P.M., Büchler A.C., Dollenmaier G., Speck R.F. et al. Broad-range 16S rRNA gene polymerase chain reaction for diagnosis of culture-negative bacterial infections. *J. Infect. Dis.* 2011; 53: 1245—51.

Поступила 31.07.17
Принята к печати 01.08.17

Детушева Е.В., Скрыбин Ю.П., Богун А.Г., Кисличкина А.А., Кадникова Л.А., Фурсова Н.К.

ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ STAPHYLOCOCCUS AUREUS К ТРИКЛОЗАНУ

ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, г. Оболensk, Московская обл., Россия

Изучены молекулярно-генетические механизмы формирования устойчивости к антисептику триклозану у штамма Staphylococcus aureus ATCC25923. Получены варианты штамма S. aureus ATCC25923 (Tr1, Tr2, Tr1C и Tr2C), устойчивые к 64 мг/л триклозана, стабильно сохраняющие данное свойство при культивировании в отсутствие селективного давления. Штамм S. aureus Tr1 характеризовался несколько замедленным ростом, а штамм S. aureus Tr2 имел скорость роста, сопоставимую с исходным штаммом. В триклозан-устойчивых штаммах выявлена мутация C284T в гене fabI, приводящая к аминокислотной замене A95V в ферменте эноил-ацил редуктазе FabI, мишени триклозана. Кроме того, в этих штаммах обнаружены стабильно наследующиеся мутации в генах, ассоциированных с транспортом веществ в клетке: гипотетического транспортного белка HlyC/CorC family transporter, белка-антипортера ионов Na⁺, K⁺, Li⁺ и щелочей Na⁺/H⁺ antiporter subunit F, мембранного гипотетического белка и АТФ-связывающего белка ATP-binding protein. Показано, что устойчивость к триклозану у стафилококков ассоциирована с приобретением точечных мутаций в генах эноил-ацил редуктазы, а также в других генах, связанных с транспортом веществ в бактериальной клетке.

Ключевые слова: Staphylococcus aureus; антисептик; бактериальная устойчивость; триклозан; fabI.

Для цитирования: Детушева Е.В., Скрыбин Ю.П., Богун А.Г., Кисличкина А.А., Кадникова Л.А., Фурсова Н.К. Изучение закономерностей формирования устойчивости staphylococcus aureus к триклозану. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(1): 60-64. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-60-64>

Detusheva E.V., Skryabin Yu.P., Bogun A.G., Kislichkina A.A., Kadnikova L.A., Fursova N.K.

THE STUDY OF PATTERNS OF DEVELOPMENT OF RESISTANCE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS TO TRICLOSAN

The Federal budget institution of science "The state scientific center of applied microbiology and biotechnology" of the Rospotrebnadzor, 142279 Obolensk, Moscow oblast, Russia

The article presents the results of studying molecular genetic mechanisms of development of resistance to antiseptic Triclosan in strain Staphylococcus aureus ATCC25923. The modifications of strain S. aureus ATCC25923 (Tr1, Tr2, Tr1C u Tr2C) are obtained resistant to 64 mg/l of Triclosan and stably preserving the given characteristic under cultivation in absence of selective pressure. The strain S. aureus Tr1 was characterized by slightly delayed growth and the strain S. aureus Tr2 was characterized by growth velocity comparable with initial strain. In the Triclosan-resistant strains a mutation C284T in gene fabI was detected resulting in amino-acid replacement A95V in enzyme enoyl-acyl protein reductase FabI, triclosan target. Besides, in these strains a stably inheriting mutation was detected in genes associated with transport of substances in cell: hypothetical transport protein HlyC/CorC family transporter; protein-transporter of ions of Na⁺, K⁺, Li⁺ and alkali of Na⁺/H⁺ antiporter subunit F, membrane hypothetical protein and ATP-binding protein. It is demonstrated that resistance to triclosan in staphylococci is associated with acquirement of point mutations in genes of enoyl-acyl protein reductase and also in other genes related to transport of substances in bacterial cell.

Key words: Staphylococcus aureus; antiseptic; bacterial resistance; triclosan; fabI.

