

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.



КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 63
2 • 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

ФЕВРАЛЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

ОАО «Издательство "Медицина"»
115088, Москва, Новоостاپовская 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 из-
дания не может быть занесена в память компью-
тера либо воспроизведена любым способом
без предварительного письменного разреше-
ния издателя.

Журнал представлен в базе данных Российско-
го индекса научного цитирования (РИНЦ) и в
следующих международных информационно-
справочных изданиях: Abstracts of Microbiology, Adis
International Ltd Reactions Weekly, Chemical Ab-
stracts (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), Thom-
son 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.akc.ru,

www.pressa-rf.ru

Подписка на электронную версию:
elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2018. № 2. 65–128.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор В. Н. ТИТОВ

А. Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В. В. ДОЛГОВ, Г. Н. ЗУБРИ-
ХИНА, А. А. ИВАНОВ, С. А. ЛУГОВСКАЯ, А. Ю. МИ-
РОНОВ (зам. главного редактора), В. Т. МОРОЗОВА,
Л. М. ПИМЕНОВА (ответственный секретарь), Л. М. СКУ-
ИНЬ, А. А. ТОТОЛЯН, И. П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.Н. АРИПОВ (*Ташкент*), Т.В. ВАВИЛОВА (*Санкт-Пе-
тербург*), I. WATSON (*Великобритания, Ливерпуль*),
А.Ж. ГИЛЬМАНОВ (*Уфа*), Д.А. ГРИЩЕНКО (*Красно-
ярск*), В.С. ГУДУМАК (*Кишинёв*), Н.Г. ДАШКОВА (*Москва*),
В.А. ДЕЕВ (*Киев*), Т.И. ДОЛГИХ (*Омск*), С.А. ЕЛЬЧАНИНО-
ВА (*Барнаул*), А.В. ИНДУТНЫЙ (*Омск*), А. KALLNER (*Шве-
ция, 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. КО-
ЧЕТОВ (*Москва*), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (*Москва*), Г.Г. ЛУНЕ-
ВА (*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 (*Мос-
ква*), Д.Б. САПРЫГИН (*Москва*), С.Н. СУПЛОТОВ (*Тюмень*),
О.А. ТАРАСЕНКО (*Москва*), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (*Моск-
ва*), А.Б. УТЕШЕВ (*Алматы*), Л.А. ХОРОВСКАЯ (*Санкт-
Петербург*), С.В. ЦВИРЕНКО (*Екатеринбург*), А.Н. ШИ-
БАНОВ (*Москва*), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (*Санкт-Петербург*),
Г.А. ЯРОВАЯ (*Москва*)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"

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

KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 63
2 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

FEBRUARY

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-meditsina@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 Microbiology,
Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical
Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost
Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EM-
BASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Ab-
stract Journals, Index Medicus, Index to Dental
Literature, National Library of Medicine PubMed,
OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions
Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Ab-
stracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Pre-
views, 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. ZUBRICH-
NA, A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, A.Yu. MIRO-
NOV (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. MAVZYTОВ (*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. REZNICOV
(*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-Peter-
burg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

БИОХИМИЯ

- Титов В.Н., Щёкотова А.П. Филогенетическая теория общей патологии. Перicyты. Функция дистального отдела артериального русла. Метаболическая артериальная гипертензия и гиповолемия при шоке 68
- Бородкина Д.А., Груздева О.В., Белик Е.В., Паличева Е.И., Кузьмина А.А. Перспективы использования ретинолсвязывающего белка в качестве биомаркера риска кардиоваскулярной патологии 79
- Голощапов-Аксенов Р.С., Аксёнов В.В., Луценко В.Д. Прогнозирование острого инфаркта миокарда по биохимическим показателям крови 85

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Матвеева И.И. Основные метаболиты феррокинетики в дифференциальной диагностике анемического синдрома с микроцитарными, гипохромными характеристиками эритроцитов у больных колоректальным раком 89

КОАГУЛОЛОГИЯ

- Аюпова Р.Ф., Султанбаев У.С., Жибурт Е.Б. Возможность использования исторической концентрации тромбоцитов в обследовании доноров 95

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Маянский Н.А. Масс-спектрометрическая оценка карбапенемазной активности *Pseudomonas aeruginosa* 99
- Тец В.В., Тец Г.В., Смирнова Е.И., Заславская Н.В., Викина Д.С., Артеменко Н.К., Вечерковская М.Ф., Казаков С.П., Путков С.Б., Эсауленко Н.Б., Тугарина Т.М. Выбор антибиотика по результатам стандартного бактериологического исследования и экспресс-метода без выделения чистых культур 106
- Юнусова Р.Ю., Горелова В.Г., Комбарова С.Ю., Алёшкин А.В., Ефимова О.Г., Бичучер А.М., Мартыненко И.Г., Алиева Э.Р. Совершенствование питательной среды Эндо для выявления и идентификации энтеробактерий 110
- Наумкина Е.В., Матущенко Е.В., Абросимова О.А., Калинина И.И., Соколова Т.Н., Иванова С.Ф., Пядочкина Т.В. Микробиологический мониторинг как основа эпидемиологического надзора и антимикробной терапии в условиях многопрофильного стационара 113

ИММУНОЛОГИЯ

- Воронин Д.Н., Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И., Лицова А.О., Анциферова Ю.С. Взаимосвязь особенностей активации эндометриальных CD56+ естественных киллеров с характером роста миоматозных узлов у пациенток с лейомиомой матки 119

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Аксельрод Э.В., Миронов К.О., Михайленко Д.С., Ефремов Г.Д., Перепечин Д.В., Алексеев Б.Я., Потехина Е.С., Шипулин Г.А. Разработка и апробация методики на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для определения клинически значимых микроделеций в Y-хромосоме 124

BIOCHEMISTRY

- Titov V.N., Schekotova A.P. The phylogenetic theory of general pathology. Pericytes. Function of distal part of arterial bloodstream. Metabolic arterial hypertension and hypovolemia under shock 68
- Borodkina D.A., Gruzdeva O.V., Belik E.V., Palicheva E.I., Kuzmina A.A. The perspectives of application of retinol-binding protein as a biomarker of risk of cardiovascular pathology 79
- Goloschapov-Aksenov R.S., Aksenov V.V., Lutsenko V.D. The prognostication of acute myocardium infarction according biochemical indices of blood 85

HEMATOLOGY

- Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Matveeva I.I. The main metabolites ferrokinetics in differential diagnostic of anemic syndrome with microcytic, hypochromic characteristics of erythrocytes in patients with colorectal cancer 89

COAGULOGY

- Ayupova R.F., Sultanbaiev U.S., Zhiburt E.B. The possibility of applying historical concentration of thrombocytes in examination of donors 95

MICROBIOLOGY

- Bocharova Yu.A., Chebotar I.V., Kryzhanovskaya O.A., Mayansky N.A. The mass-spectrometric evaluation of carbapenemase activity of *Pseudomonas aeruginosa* 99
- Tetz V.V., Tetz G.V., Smirnova E.I., Zaslavskaya E.V., Vikina D.S., Artemenko N.K., Veчерkovskaya M.F., Kazakov S.P., Putkov S.B., Esaulenko N.B., Tugarina T.V. The choice of antibiotic according the results of standard bacteriological analysis and express-method without isolation of pure cultures 106
- Yunusova R.Yu., Gorelova V.G., Kombarova S.Yu., Aleshkin A.V., Efimova O.G., Bichucher A.M., Martynenko I.G., Alieva E.R. The development of Endo growth medium for detection and identification of enterobacteria 110
- Naumkina E.V., Matuschenko E.V., Abrosimova O.A., Kalitina I.I., Sokolova T.N., Ivanova S.F., Pyadochkina T.V. The microbiological monitoring as a basis of epidemiological control and anti-microbial therapy in conditions of multi-type hospital 113