For citation: Detusheva E.V., Skryabin Yu.P., Bogun A.G., Kislichkina A.A., Kadnikova L.A., Fursova N.K. The study of patterns of development of resistance of Staphylococcus aureus to triclosan. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic) 2018; 63 (1) 60-64. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-60-64>

For correspondence: Detusheva E.V., candidate of biological sciences, researcher of the department of collection cultures of the Federal budget institution of science "The state scientific center of applied microbiology and biotechnology". e-mail: klub@bk.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study was implemented within the framework of the Federal scientific research of the Rospotrebnadzor № 049 "The monitoring and studying of characteristics of agents of alimentary and hospital infections, development of means of their diagnostic" and № 062 "The genome, proteome and metagenome analysis of strains deposited in the State collection of pathogenic microorganisms and cell cultures (SCAMB, Obolensk)".

Received 29.08.2017
Accepted 31.08.2017

Для корреспонденции: Детушева Елена Владимировна, канд. биологических наук, научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, e-mail: klub@bk.ru

Введение. Устойчивость микроорганизмов к антибактериальным препаратам — антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам — серьёзная проблема современной медицины [1]. Устойчивые к антисептикам и дезинфектантам бактерии выделяются от пациентов лечебных

учреждений и из объектов госпитальной среды [2, 3]. Повсеместно отмечают снижение эффективности антибактериальных препаратов по отношению к современным госпитальным штаммам бактерий [4, 5]. Описано явление перекрестной резистентности бактериальных патогенов к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам [6, 7]. Одна из причин нарастающей резистентности к антибактериальным препаратам — неадекватное использование антибактериальных препаратов, в том числе в сублетальных концентрациях, когда устойчивые линии получают преимущество над чувствительными и вытесняют их из популяции [8, 9].

Одним из широко применяемых в клинической практике антисептиков является триклозан, препарат, имеющий химическую структуру замещенного дифенилового эфира. Этот антисептик активен преимущественно в отношении грамположительных бактерий, что связано с подавлением синтеза бактериальных жирных кислот в результате образования комплекса молекул триклозана с NAD^+ -зависимым ферментом эноил-ацил редуктазой. Молекулярная мишень триклозана в клетках *Staphylococcus aureus* — консервативный фермент эноил-ацил-протеин редуктаза (FabI), катализирующий завершающий этап синтеза длинноцепочечных жирных кислот, кодируемый геном *fabI*. Показано, что резистентность *S. aureus* к триклозану обусловлена мутациями в гене *fabI* [10]. Накопление таких мутаций может происходить в присутствии субингибирующих концентраций триклозана [11]. Эти исследования подтверждают вероятность распространения резистентности к триклозану в связи с его широким использованием [4].

Цель работы — изучение молекулярно-генетических механизмов устойчивости к триклозану на модели референс-штамма *S. aureus* ATCC25913.

Материал и методы. Штамм *S. aureus* ATCC25923 получен из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk». Для культивирования бактерий использовали питательные среды Nutrient Broth, Nutrient Agar (Himedia, Индия) и «ГРМ» (Оболensk, Россия). Культивирование проводили в течение 18—20 ч при температуре 37°C.

В работе применяли препарат Irgasan (Sigma-Aldrich Chemie, Германия), содержащий действующее вещество триклозан с 97% степени очистки.

Селекцию устойчивых к триклозану вариантов штамма *S. aureus* ATCC 25923 осуществляли путём последовательных пересевов бактериальной культуры в питательном бульоне, содержащем ступенчато повышающиеся (с 0,13 до 64 мг/л) концентрации триклозана, в течение 40 дней. Стабильность наследования приобретённой устойчивости к триклозану у полученных вариантов штамма *S. aureus* ATCC 2592 определяли с помощью культивирования на питательном агаре, не содержащем триклозана, в течение 26 мес.

Чувствительность к антисептику триклозану у исходного штамма и штаммов, полученных в результате селективного отбора, определяли методом серийных разведений в бульоне¹.

Для выявления параметров роста (бактериального фитнеса) изучаемых штаммов 100 мкл суспензии суточ-

ной бактериальной культуры ($\sim 1,5 \cdot 10^3$ КОЕ/мл) засекали газном на чашку Петри с питательной средой ГРМ (Оболensk, Россия), культивировали в течение 10—14 ч при температуре 37°C. Измеряли диаметр 10 изолированных колоний, видимых невооружённым глазом, повторяя каждое измерение 8 раз с интервалом времени 1—1,5 ч, с помощью микроскопа ЛОМО МИКМЕД Д-2 (ЛОМО, ОАО СПб, Россия). Расчёт математических показателей G_T (мин) — времени одной генерации, K_D (мм/ч) — скорости линейного роста диаметра колоний, t_{1mm} (ч) — времени достижения колониями диаметра 1 мм проводили по упрощённой модели роста диаметра колоний одноклеточных микроорганизмов [12].