IMMUNOLOGY

- Voronin D.N., Sotnikova N.Yu., Malyshkina A.I., Litsova A.O., Antsiferova Yu.S. Relationship between activation of endometrial CD56+ natural killers and the character of leiomyoma nodules growth in patients with uterine leiomyoma 119

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Akselrod E.V., Mironov K.O., Mikhailenko D.S., Efremov G.D., Perepechin D.V., Alekseev B.Ya., Potekhina E.S., Shipulin G.A. The development and approbation of methodology on the basis of multiplex polymerase chain reaction in real-time to determine clinically significant micro-deletion in Y-chromosome 124

БИОХИМИЯ

© ТИТОВ В.Н., ЩЕКOTOVA А.П., 2018

УДК 616.12-008.331.1-092:612.015.3

Титов В.Н.¹, Щекотова А.П.²

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ. ПЕРИЦИТЫ. ФУНКЦИЯ ДИСТАЛЬНОГО ОТДЕЛА АРТЕРИАЛЬНОГО РУСЛА. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АРТЕРИАЛЬНАЯ ГИПЕРТОНИЯ И ГИПОВОЛЕМИЯ ПРИ ШОКЕ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, 121552, Москва, Россия;

²ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614090, Пермь, Россия

В роли сократительных сфинктеров перicyтов, гладкомышечных клеток, монослоя эндотелия, прекапиллярных артериол мышечного типа, обменных, объёмных капилляров, в физиологическом отношении объёма пула крови и объёма дистального отдела артериального русла in vivo предстоит еще разобраться. В то же время, вероятно, что:

1) не существует первичной артериальной гипертензии; компенсаторная биологическая реакция артериального давления (АД) всегда вторична, выявляет наличие у пациентов симптоматической или метаболической формы артериальной гипертензии (АГ);

2) повышение АД в проксимальном отделе артериального русла является компенсаторной реакцией в ответ на нарушения метаболизма, микроциркуляции, биологической реакции метаболизм ↔ микроциркуляция; формируется она локально в дистальном отделе артериального русла (артериолы мышечного типа, функциональные сфинктеры, перicyты);

3) метаболическая АГ – патология раннего в филогенезе дистального отдела артериального русла, функции монослоя эндотелия, гладкомышечных клеток, перicyтов;

4) полагаем, формирование «острой» гиповолемии при шоке – состояние атонии сфинктеров (перicyтов) в прекапиллярных артериолах мышечного типа с формированием афизиологичного по объёму дистального отдела артериального русла; физиологичного объёма крови становится явно недостаточно для заполнения русла;

5) когда локальное нарушение биологической реакции метаболизм ↔ микроциркуляция локально не компенсирует эндотелий зависимую вазодилатацию, с уровня организма, из сосудодвигательного центра, следует эфферентная иннервация на сердце, системное повышение АД в проксимальном и далее в дистальном отделе артериального русла;

6) системное повышение АД нарушает функцию органов мишеней – почек, головного мозга, легких; каждый из них регулирует параметры гидродинамики в локальном пуле межклеточной среды, функция их оказывается нарушенной, и теперь органы формируют реакцию компенсации;

7) метаболическая АГ – результат несогласованной системной компенсации локальных нарушений четырёх биологических функций – гомеостаза, эндоэкологии, трофологии и адаптации, которые происходят на уровне паракринно регулируемых сообществ функционально разных клеток – структурных единиц каждого из органов.

Ключевые слова: артериальное давление; артериальная гипертензия; эндотелий; перicyты; гладкомышечные клетки; шок.

Для цитирования: Титов В.Н., Щекотова А.П. Филогенетическая теория общей патологии. Перicyты, функция дистального отдела артериального русла, метаболическая артериальная гипертензия и гиповолемия при шоке. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(2) 68-78. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-68-78>

Titov V.N.¹, Schekotova A.P.²

PHYLOGENETIC THEORY OF GENERAL PATHOLOGY. PERICYTES, FUNCTION OF THE DISTAL ARTERIAL BED, METABOLIC ARTERIAL HYPERTENSION AND HYPOVOLEMIC SHOCK

¹National Medical Research Center of Cardiology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, 121552;

²E.A. Vagner Medical University, Ministry of Health, Perm, 614090

The in vivo roles of pericyte contractile sphincters, smooth muscle cells, endothelial monolayer, precapillary muscle arterioles, exchange and volume capillaries in the physiological balance between peripheral blood pool and the blood pool volume in the distal arterial bed are not fully understood. However, it is highly probable that:

1. There is no primary arterial hypertension. The compensatory biological reaction of arterial pressure (AP) is always secondary, thus indicating the presence of symptomatic or metabolic arterial hypertension (AH).

2. Elevation of AP in proximal arterial bed is a compensatory response to metabolic disorders and impaired microcirculation and metabolism ↔ microcirculation biological reaction. The response develops locally in the distal arterial bed (muscle arterioles, functional sphincters, pericytes).

3. Metabolic AH is a pathology of the phylogenetically early distal arterial bed, endothelial monolayer, smooth muscle cell and pericyte function.

4. We believe that formation of acute hypovolemic shock is the condition of sphincter (pericyte) atonia in precapillary muscle

arterioles with formation of a nonphysiological blood volume in the distal arterial bed when physiological volume of peripheral blood is insufficient to fill the bed.

5. When local disorder in the biological reaction metabolism ↔ microcirculation is not compensated by endothelium-dependent vasodilation, an efferent innervation signal from the vasomotor center at the entire organism level is sent to the heart and systemic AP increases first in the proximal then in the distal arterial bed.

6. Systemic AP elevation impairs function of the target organs: kidneys, brain and lungs. Each of these organs regulates hydrodynamics in the local pool of extracellular medium, their dysfunction inducing a compensatory response.

7. Metabolic arterial hypertension results from disordered systemic compensation of local disorders in the following biological functions: homeostasis, endoecology, trophology and adaptation. This discoordination occurs at the level of paracrine regulated cell communities of functionally different cells which are structural units of each internal organ.

Key words: arterial pressure, arterial hypertension, endothelium, pericytes, smooth muscle cells, shock.

For citation: Titov V.N., Schekotova A.P. Phylogenetic theory of general pathology. pericytes, function of the distal arterial bed, metabolic arterial hypertension and hypovolemic shock. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018;63(2): 68-78 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-68-78>

For correspondence: Titov Vladimir Nikolaevich, doctor of medical sciences, professor; 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 07.04.2017
Accepted 15.04.2017

Практика медицинской науки последних лет показывает: если мы не в силах разобраться в этиологии и патогенезе клинического состояния, которое часто заканчивается летальным исходом, нам нечего предложить для объяснения происходящего *in vivo*, мы обращаемся к филогенетической теории общей патологии. Со слов Д.И. Менделеева, «нет ничего более практичного, чем хорошая теория»; медицина – часть общей биологии и наука историческая, филогенетическая. Филогенез – единый анамнез всего живого; реализация его продолжается на протяжении 4 млрд лет.

Филогенетическая теория уже дала нам возможность: а) охарактеризовать факторы этиологии распространенных в популяции 7 метаболических пандемий, болезней «цивилизации»; б) разобраться в становлении *in vivo* функции лимфатической системы; в) проследить становление гематоэнцефалического барьера и локального пула спинномозговой жидкости; г) изложить единение патогенеза и различия этиологических факторов атеросклероза и атероматоза; д) охарактеризовать патогенез метаболического синдрома как локальную патологию пула инсулиннезависимых, ранних в филогенезе висцеральных жировых клеток сальника и е) охарактеризовать синдром резистентности к инсулину как патологию в первую очередь жирных кислот и во вторую – глюкозы; высказать предположение, что биологическая роль инсулина состоит в превращении на суше ранее плотоядных (рыбоядных) животных в травоядные, включая и вид *Homo sapiens* [1].