Выделяли бактериальную ДНК СТАВ-методом [13], её количество определяли спектрофотометрически на приборе UV-1700 (Zhimadzu, Япония) при длине волны 260 нм.

Для амплификации фрагмента гена *fabI* *S. aureus* использовали специфичные олигонуклеотидные праймеры: *fabI*-f 5'-ggccsaacaagaacgt-3' и *fabI*-R 5'-gttccassaactgggtgac-3' [10]. Амплификацию проводили в термоциклере DNA Engine Dyad (Bio-Rad, США) при следующем режиме: начальная денатурация при 95°C — 4 мин, затем 25 циклов, включающих денатурацию при 95°C — 30 с, отжиг — 30 с и элонгацию при температуре 72°C — 80 с, в реакционной смеси, содержащей буфер для ПЦР с 15 мМ MgCl₂ (Termo Fisher Scientific, Европа), по 200 мкМ dATP, dCTP, dGTP и dUTP, 10 пмоль каждого праймера, 2,5 ед. *Taq*-полимеразы и 10 нг ДНК. Наличие ПЦР-продукта детектировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле (Amersham Biosciences, Великобритания) с последующей визуализацией ДНК окраской 10% бромистым этидием. Очищали ПЦР-продукты с помощью набора реактивов Dye Terminator CycleS sequencing (Amersham Biosciences, Великобритания), согласно инструкции фирмы-изготовителя. Амплифицированный фрагмент гена секвенировали, используя протокол для автоматического секвенатора MegaBase 750 (Amersham Biosciences, Великобритания).

Полногеномное секвенирование штаммов *S. aureus* осуществляли в системе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США). Геномные библиотеки готовили с помощью набора реагентов Ion Plus Fragment Library Kit (Life Technologies, США). Секвенировали ДНК с использованием генетического анализатора IonTorrentPGM, набора реагентов Ion PGM 400 Sequencing Kit и чипа для секвенирования Ion 318 Chip Kit (Life Technologies, США).

Биоинформационный анализ секвенированных последовательностей ДНК проводили с помощью программ Vector NTI9 (Invitrogen, США), CHROMAS (Technelysium Pty Ltd, Австралия) и веб-ресурса BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Полученные в результате полногеномного секвенирования данные собирали с помощью ассемблера Newbler 2.9, биоинформационный анализ осуществляли с применением программ Vector NTI10 (Invitrogen, США), Mauve (<http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>), LaserGene 11 (DNASTAR, США) и веб-ресурса BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Штаммы бактерий, депонированные в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk»: *S. aureus* Tr1 (B-7890), *S. aureus* Tr2 (B-7891), *S. aureus* Tr1C (B-7921) и *S. aureus* Tr2C (B-7922).

Нуклеотидные последовательности ДНК, размещённые в международной базе данных GenBank: KP100446.1 и KP100447.1

¹МУ 4.2.1890—0.4 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания. М.: 2004.

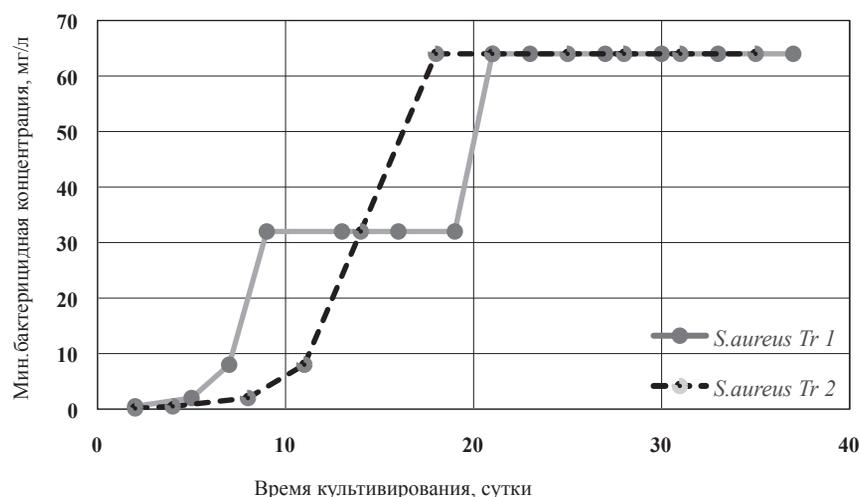


Рис. 1. Формирование устойчивости штамма *S. aureus* ATCC25923 к триклозану в жидкой питательной среде.

Результаты. В результате селективного отбора клеток штамма *S. aureus* ATCC 25923 в условиях ступенчато возрастающих концентраций триклозана в течение 40 сут (13 пассажей) были получены две субкультуры — *S. aureus* Tr1 и Tr2, которые были устойчивы к триклозану с минимальной подавляющей концентрацией (МПК) 64 мг/л, что в 128 раз выше аналогичного показателя исходной культуры. Интересно отметить, что динамика формирования двух триклозан-устойчивых штаммов отличалась — у штамма *S. aureus* Tr1 устойчивость сформировалась в интервале между 2-м и 8-м пассажами, а у штамма *S. aureus* Tr2 — между 3-м и 6-м пассажами (рис. 1).

Показано, что приобретённая устойчивость к триклозану стабильно наследовалась у обоих штаммов: при пересевах на плотной питательной среде, не содержащей триклозана, в течение 26 мес штаммы *S. aureus* Tr1 и Tr2 сохраняли устойчивость к триклозану на прежнем уровне (МПК = 64 мг/л). Полученные в результате культивирования без селективного давления триклозана штаммы обозначены *S. aureus* Tr1С и Tr2С.

Параметры роста (бактериальный фитнес) резистентных к триклозану вариантов штамма *S. aureus* ATCC25923 — Tr1, Tr2, Tr1С и Tr2С сравнивали по трем показателям: время одной генерации (G_T), скорость линейного роста диаметра колоний (K_D) и время достижения колониями диаметра 1 мм (t_{1mm}). Интересно, что, по сравнению с исходным штаммом *S. aureus* ATCC25923 триклозан-устойчивый штамм *S. aureus* Tr1 отличался

несколько замедленным ростом (увеличены показатели G_T и t_{1mm}), а триклозан-устойчивый штамм *S. aureus* Tr2 имел скорость роста, сопоставимую с исходным штаммом (см. таблицу). Характерные параметры роста триклозан-устойчивых штаммов стабильно наследовались при длительном культивировании в отсутствие

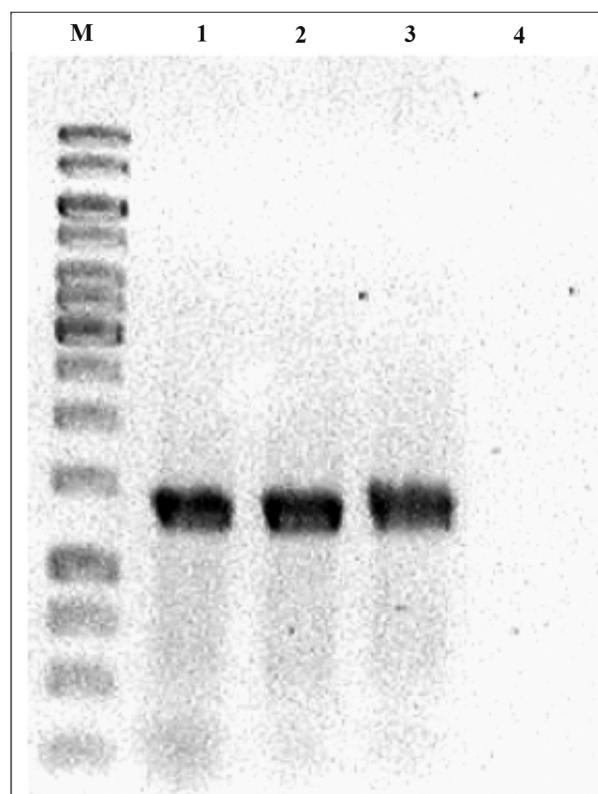


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов гена *fabI*.

М — маркер молекулярных масс ДНК O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 п.н.) (Thermo Scientific, Россия); 1 — *S. aureus* ATCC25923; 2 — *S. aureus* Tr1; 3 — *S. aureus* Tr2; 4 — отрицательный контроль (H_2O).