При выяснении этиологических факторов регуляции микроциркуляции и патогенеза клинического состояния шока внимание наше привлекает несколько обстоятельств: а) биологическая роль перicyтов – ранних в филогенезе клеток дистального отдела артериального русла, сфинктеров прекапиллярных артериол мышечного типа; они тесно ассоциированы с монослоем эндотелия и биологическая роль их окончательно не определена [2]; б) рассмотрение патофизиологии, патогенеза и клинических форм снижения

(падения) гидродинамического давления в дистальном отделе артериального русла и далее артериального давления (АД) в проксимальном отделе, в артериях эластического типа; в) формирования клинического состояния гипотонии (гиповолемии) во всех её проявлениях, включая: а) состояния обморока (синкопе); б) падение ударного объема сердца и при в) патогенетически разных состояниях шока [3]; г) в какой мере анатомические различия перicyтов и гладкомышечных клеток (ГМК) на ступенях филогенеза стали основой различия их функции в регуляции биологической реакции метаболизм ↔ микроциркуляция (М ↔ М) в дистальном отделе артериального русла [4] и д) хотя патогенетические факторы позволяют различать геморрагический, травматический, дегидратационный, ожоговый, кардиогенный, септический и анафилактический шок, с позиций этиологии биологической реакции шока один [5].

На ступенях филогенеза сложилось так, что: а) повышение АД происходит в проксимальном отделе артериального русла, в артериях эластического типа, а затем возрастает гидродинамическое давление в дистальном отделе артериол мышечного типа, компенсируя нарушения биологической реакции М ↔ М; б) нарушение биологической реакции метаболизм ↔ микроциркуляция и микроциркуляция ↔ метаболизм являются разными; обе они могут быть как физиологичными, так и афизиологичными; последствия нарушения их разные; в) снижение гидродинамического давления (наиболее часто), до состояния обморока (синкопе) и шока, формируется в дистальном отделе артериального русла, в артериолах мышечного типа, и распространяется далее на проксимальный отдел, артерии эластического типа [6].

И если рассматривать взаимоотношение в биологической реакции М ↔ М нарушений метаболизма и микроциркуляции (что первично, что вторично), наиболее частой причиной формирования гипертонии и гипотонии в дистальном отделе артериального русла оказываются нарушения метаболизма, реакций приобретенного иммунитета, а не первичная патология

микроциркуляции. В то же время в проксимальном отделе артерий в биологической реакции $M \leftrightarrow M$ наиболее часто происходит формирование патологии циркуляции крови (макроциркуляции) при вторичных нарушениях метаболизма [7].

Ответственен за формирование артериальной гипертонии (АГ) в проксимальном отделе артерий эластического типа, за регуляцию сердечно-сосудистой системы – сосудодвигательный центр продолговатого мозга и центральный насос, сердце. Ответственными за формирование гипотонии в дистальном и проксимальном отделе артериального русла являются сфинктеры прекапиллярных артериол мышечного типа, более вероятно, перicyты [8, 9].

Механистичная модель сердечно-сосудистой системы и патогенетические механизмы формирования гипотонии. В ранее опубликованных работах, которые посвящены выяснению этиологических факторов и патогенеза эссенциальной, метаболической АГ, для понимания механизмов повышения АД мы использовали механистичную модель сердечно-сосудистой системы (рис. 1). Мы предлагаем воспользоваться ею еще раз для понимания различия формирования *in vivo* клинических состояний циркуляции. Гипотония в системе может развиваться в нескольких ситуациях: 1) в условиях ослабленной функции насоса в системе при сохранении параметров системы циркуляции и объема циркулирующей среды; 2) при уменьшении объема жидкой среды, которая циркулирует в системе постоянной по объему; 3) если локально увеличить объем отдельных участков системы циркуляции и сохранить объем циркулирующей жидкости; 4) при одномоментном увеличении объема дистального отдела внутрисосудистого русла, системы циркуляции при сохранении того же объема циркулирующей среды.

Диагноз «шок» основан на таких симптомах: а) снижение АД и тахикардия (при торпидной фазе); б) беспокойство (эректильная фаза) или затемнение сознания; в) стенозированное дыхание; г) уменьшение объема выделяемой мочи; д) холодная, влажная кожа с бледно-цианотичной или мраморной окраской; замедление наполнения капилляров [10].

В клинической трактовке приведенных моделей первая ситуация отражает клиническую картину кардиогенного шока; формируется он у пациентов с острым коронарным синдромом. Происходит это при инфаркте миокарда, при: а) выраженном снижении ударного объема левого желудочка; б) при сохранении объема циркулирующей крови и объема дистального отдела артериального русла – артериол мышечного типа; в) при ненарушенной биологической реакции эндотелий зависимой вазодилатации и отсутствии нарушений биологической реакции $M \leftrightarrow M$.

Мы говорим об объеме дистального отдела артериального русла, об артериолах мышечного типа и прекапиллярном русле, поскольку объем проксимального отдела артериального русла, артерий эластического тип практически не меняется; исключение составляет аневризма аорты. Медикаментозное воздействие при этом направлено на: а) нормализацию метаболизма

миокарда; б) поддержание сократительной функции сердца и в) умеренное уменьшение (оптимизацию) объема системы циркуляции, большого и малого круга кровообращения, не допуская и перегрузки большого и малого кругов кровообращения по объему.

Вторая модель гипотонии обобщает те изменения, которые происходят в клинике при экзогенной или эндогенной кровопотере, при геморрагическом шоке. В этих условиях объем циркулирующей крови явно недостаточен для заполнения физиологического объема системы циркуляции. В этих условиях биологическая функция адаптации, биологическая реакция компенсации формирует афизиологичную, вынужденную реакцию централизации кровообращения. Это требует переливания крови (кровезаменителей) с целью препятствовать реализации реакции централизации и последующей афизиологичной биологической реакции $M \leftrightarrow M$; столь часто она влечет за собой необратимые последствия.

Третье моделирование ситуации отражает состояние гипотонии, которое может быть длительным, если не постоянным. Это, мы полагаем, следствие полифункциональных нарушений сердечно-сосудистой системы, патология биологической реакции эндотелий-зависимой вазодилатации, функции периферического сердца – перистальтических артериол мышечного типа. Причинами гипотонии становятся: а) умеренная (алиментарная) гипонатриемия в локальном пуле внутрисосудистой межклеточной среды; б) снижение функции клеточной помпы (Na^+ , K^+ , АТФазы); в) низкая эффективность выработки митохондриями АТФ при нарушениях их функции; г) пальмитиновый вариант метаболизма *in vivo* жирных кислот; г) сниженная активность симпатической нервной системы, продукция катехоламинов. При этом снижение систолического и диастолического АД не столь выражено; барорецепторы *in vivo* локально не инициируют афферентную сигнализацию в мозг, нет и эфферентной сигнализации с уровня организма.

Вариант 4-й модели гипотонии характеризует быстрое понижение (падение) АД в течение часов с развитием картины анафилактического шока и формированием: а) выраженной гипотонии через краткое время после введения противостолбнячной сыворотки; б) специфичной картины, свойственной анафилактическому шоку; в) галопирующего течения патологического процесса и г) отсутствия реакции на медикаментозные воздействия. Это дает основание говорить о быстром увеличении объема циркуляции (артериального русла) при явно недостаточном, физиологичном объеме циркулирующей крови. Атония прекапиллярных сфинктеров артериол мышечного типа дистальной части артериального русла афизиологично увеличивает объем русла до таких размеров, что физиологичного объема циркулирующей крови становится явно недостаточно.