Параметры роста изучаемых штаммов *S. aureus*

Штамм	G_T , мин	K_D , мм/ч	t_{1mm} , ч
<i>S. aureus</i> ATCC 625923	29 ± 2	0,10 ± 0,01	15 ± 2
<i>S. aureus</i> Tr1	34 ± 1	0,06 ± 0,02	23 ± 2
<i>S. aureus</i> Tr1С	35 ± 2	0,06 ± 0,02	23 ± 2
<i>S. aureus</i> Tr2	30 ± 1	0,10 ± 0,01	17 ± 2
<i>S. aureus</i> Tr2С	29 ± 1	0,09 ± 0,01	16 ± 1

Примечание. G_T — время одной генерации, K_D — скорость линейного роста диаметра колоний, t_{1mm} — время достижения колониями диаметра 1 мм.

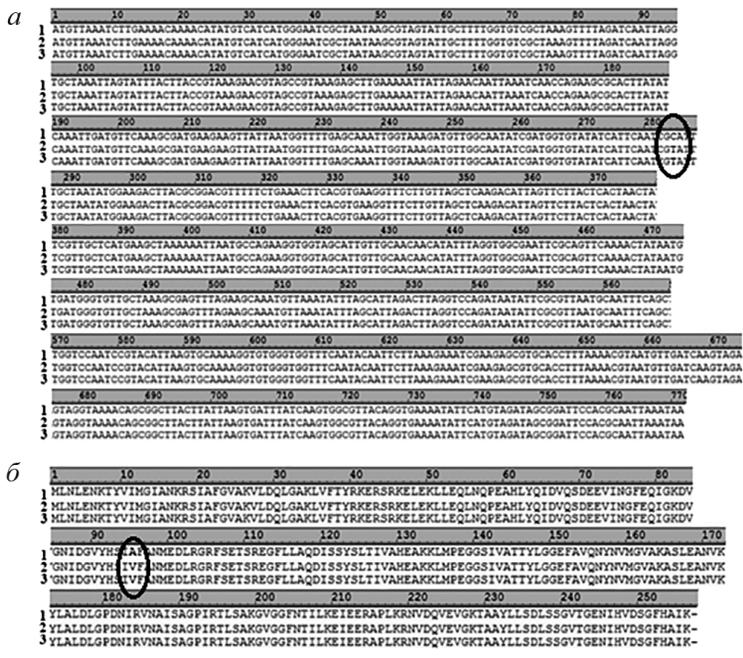


Рис. 3. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *fabI* (а) и аминокислотных последовательностей белка *FabI* (б) штаммов *S. aureus* ATCC25923 (1), *S. aureus* Tr1 (2) и *S. aureus* Tr2 (3).

селективного давления: штамм *S. aureus* Tr1C сохранил параметры роста, характерные для штамма *S. aureus* Tr1, а штамм *S. aureus* Tr2C — для штамма *S. aureus* Tr2 (см. таблицу).

С целью изучения молекулярного механизма резистентности к триклозану у мутантных штаммов *S. aureus* Tr1 и Tr2 проведен анализ первичной структуры гена, кодирующего еноил-ацил редуктазу FabI, которая, как известно из опубликованных ранее литературных данных, является мишенью действия триклозана [10]. С помощью специфичных праймеров амплифицированы фрагменты гена *fabI* размером 1358 п.н. из мутантных штаммов и исходного штамма *S. aureus* ATCC25923 (рис. 2). Секвенирование амплифицированных фрагментов гена *fabI* и биоинформационный анализ последовательностей ДНК показали, что в штаммах *S. aureus* Tr1 и Tr2 присутствуют идентичные нуклеотидные замены C284T, по сравнению с аналогичной последовательностью исходного штамма *S. aureus* ATCC25923, приводящие к аминокислотной замене A95V в продукте гена (рис. 3). Данная мутация описана ранее в исследовании, посвященном изучению механизмов резистентности к триклозану при мультиступенчатой и одноступенчатой *in vitro* селекции штаммов *S. aureus* в присутствии триклозана [14]. В работе Ciusa M.L. и соавт. (2012) наличие аминокислотной замены A95V приводило к повышению МПК с 0,12 мг/л у исходного до 4—8 мг/л у мутантного штамма (в 67 раз). В нашем исследовании чувствительность к триклозану у триклозан-устойчивых штаммов увеличилась с 0,5 до 64 мг/л (в 128 раз).