Объем циркулирующей крови, объем сосудистого русла и величина периферического сопротивления кровотоку – факторы, которые определяют параметры функции миокарда. Основу анафилактического

шока составляет выброс в кровоток большого количества активных гуморальных медиаторов, которые синтезируют филогенетически ранние клетки рыхлой соединительной ткани (РСТ) в каждом из паракринно регулируемых сообществ (ПС) клеток *in vivo*.

Эти гуморальные медиаторы вызывают афизиологичную релаксацию (атонию) прекапиллярных сфинктеров в прекапиллярном отделе артериол мышечного типа, в системе микроциркуляции. В результате при малом периферическом сопротивлении кровотоку объём циркулирующей крови становится явно недостаточным по отношению к резко возросшему объёму дистального отдела артериального русла [11]. Условно этот процесс можно охарактеризовать как децентрализацию кровотока, быстрое формирование афизиологичной гиповолемии без уменьшения нормального объёма циркулирующей крови [12]. И если кардиогенный шок – это в первую очередь патология центрального насоса системы кровообращения, нарушение проксимального отдела артериального русла, падение сократительной способности миокарда, то анафилактический шок – патология, артериол мышечного типа и прекапиллярных сфинктеров.

Согласно схеме патогенеза анафилактического шока, внимание сконцентрировано на следующем.

Основу патогенеза анафилактического шока составляет острая, функциональная атония сфинктеров, локализованных в артериолах мышечного типа перед обменными капиллярами. Острое формирование функциональной гиповолемии происходит при увеличении объёма дистального отдела артериального русла, артериол мышечного типа, капиллярного и начальных отделов венозного русла [13].

Эндогенные инициаторы анафилактического шока – гиперсекреция клетками РСТ в ПС гуморальных медиаторов (гистамин, серотонин, провоспалительные цитокины и такие же лейкотриены). Происходит это как следствие афизиологичной биологической функции адаптации, биологической реакции компенсации, гиперреактивности приобретенного иммунитета в ответ на повторное воздействие *in vivo* экзогенного, инфекционного аллергена.

Анафилактический шок – афизиологичная гиперреакция, патологический вариант реализации *in vivo* синдрома биологической реакции воспаления на фоне отсутствия активности синдрома компенсаторной противовоспалительной защиты.

Физиологичный объём циркулирующей крови в течение часа (часов) оказывается в 2–3 раза меньше возросшего объёма дистального отдела артериального русла. Это формирует гиповолемию, сердечную, легочную недостаточность, гипоксию и гиперкапнию, выраженное нарушение метаболизма в клетках, тканях и органах с развитием метаболического ацидоза.

Афизиологичная дилатация артериол мышечного типа провоцирует утрату тонуса более проксимально расположенными объёмными сосудами (обменными капиллярами) в начале венозного отдела с увеличением пула крови, который афизиологично локализуется в венозном русле.

Кровь с трудом доходит до правого желудочка; при низкой скорости кровотока и скоплении крови в обменных капиллярах и в начале венозного отдела [14]; это в ещё большей мере увеличивает дефицит циркулирующего объёма крови.

Гиповолемия выражено уменьшает приток венозный кровотока к сердцу, уменьшает давление заполнения правого и левого желудочков; ударный объём сердца становится существенно меньшим. Это нарушает сократительную способность миокарда; при снижении производительности сердца как центрального насоса в системе кровообращения, происходит дальнейшее уменьшение объёма циркулирующей крови.

При действии активных гуморальных медиаторов с локальным действием возрастает проницаемость плазматических мембран клеток с развитием интерстициальных отеков в тканях головного мозга, легких с явлениями ларинго- и бронхоспазма, спастическим состоянием капилляров кожных покровов [15, 16]. Клинически проявляются симптомы легочной и сердечной недостаточности, гипоксии, гиперкапнии с формированием в первую очередь дыхательного и циркуляторного ацидоза, падением парциального давления pO_2 и афизиологичным возрастанием pCO_2 .

Активации биологической функции адаптации, биологической реакции компенсации, усиления симпатoadреналовой активности при анафилактическом шоке не происходит. Определено это тем, что сфинктеры, которые физиологично реализуют компенсаторную реакцию в дистальном отделе артериального русла (артериол мышечного типа), пребывают в состоянии атонии; возобновить сокращение атоничные сфинктеры в сохранении афизиологичных условий не в состоянии.

По мере формирования анафилактического шока во всех ПС клеток развивается гипоксическое нарушение метаболизма *in vivo* с накоплением кислых продуктов биохимических реакций окисления субстратов. Усилено, в частности, образование молочной кислоты (лактата) в биохимических реакциях гликолиза, активация синтеза гепатоцитами кетонных тел при гипоксии и гипогликемии в пуле спинномозговой жидкости, в ликворе при гликопении, в цитоплазме нейронов и астроцитов.

Это приводит к дилатации прекапиллярных сфинктеров в дистальном отделе артериального русла, в то время как более проксимально расположенные сосуды остаются недилатированными. В это время кровь из дилатированных артериол мышечного типа переходит в обменные капилляры; происходит это в условиях, когда отток крови из обменных капилляров в венозное русло затруднен. При повышении гидродинамического давления в обменных капиллярах гидрофильная среда плазмы крови, преодолевая градиент невысокого онкотического давления альбумина, диффундирует в интерстициальную ткань, выходя из сосудистого русла. Во внесосудистой среде жидкая часть крови формирует внутритканевые отеки, как это происходит при возникновении «крапивницы» в поверхностных слоях кожи.

При замедлении скорости кровотока, увеличении микровязкости крови, при выраженном метаболическом ацидозе, изменении жидкокристаллических свойств мембраны эритроцитов клетки утрачивают отрицательный заряд, формируемый аминокислотами, и агрегируют с образованием структур – «монетных столбиков»; с ними ассоциируются агрегаты тромбоцитов.

Когда вязкость крови становится столь высокой, что формируется трудно преодолимое периферическое сопротивление кровотоку, замедление его, повышение параметров свертывания крови, начинается диссеминированное, внутрисосудистое свертывание крови.

При анафилактическом шоке патологические изменения из мест первичного формирования патологии в атоничных прекапиллярных сфинктерах артериол мышечного типа в дистальном отделе артериального русла захватывают и проксимальный отдел – артерии эластического типа.

Начальные этапы кардиогенного шока формируются в проксимальном отделе артериального русла, в артериях эластического и смешанного типа, с развитием инфаркта миокарда и недостаточностью центрального насоса кровообращения. Анафилактический шок, напротив, формируется в филогенетически раннем, дистальном отделе артериального русла, в артериолах мышечного типа. Все их, начиная с работ М.В. Яновского [17], мы рассматриваем как функционально единое, ранее в филогенезе «периферическое сердце», миллионы локальных перистальтических насосов в каждом ПС клеток.

Одновременно децентрализованные, филогенетически ранние насосы в ПС являются и основными регуляторами параметров кровообращения при отсутствии активности биологической функции локомоции, путем реализации биологической реакции эндотелий зависимой вазодилатации. При активации же биологической функции локомоции, движения за счет сокращения поперечнополосатых, скелетных миоцитов, первенство в регуляции кровотока тут же переходит к сердцу, центральному насосу в системе кровообращения. И физиологичная «реакция сдвига» [18] на мембране монослоя эндотелия артериол мышечного типа синхронизирует биологическую реакцию эндотелий зависимой вазодилатации с ударным объемом левого желудочка и пульсовой волной.

Клиническая картина обморока (синкопе) – внезапная, непродолжительная потеря сознания при проходящей ишемии головного мозга, изменении параметров спинномозговой жидкости [19]. Выделяют следующие факторы формирования синкопе: а) быстрое, выраженное уменьшение периферического сопротивления кровотоку при дилатации части прекапиллярных артериол мышечного типа (в брюшной полости) в дистальном отделе артериального русла [20]; б) понижение объема циркулирующей крови, с увеличением её микровязкости, снижением скорости кровотока и объема циркулирующей крови, с увеличением её микровязкости, снижением скорости кровото-

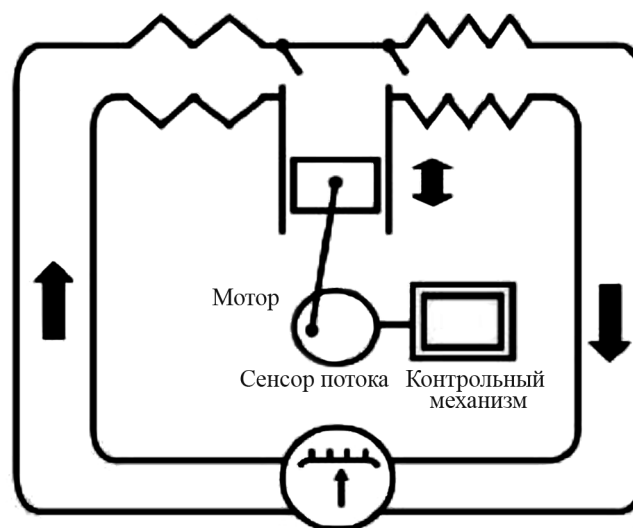


Рис. 1. Механистическая модель сердечно-сосудистой системы, приведённая для понимания условий изменения гидродинамического давления в циркулирующей среде.

ка и объема циркулирующей крови. Физиологическое действие нашатырного спирта (10% водный раствор аммиака NH_4) обусловлено его местным, раздражающим действием: он возбуждает чувствительные окончания (хеморецепторы) нервных окончаний верхних дыхательных путей – тройничного нерва. Это афферентно стимулирует дыхательный и сосудодвигательный центры продолговатого мозга, вызывает учащение дыхания и повышение АД в проксимальном отделе артериального русла. Но анафилактический шок – это не синкопе; взаимодействие многих факторов нарушения функции кровообращения – причина того, что купирование анафилактического шока является проблемой неотложной диагностики в отделении реанимации и неотложной терапии.

Единение в филогенезе биосла клетки: ранний эндотелий + подоциты и более поздний эндотелий + гладкомышечные клетки. Согласно филогенетической теории общей патологии, каждое ПС *in vivo* состоит из 3 пулов функционально разных клеток: а) специализированные клетки определяют специфичную функцию ПС; б) локальный перистальтический насос осуществляет перфузию межклеточной среды в ПС и в) пул полифункциональных клеток РСТ; реализуют они биологические функции трофологии и гомеостаза, биологическую функцию адаптации и эндозологии («чистоты» межклеточной среды) с биологическими реакциями экскреции и воспаления.

Согласно нашим представлениям, локальный перистальтический насос – это функциональный биослой эндотелий : гладкомышечные клетки. Клапанов сосуд не имеет; функцию его регулируют гуморальные медиаторы; их *in situ* синтезируют и локально (паракринно) секретируют клетки монослоя эндотелия. Вазодилатацию перистальтического насоса, фазу насыщения межклеточной среды и формирование волны перистальтики, обеспечивает синтез и секре-

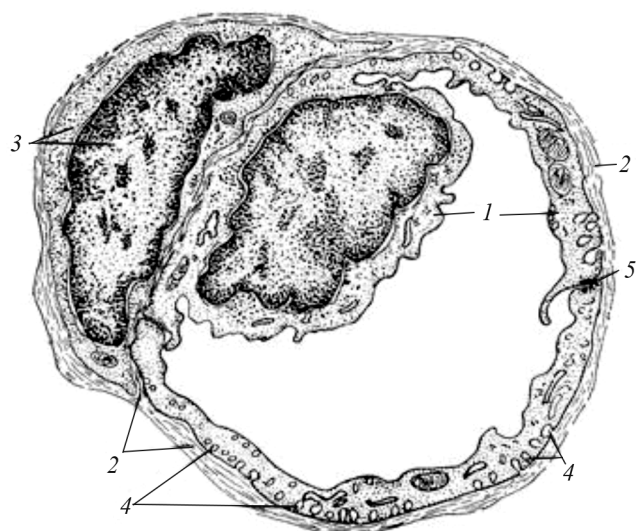


Рис. 2. Морфологическое и функциональное единение клеток эндотелия и сократительного перicyта.

1 – эндотелиоцит; 2 – базальная мембрана; 3 – перicyт; 4 – пиноцитозные микропузырьки – биологическая реакция транцитоза; 5 – зона контакта между клетками эндотелия.

ция эндотелием гуморального вазодилатора – оксида азота (NO). Во избежание ретроградного потока по окончании волны перистальтики насос спазмирует действие вазоконстриктора эндотелина. При отсутствии синтеза NO эндотелин постоянно секретирует эндотелий; физиологичное состояние перистальтического насоса – сокращение гладкомышечных клеток. NO и эндотелин-реципрокные гуморальные медиаторы, синтезируемые *in situ* эндотелием.

Согласно тому, что было предложено ранее, волну перистальтики монослой гладкомышечных клеток насоса формирует: а) синтез NO и б) химические превращения его $\text{NO} \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}_3 \rightarrow$ и опять NO; это цикл оксида азота. Многочисленные на ступенях филогенеза предшественники сосудисто-сердечной системы были незамкнутыми. Порой, можно полагать, первичные насосы перекачивали межклеточную среду между ПС в несколько этапов. В наследство от такой гидродинамики, остались *in vivo* целомические, серозные полости. Они, как и все структуры сосудистого русла, выстланы монослоем эндотелия, мезотелия. В них происходило (происходит) афизиологичное депонирование межклеточной среды при образовании избыточного её количества в кровотоке. Происходит это в условиях перегрузки по объёму большого, малого круга кровообращения; регулируют эту физиологичную реакцию натрийуретические пептиды.

Пристальное внимание к начальным этапам формирования сосудисто-сердечной системы, включая патогенез острой, афизиологичной гиповолемии при анафилактическом шоке, даёт основание полагать, что, вероятно, при формировании локального перистальтического насоса в ПС функциональный бислой эндотелий: гладкомышечные клетки был не первым. Со времен У. Гарвея (1627) и длительное время мы

будем говорить «сердечно-сосудистая система». Однако, как только мы приступаем к обсуждению регуляции кровообращения, необходимо помнить, что на ступенях филогенеза миллионами лет формировалась сосудисто-сердечная система. И первым её вариантом, который оставил *in vivo* морфологические доказательства и функциональные особенности, стал, мы полагаем, функциональный бислой эндотелий: перicyты. И только миллионы лет позже сформировались расположенные рядом же, в дистальном отделе артериального русла, но функционально иные перистальтические насосы на основе ГМК [21].