Полногеномное секвенирование 4-х триклозан-устойчивых вариантов и исходного штамма *S. aureus* ATCC25923 подтвердило наличие точечной нуклеотидной замены C284T в гене *fabI*. Кроме того, в штамме *S. aureus* Tr1 дополнительно выявлены две неописанные ранее в научной литературе мутации: 1) мутация G491A

в гене гипотетического транспортного белка HlyC/CorC family transporter, которая приводит к аминокислотной замене аргинина на гистидин R164H; 2) мутация C137T в гене белка-антипортера Na⁺/H⁺ antiporter subunit F, связанного с устойчивостью к высоким концентрациям ионов Na⁺, K⁺, Li⁺ и щелочам, приводящая к аминокислотной замене метионина на изолейцин M46I. В штамме *S. aureus* Tr2, помимо мутации C284T, идентифицированы ещё две неописанные ранее мутации: 1) мутация A545G в гене мембранного гипотетического белка, приводящая к аминокислотной замене изолейцина на валин — I82V, и 2) мутация G857T в гене АТФ-связывающего белка АТФ-binding protein, которая влечёт образование стоп-кодона вместо триплета, кодирующего глутаминовую кислоту — E86I. Интересно, что мутация C284T в гене еноил-ацил редуктазы, а также описанные дополнительные мутации в генах гипотетического транспортного белка (G491A), белка-антипортера (C137T), мембранного белка (A545G) и АТФ-связывающего белка (G857T) стабильно наследовались при культивировании бактерий в отсутствие селективного давления триклозана (рис. 4). Все описанные мутации локализованы в генах, ассоциированных с транспортом веществ в клетке. Это ещё раз подтверждает важность транспортной функции бактериальной клетки при формировании устойчивости к триклозану.

Обсуждение. Проведённое исследование продемонстрировало возможность селекции устойчивых к

Позиция	S. aureus ATCC 25923			Аминокислотная замена	«Гипотетический» транспортный белок	Позиция	S. aureus ATCC 25923			Аминокислотная замена
	Нуклеотид	Нуклеотид	Нуклеотид				Нуклеотид	Нуклеотид	Нуклеотид	
673033	G	G	G		«Гипотетический» транспортный белок	673033	G	G	C	«Гипотетический» транспортный белок
691206	G	G	G			691206	G	G	A	
692033	A	A	A			692033	A	A	G	
718642	G	A	A	R 164H		718642	G	G	G	
872262	C	T	T	M 46I		872262	C	C	C	
901066	A	A	A			901066	A	T	A	
901548	G	G	G			901548	G	G	A	
902254	C	C	C			902254	C	C	A	
915623	T	T	T			915623	T	C	C	
934170	C	T	C			934170	C	C	C	
935080	C	T	C		935080	C	C	C		
949765	C	C	C		949765	C	T	C		
949792	A	A	G	A 95V	949792	A	A	A		
950082	C	T	T	A 95V	950082	C	T	T	A 95V	
965576	C	T	C		965576	C	C	C		
965577	T	A	T		965577	T	T	T	<i>fabI</i>	
995823	A	T	A		995823	A	A	A		
995827	A	T	A		995827	A	A	A		
995830	T	A	T		995830	T	T	T		
1031907	T	A	T		1031907	T	T	T		
1350035	A	T	A		1350035	A	A	A		
1626577	G	G	C		1626577	G	G	G		
1628017	G	G	G		1628017	G	A	G		
1716398	T	C	T		1716398	T	T	T		
1862440	A	A	A		1862440	A	G	G	I 82V	
2062764	G	A	G		2062764	G	G	G		
2063041	G	G	G		2063041	G	T	T	E 86I	
2320517	C	T	C		2320517	C	C	C		

Рис. 4. Нуклеотидные и аминокислотные замены, выявленные в триклозан-устойчивых штаммах, в сравнении с исходным штаммом *S. aureus* ATCC25923.

триклозану вариантов *S. aureus* при культивировании в присутствии субингибиторных концентраций данного антисептика. Настораживает тот факт, что триклозан-устойчивые штаммы стафилококков формируются относительно быстро — в течение 40 сут культивирования, или 13 пассажей, а также что уровень приобретаемой устойчивости достаточно высок — в 128 раз от исходного уровня. Молекулярный механизм устойчивости штаммов *S. aureus* к триклозану был ассоциирован с приобретением точечных мутаций в ряде генов, описанных ранее в литературе (*fabI*), и новых, ранее не описанных (связанных с мембранным транспортом бактериальной клетки). Полногеномное секвенирование триклозан-устойчивых штаммов *S. aureus* Tr1, Tr2, Tr1C и Tr2C позволило выявить различия в наборах мутаций у двух линий штаммов: в штамме *S. aureus* Tr1 были выявлены стабильно наследуемые мутации в генах гипотетического транспортного белка HlyC/CorC family transporter и белка-антипортера Na⁺/H⁺ antiporter subunit F, а в штамме *S. aureus* Tr2 — мутаций в генах мембранного гипотетического белка и АТФ-связывающего белка АТР-binding protein.