Анатомия структур артериол: эндотелий, подоциты, ГМК и дистальный отдел микроциркуляции in vivo. В месте ветвления артериолы на капилляры, часть из них окружены клетками, которые образуют прекапиллярные сфинктеры. Вследствие изменения тонуса функциональных сфинктеров *in vivo* в обменных капиллярах происходит регуляция локального кровотока. Между мышечными клетками имеются эластические волокна. Обменные капилляры – элементы микроциркуляторного русла; они, реализуя биологическую реакцию транцитоза (пиноцитоза) через цитоплазму эндотелия, осуществляют диффузию газов, обмен субстратов и катаболитов между внутрисосудистым, локальным и единым пулом межклеточной среды *in vivo*. Плотность сети капилляров в тканях различна; чем интенсивнее обмен веществ и функция органа, тем более плотная сеть капилляров.

В органах и тканях большинство капилляров *in vivo* постоянно не функционируют. За счёт постоянной функции сфинктеров, полный объём дистального отдела артериального русла, который равен около 20 л, уменьшается до физиологичного объёма, который заполняют всего-то 6–7 л крови. Количество открытых капилляров увеличивается при активации функции; наиболее эффективно это происходит при реализации биологической функции локомоции, движения при реципрокном сокращении скелетных миоцитов.

Капиллярные сети образуются и между одноименными сосудами; сети, образованные только венулами, формируют в печени портальную систему, венозные капиллярные сети в аденогипофизе, артериальные капиллярные сети в почечных клубочках. Капилляры – наиболее узкие кровеносные сосуды; диаметр их 7–8 мкм; в зависимости от функционального состояния и специфичности органа диаметр их может быть разным. Стенка кровеносных капилляров состоит из нескольких структурных элементов; внутреннюю выстилку сосудов формирует монослой эндотелия; располагается он на базальной мембране в тесном контакте с перicyтами [Makita].

Если внимательно рассмотреть морфологию клеток эндотелия и перicyтов (рис. 2), можно видеть много общего. Перicyт (греч. *περι* – вокруг и *κύτος* – клетка), клетка Руже, клетки РСТ с множеством отростков. Перicyты локализованы в стенке прекапиллярных артериол мышечного типа, в том числе и в стенке капилляров; предшественниками перicyтов являются клетки адвентиции; первым их описал

Ш. Руже в 1874 г. Перициты реализуют функцию и в структуре гематоэнцефалического барьера [22]. В цитоплазме перициты имеют сократительные волокна; одновременно они реализуют и биологические свойства оседлых макрофагов. Последние призваны реализовать биологическую функцию эндозоологии, поддержания «чистоты» межклеточной среды *in vivo*. И до сих пор биологическая роль перицитов остаётся неясной. Перицит считают малодифференцированной клеткой, которая задействована в структуре сосудов и в регуляции кровотока; при дифференцировании перицит может стать фибробластом, макрофагом [23]. В цитоплазме перициты имеют миофибриллярные элементы, используя которые, они, вероятно, регулируют параметры кровообращения в дистальном отделе артериального русла.

Перициты – удлиненные клетки со многими отростками; все они расположены поперек (перпендикулярно) оси капилляра. Перициты регулируют функцию обменных капилляров в тканях и в организме. Перициты регулируют: а) ёмкость обменных капилляров и гидродинамическое давление в дистальном отделе артериального русла; б) в цитоплазме они содержат волокна актина и миозина; в) регулируют они кровоток в обменных капиллярах и в прекапиллярных артериолах мышечного типа; г) объём дистального отдела артериального русла и д) величину периферического сопротивления кровотоку. Это позволяет охарактеризовать функцию тандема эндотелий : перициты как сократительную.

Перициты исполняют одновременно и функцию оседлых макрофагов; в цитоплазме они имеют много лизосом для реализации биологической функции эндозоологии. В культуре тканей перициты реализуют биологическую функцию фагоцитоза, презентации антигенов. Это один из ключевых процессов, в ходе которого компоненты системы врождённого иммунитета (оседлые макрофаги, дендритные клетки) стимулируют иммунный ответ системы приобретённого иммунитета путём представления (презентации) захваченного антигена Т-лимфоцитам. Способностью презентации антигена и активации реакций приобретённого иммунитета обладает *in vivo* многие клетки РСТ. Кроме того, функционируют специализированные клетки иммунной системы, для которых презентация антигена является одной из основных функций: макрофаги, В-лимфоциты и дендритные клетки. Они экспрессируют синтез специфичных рецепторов, которые активируют функцию Т-лимфоцитов [24].

Перициты синтезируют вазоактивные вещества, которые регулируют ангиогенез *de novo*. Перициты структурно связаны с монослоем эндотелия 3 типами контактов: а) щелевые контакты; б) фокальные адгезивные контакты и в) инвагинаты мембраны клеток. Щелевые контакты прямо связывают цитоплазму 2 клеток, они проницаемы для ионов и небольших молекул. С помощью фокальных адгезивных контактов осуществляется прочная связь 2 клеток. Инвагинации участков мембраны одной клетки в другую обеспечивают как механическое связывание, так и межклеточный обмен

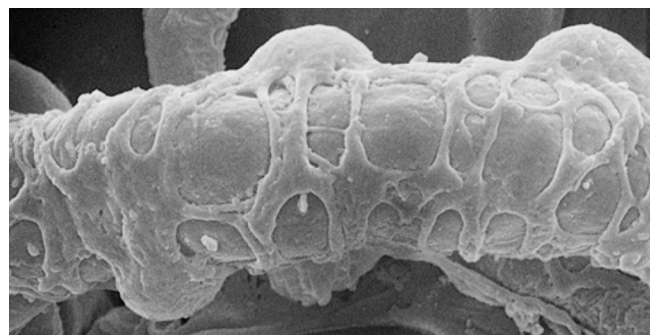


Рис. 3. Вероятная роль перицитов в формировании наиболее ранней волны перистальтики в паракринно регулируемых сообществах клеток.

субстратами и гуморальными медиаторами.

Благодаря тесным контактам клетки опосредованно влияют на митотическую активность, экспрессию генов и, соответственно, фенотип друг друга. Каждая вторая–четвертая клетка эндотелия контактирует с перицитом. Перициты чаще располагаются в местах контакта эндотелиальных клеток; перициты локализованы во всех прекапиллярных артериолах *in vivo*. В филогенетически же поздних обменных капиллярах скелетной мускулатуры, отношение перициты : эндотелиоциты составляет лишь 1 : 100. Перициты имеют вытянутую форму, длина их близка к 200 мкм, толщина – 0,5 мкм. Их многочисленные отростки циркуляторно охватывают сосуд [25].

В культуре тканей перициты реализуют биологическую реакцию фагоцитоза и презентацию антигенов. Благодаря сходству с оседлыми макрофагами, перициты образуют вторую линию защиты *in vivo* от токсичных молекул, которые могут преодолеть барьер эндотелия. Ранние в филогенезе перициты – составная часть врожденной иммунной системы *in vivo*. Перициты ассоциированы также с изменениями монослоя эндотелия, делением клеток, с формированием системы сосудов (ангиогенез), а также с распространением *in vivo* биологической реакции апоптоза.

Перициты обладают пластичностью и могут превращаться в ГМК, фибробласты и клетки мезенхимы. Такая универсальность благоприятствует тому, что перициты регулируют формирование кровеносных сосудов *in vivo* [26, 27]. Перициты могут также защищать клетки путём активации биологической реакции апоптоза в ответ на действия экзогенных, цитотоксичных веществ. *In vivo* показано, если культура ткани содержит все клетки дистального отдела артериального русла и гуморальные медиаторы, за исключением перицитов, клетки эндотелия будут подвержены апоптозу. Перициты инициируют выживание клеток эндотелия, поскольку они секретируют белок, который обеспечивает экспрессию фактора роста эндотелия, подавляющего апоптоз. При афизиологических процессах (воспаление, репарация по типу фиброза) перициты активируют синтез факторов роста эндотелия [28].