Полученные данные представляют теоретический интерес — с точки зрения понимания молекулярных механизмов эволюции бактерий, устойчивых к антибактериальным препаратам, а также имеют практическое значение для клиницистов и эпидемиологов — для выбора адекватных режимов применения антисептиков и оценки эффективности препаратов биоцидов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках Федеральных НИР Роспотребнадзора № 049 «Мониторинг и изучение свойств возбудителей пищевых и госпитальных инфекций, разработка средств их диагностики» и № 062 «Геномный, протеомный и метагеномный анализ штаммов, депонированных в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболensk»)».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2—11, 13, 14
см. REFERENCES)

1. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Игонина Е.И. Надзор за соблюдением санитарно-эпидемиологического законодательства при оказании медицинской помощи в целях обеспечения ее качества и безопасности. *Вестник Росздравнадзора*. 2016; 1: 74—80.
12. Родин В.Б., Паников Н.С., Кобелев В.С., Акимова Н.А., Холоденко В.П. Упрощенная модель роста колоний одноклеточных микроорганизмов и ее использование для оценки воздействия биоцидов на микробные клетки. *Прикладная биохимия и микробиология*. 1998; 34: 403—9.

REFERENCES

1. Popova A.Y., Yezhlova E.B., Igonina E.I. Supervision of compliance with the sanitary and epidemiological legislation in the provision of medical care in order to ensure its quality and safety. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2016; 1: 74—80. (in Russian)
2. Lax S., Gilbert J.A. Hospital-associated microbiota and implications for nosocomial infections. *Trends Mol. Med.* 2015; 21(7): 427—32.
3. Williams M.M., Armbruster C.R., Arduino M.J. Plumbing of hospital premises is a reservoir for opportunistically pathogenic microorganisms: a review. *Biofouling*. 2013; 29(2): 147—62.
4. Skovgaard S., Nielsen L.N., Larsen M.H., Skov R.L., Ingmer H., Westh H. Staphylococcus epidermidis isolated in 1965 are more susceptible to triclosan than current isolates. *PLoS One*. 2013; 8(4).
5. Ortega Morente E., Fernández-Fuentes M.A., Grande Burgos M.J., Abriouel H., Pérez Pulido R., Gálvez A. Biocide tolerance in bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2013; 162(1): 13—25.
6. Pal C., Bengtsson-Palme J., Kristiansson E., Larsson D.G.J. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*. 2015; 16: 964.
7. Schwaiger K., Harms K.S., Bischoff M., Preikschat P., Mölle G., Bauer-Unkauf I., Lindorfer S., Thalhammer S., Bauer J., Hölzel C.S. Insusceptibility to disinfectants in bacteria from animals, food and humans—is there a link to antimicrobial resistance? *Front Microbiol.* 2014; 5: 88.
8. Capita R., Alonso-Calleja C. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2013; 53(1): 11—48.
9. Kampf G., Degenhardt S., Lackner S., Jesse K., Baum H., Ostermeyer C. Poorly processed reusable surface disinfection tissue dispensers may be a source of infection. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14: 37.
10. Norby Nielsen L. Staphylococcus aureus but not Listeria monocytogenes adapt to triclosan and adaptation correlates with increased *fabI* expression and *agr* deficiency / L. Norby Nielsen, Marianne Halberg Larsen, Sissel Skovgaard, Vicky Kastbjerg, Henrik Westh, Lone Gram, and Hanne Ingmer. *BMC Microbiol.* 2013; 13: 177.
12. Rodin V.B., Panikov N.S., Koblelev V.S., Akimova N.A., Kholodenko V.P. A simplified model for the growth of colonies of unicellular microorganisms and its use for assessing the effect of biocides on microbial cells. *Prikladnaya biokhimiya i microbiologiya*. 1998; 34: 403—9. (in Russian)
11. Forbes S., Latimer J., Bazaid A., McBain A.J. Altered competitive fitness, antimicrobial susceptibility, and cellular morphology in a triclosan-induced small-colony variant of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(8): 4809—16.
13. Thomas J.C., Khoury R., Neeley C.K., Akroush A.M., Davies E.C. Fast CTAB method of human DNA isolation for polymerase chain reaction applications. *Biochem.* 1997; 25(4): 233—5.
14. Ciusa M.L., Furi, Knight D., Decorosi F., Fondi M., Raggi C. et al. A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. of Antimicrob. Agents.* 2012; 40: 210—20.

Поступила 29.08.17
Принята к печати 31.08.17

ВЛАДИМИР ВЛАДИМИРОВИЧ ДОЛГОВ (к 70-летию со дня рождения)



Владимир Владимирович Долгов родился 24 ноября 1947 г. на острове Итуруп (Курильские острова) в семье военнослужащего. В 1972 г. окончил медико-биологический факультет II ММИ им. Н.И. Пирогова по специальности врач-биофизик. После института работал младшим научным сотрудником НИИ кардиологии АМН СССР. В 1979 г. перешёл на кафедру патофизиологии ЦОЛИУв, на которой работал ассистентом, затем доцентом. Кандидатскую диссертацию защитил по специальности кардиология (1975 г.), докторскую – по специальности патофизиология в 1987 г. В 1989 г. В.В. Долгов прошёл по конкурсу на должность профессора кафедры клинической лабораторной диагностики, в 1992 г. избран по конкурсу на должность заведующего кафедрой. В 1994 г. В.В. Долгов назначен на должность главного специалиста лабораторной службы Минздрава РФ.

Владимир Владимирович всячески способствует развитию многогранной деятельности кафедры клинической лабораторной диагностики и лабораторной службы в целом, бережно относясь к достижениям предыдущих поколений преподавателей. Слаженная работа коллектива и заведующего кафедрой позволила в тяжёлые периоды для страны, института и кафедры сохранить научно-педагогическую школу.

Под руководством В.В. Долгова обновлена типовая программа подготовки специалистов, введено несколько новых циклов тематического усовершенствования, расширены возможности усовершенствования

по новым современным лабораторным направлениям, в том числе по первичной подготовке специалистов, усовершенствованию работы заведующих клиничко-диагностическими лабораториями, главных специалистов лабораторной службы, внедрена система интерактивной подготовки курсантов. Свою работу на кафедре В.В. Долгов сочетает с работой клинической базы – ГКБ им. С.П. Боткина в качестве члена Медицинского совета больницы, курирует диагностическую, методическую, учебную, консультативную, экспертную и другие формы работы.

В.В. Долгов вместе с коллективом сотрудников кафедры подготовил современную учебную основу для преподавания специальности клиническая лабораторная диагностика, которая включает руководства, атласы, учебные пособия, методические рекомендации, тестовые задания. Он является главным редактором (совместно с Меньшиковым В.В.) двухтомного Национального руководства «Клиническая лабораторная диагностика» (2012 г.) и двухтомного учебника «Клиническая лабораторная диагностика» (2017–2018 гг.), для подготовки которых были привлечены ведущие специалисты лабораторной службы России и которые являются основой для утверждения клинической лабораторной диагностики как отдельной медицинской специальности.

В.В. Долгов является председателем оргкомитета ставших традиционными весенних конференций по лабораторной диагностике, которые в этом году проводятся уже в 23-й раз и обеспечиваются силами сотрудников кафедры клинической лабораторной диагностики РМАНПО. Он активно участвует в международных, национальных и региональных конгрессах и конференциях по лабораторной медицине, на которых обсуждаются актуальные проблемы лабораторной диагностики, формируются перспективные направления развития и позиция лабораторной службы в условиях перестройки системы здравоохранения.

В.В. Долгов в течение 21 года, будучи главным редактором, издаёт журнал «Лаборатория», состоит членом редколлегии журнала «Клиническая лабораторная диагностика». Под его руководством выполнено и защищено 17 кандидатских и 9 докторских диссертаций. Он является профессором кафедры медицинской биофизики медико-биологического факультета РНИМУ им. Н.И.Пирогова, своей деятельностью привлекает в лабораторную службу молодых перспективных специалистов.

Коллектив кафедры клинической лабораторной диагностики РМАНПО, редакционная коллегия журнала «Клиническая лабораторная диагностика» поздравляют Владимира Владимировича с 70-летним юбилеем и желают ему крепкого здоровья и дальнейших успехов в работе.