Шок впервые описан еще Гиппократом. В конце XIX в. предложены варианты патогенеза шока: а)



Рис. 4. Перициты в регуляции микроциркуляции в сократительных артериолах мышечного типа и в обменных капиллярах; отсутствие сокращения перицитов вверх и при сокращении (внизу).

остро формируемая атония сфинктеров артериол мышечного типа; б) нарушение функции вазомоторного центра продолговатого мозга и компенсаторного повышения АД в проксимальном отделе артериального русла; в) активация перицитов, которые в условиях экзогенной токсемии (анафилактического шока) реализуют биологическую реакцию приобретенного иммунитета, одновременно понижая функцию сокращающей; г) относительное уменьшение объема циркулирующей крови при быстрым увеличении ёмкости дистального отдела артериального русла и е) стаз крови в обменных капиллярах, увеличение их проницаемости и выход части межклеточной среды из локального внутрисосудистого (циркуляторного пула).

Становление в филогенезе функции перицитов и гладкомышечных клеток. Специфичная функция перицитов, как сфинктеров прекапиллярных артериол мышечного типа, основана на косвенных доказательствах. В экспериментах *in vivo* отмечено изменение объема русла обменных (объёмных) капилляров, которое инициируют перициты при действии вазоактивных препаратов и нейропротекторов. Хотя эти наблюдения действительно могут быть результатом сокращения перицитов, о роли клеток в регуляции кровотока имеется много несоответствий. Во-первых, убедительных доказательств контроля кровотока, который реализуют перициты *in vivo*, не приведено. Во-вторых, в то время как идентифицировать даже нативные перициты трудно, в гистологически фиксированных образцах доказать идентичность их много сложнее. Да и в нативной ткани *in vivo* не столь просто различить перициты [29].

Способны ли отростки перицитов развить усилие, достаточное для спазмирования (остановки кровото-

ка) в прекапиллярных артериолах мышечного типа? Возможно, функция перицитов и гладкомышечных клеток (ГМК) реализована совместно, поскольку в филогенезе ГМК более ранние. Выяснение сократительной функции перицитов в регуляции кровотока, микроциркуляции в дистальном отделе артериального русла в физиологических, афизиологических условиях еще продолжается. Уже признано, что перициты относят к тем же клеткам, что и ГМК, но пока не найдено единого молекулярного маркера, который можно было бы использовать для специфичного дифференцирования перицитов и ГМК и отличия их от иных клеток мезенхимы [30].

Мы полагаем, для понимания функционального различия перицитов и ГМК в регуляции кровообращения в дистальном отделе артериального русла, в организации процесса микроциркуляции важно проследить (представить) функцию их на ступенях филогенеза, принимая во внимание следующее. Становление микроциркуляции произошло в условиях незамкнутой системы кровообращения; ещё длительное время не было сердца – центрального насоса; сокращались только множество первичных перистальтических насосов в ПС, многие артериолы мышечного типа, «периферические сердца». Регулировать поток межклеточной среды в этих условиях реально сложнее, чем при замкнутой системе кровообращения [31]. В порядке формирования структуры первичного перистальтического насоса в ПС первыми задействованы клетки мезенхимы – монослой эндотелия, вторыми, мы полагаем, стали перициты, существенно более поздними в филогенезе являются ГМК [32].

Анатомически действие перицитов и ГМК не может быть одинаковым: а) функционально значимые отростки перицитов располагаются в первичных перистальтических насосах, в артериолах мышечного типа перпендикулярно потоку межклеточной среды (крови); б) в первичных перистальтических насосах, в артериолах мышечного типа ГМК расположены параллельно потоку среды; в) мышечные волокна перицитов, расположенных поверх монослоя эндотелия, сокращаются циркуляторно, пережимая (спазмируя) первичный перистальтический насос, артериолу мышечного типа наподобие сфинктера; г) ГМК сокращаются по спирали; они регулируют (уменьшают, увеличивают) поток межклеточной среды, позже крови, не приостанавливая его; д) ГМК реализуют и биологическую реакцию сдвига на эндотелии в ответ на ударную волну сокращения левого желудочка; остановить поток крови ГМК не в состоянии; е) перициты исполняют роль сфинктеров, реализуя сократительную функцию; они непрерывно перераспределяют микроциркуляцию крови в дистальном отделе артериального русла между тканями с разной активностью соматических функций в тканях и органах *in vivo* и особенно биологической функции локомции, которую реализуют поперечнополосатые миоциты в ПС, в тканях и органах *in vivo* [33].

Мы полагаем, что рядом расположенные перициты, сокращаясь наподобие клавиш у рояля при проигрывании гаммы (рис. 3), сформировали и первую

волну перистальтики в насосе при перфузии межклеточной средой еще клеток в ПС клеток за миллионы лет до формирования первых кровеносных сосудов.

Позже в филогенезе, в условиях замкнутой системы кровообращения, перициты сформировали механизмы, которые на основе величины периферического сопротивления кровотоку динамично, постоянно распознавали *in vivo* оптимальные направления перераспределения объема крови, который явно недостаточен для заполнения (перфузии) всего внутрисосудистого русла, суммарно артериального и венозного его отделов. При этом объем крови для перфузии постоянно в несколько раз меньше объема внутрисосудистого русла, которое требуется ежеминутно заполнять кровью.

Для заполнения русла всех сосудов *in vivo* объем которого приближается к 20 л, физиологично достаточным оказывается всего-то 5–7 л крови. Подобное функциональное действие без участия перицитов (циркуляторных сфинктеров) совершено быть не может. Выпадение сократительной функции перицитов, атония их в условиях анафилактической реакции на повторное внедрение *in vivo* экзогенного антигена, когда перициты не реализуют функцию сфинктеров артериол мышечного типа, а функционируют сродни оседлым макрофагам, заканчивается порой формированием в полной мере невосполнимым, некомпенсируемым гиповолемическим, анафилактическим шоком [34].

Возможно, желание осуществить перфузию как можно большего числа клеток *in vivo* как можно меньшим объемом крови «стояло на повестке дня» с ранних ступеней филогенеза. Для этого и были сформированы перициты. Не исключено и то, что физиологичная, сократительная функция перицитов, изменяя величину периферического сопротивления кровотоку, формирует *in vivo* направления к тем тканям и органам, к которым кровотоки в дистальном отделе артериального русла с активированной функцией необходимо усилить. Происходить это может только за счёт перераспределения потоков крови при условии, что объем крови в внутрисосудистом пуле во всех физиологично изменчивых условиях остается постоянным.

Изменяя величину периферического сопротивления кровотоку, перициты определяют направления перераспределения потоков крови *in vivo*. Можно полагать, что перициты определяют такие параметры микроциркуляции, как объем сосудистого русла, объем циркулирующей крови, имея в виду: а) депонирование и секвестрирование крови; б) общее периферическое сопротивление кровотоку и в) объем активно перфузируемого сосудистого русла. В условиях покоя, вне реализации биологической функции локомоции, основные параметры кровообращения определены (регулированы) условиями микроциркуляции. Этот определенно: а) функцией биологической реакции эндотелий зависимой вазодилатации (эндотелий и ГМК) в реализации биологической реакции метаболизм ↔ микроциркуляция и б) активностью перицитов в определении направлений, по которым

микроциркуляторное кровообращение необходимо (в зависимости от функции) физиологично активировать, а где его можно оптимально понизить; это не означает, что остановить (рис. 4).

Вне физической активности сокращение левого желудочка доводит ударный объем крови до артериол мышечного типа в дистальном отделе артериального русла. Далее они сами регулируют параметры микроциркуляции по определенным направлениям активированного или нарушенного метаболизма. Биологическая реакция эндотелий зависимой вазодилатации регулирует скоростные параметры микроциркуляции, её усиление, биологическую реакцию сдвига на поверхности эндотелия. Эндотелий координирует ударный объем крови и функцию гладкомышечных артериол, реакцию эндотелий зависимой вазодилатации для оптимальной перфузии всего дистального отдела артериального русла, включая и обменные капилляры.

Биологическая реакция метаболизм ↔ микроциркуляция, метаболическая артериальная гипертензия и поражение органов-мишеней. Этиологическая основа метаболической артериальной гипертензии – функциональное несоответствие локального нарушения биологической функции $M \leftrightarrow M$ на уровне ПС клеток, органов, тканей и системной биологической реакции компенсации с уровня организма, из сосудодвигательного центра головного мозга. Реализована эта компенсация в форме эфферентной, симпатической иннервации на сердце как центральный насос с повышением АД в проксимальном отделе артериального русла.

Повышение АД в проксимальном отделе артерий эластического типа происходит в ситуациях, когда нарушения метаболизма не дают возможности локально компенсировать нарушение микроциркуляции при действии локальной биологической реакции эндотелий зависимой вазодилатации. Системная же компенсация локального нарушения биологической реакции $M \leftrightarrow M$ происходит путем повышения АД в проксимальном отделе артериального русла. Компенсация с уровня организма реально компенсирует *in vivo* где-то локальное нарушение биологической реакции $M \leftrightarrow M$.

Напомним, что все органы, которые мы именуем органами-мишенями, имеют локальные пулы межклеточной среды: а) пул первичной мочи в нефронах почек; б) пул спинномозговой жидкости в желудочках мозга; в) аэрогемический пул в альвеолах легких. Органы мишени сами регулируют и все параметры гидродинамики этих локальных пулов. Функцию 3 локальных пулов гидродинамики, включая еще пул амниотической жидкости в матке и пул внутренней среды глазного яблока, одновременно, выраженно, сочетанно нарушает системное, компенсаторное повышение АД в проксимальном отделе артерий. Подробно становление эндогенных афизиологичных процессов описано нами ранее [35, 36].

Постепенно при действии системной компенсации путем повышения АД в проксимальном отделе артериального русла формируется поражение органов-мишеней. Все они до нарушения где-то локально биологической реакции $M \leftrightarrow M$ и компенсаторного,

системного повышения АД, функционировали физиологично. Нарушение функции всех органов-мишеней при метаболической АГ является вторичными; это результат афизиологичной, системной компенсации локальных нарушений биологической реакции метаболизм ↔ микроциркуляция в ПС клеток. Сколь часто локальные нарушения биологической реакции М ↔ М на втором уровне относительного биологического совершенства (в ПС клеток и органах), системно компенсированы с уровня организма, столь высока и частота распространения в популяции метаболической АГ. Однако компенсация путем активации биологической реакции АД с уровня организма может быть только системной. Иного в филогенезе не сформировано.

Причиной столь частого развития метаболической АГ в популяции, нарушения биологической реакции М ↔ М является то, что биологическая реакция АД, согласно филогенетической теории общей патологии, задействована в компенсации *in vivo* нарушения 4 биологических функций: а) гомеостаза; б) трофологии; в) эндэкологии и г) адаптации. Можно обоснованно полагать, что при компенсации *in vivo* разных функций в ответ на повышение периферического сопротивления кровотоку повышение гидродинамического давления в дистальном отделе артериального русла происходит при реализации разных механизмов. Во всех ситуациях, когда возможностей локальных систем регуляции (компенсации) биологической реакции М ↔ М и сократительной функции перicyтов оказывается недостаточно, логично, но абиологично следует системная компенсация с уровня организма, из проксимального отдела, ведомая эфферентной симпатической иннервацией из сосудодвигательного центра продолговатого мозга.

Метод лазерной доплеровской флуорометрии с амплитудно-частотным анализом осцилляций артериол мышечного типа дает возможность оценить варианты формирования кровотока, которые инициируют изменения величины периферического сопротивления кровотоку. Выделяют 3 варианта тонуса артериол мышечного типа: эндотелиальный, нейрогенный и миогенный [37]. Определено это как на основании увеличения потенциала дилатации артериол мышечного типа, так и изменением состояния сократительных клеток, возможно перicyтов, которые также активно формируют величину периферического сопротивления кровотоку [38, 39]. Ясно одно: диапазоны частот осцилляций (эндотелиальный, нейрогенный, миогенный и веноулярный) и различие амплитуды могут быть обусловлены разными по функции клетками.

В роли сократительных сфинктеров перicyтов, гладкомышечных клеток, монослоя эндотелия, прекапиллярных артериол мышечного типа, обменных, объёмных капилляров, в физиологичном отношении объёма пула крови и объёма дистального отдела артериального русла *in vivo* предстоит еще разобраться. В то же время, вероятно, что: не существует первичной АГ; компенсаторная биологическая реакция АД всегда вторична, она выявляет наличие у пациентов симптоматической или метаболической АГ; повышение АД в проксимальном

отделе артериального русла является компенсаторной реакцией в ответ на нарушения метаболизма, микроциркуляции, биологической реакции метаболизм ↔ микроциркуляция; формируются они локально в дистальном отделе артериального русла (артериолы мышечного типа, функциональные сфинктеры, перicyты); метаболическая АГ – патология раннего в филогенезе дистального отдела артериального русла, функции монослоя эндотелия, гладкомышечных клеток, перicyтов; полагаем, формирование «острой» гиповолемии при шоке является состоянием атонии сфинктеров (pericyтов) в прекапиллярных артериолах мышечного типа с формированием афизиологичного по объёму дистального отдела артериального русла; физиологичного объёма крови становится явно недостаточно для заполнения русла; когда локальное нарушение биологической реакции метаболизм ↔ микроциркуляция локально не компенсирует функция эндотелий зависимой вазодилатации, с уровня организма, с сосудодвигательного центра, следует эфферентная иннервация на сердце, системное повышение АД в проксимальном и далее в дистальном отделе артериального русла; системное повышение АД нарушает функцию органов мишеней – почек, головного мозга, легких; каждый из них регулирует параметры гидродинамики в локальном пуле межклеточной среды; функция их оказывается нарушенной и органы – мишени в свою очередь, формируют реакцию компенсации; метаболическая АГ – результат несогласованной системной компенсации локальных нарушений 4 биологических функций – гомеостаза, эндэкологии, трофологии и адаптации; происходит это на уровне паракринно регулируемых сообществ функционально разных клеток – структурных единиц каждого из органов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–11, 15, 16, 19–21, 23–25, 28–30, 32, 33, 38, 39 см. REFERENCES)

1. Титов В.Н. *Клиническая биохимия. Курс лекций*. М. ИНФРА-М. 2017.
2. Шустер Х.П., Шенборн Х., Лауэр Х. *Шок. Возникновение. Распознавание. Контроль. Лечение*. М.: «Медицина»; 1981.
3. Туев А.В., Хлынова О.В., Щекотов В.В. *Артериальная гипертензия и венозная система*. М.: Медицинская книга; 2004.
4. Федорович А.А., Гориева Ш.Б., Рогоза А.Н., Чихладзе Н.М. Функциональное состояние артериальных и веноулярных микрососудов кожи у пациентов с гипертонической болезнью. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2014; 3(51): 45 – 60.
5. Титов В.Н. Теория «периферического сердца» и становление в филогенезе сердечно-сосудистой (сосудисто-сердечной) системы. *Вестник Санкт-Петербургского университета*. 2010; 11(2): 5 – 22.
6. Мелькумянц А.М., Балашов С.А. *Механочувствительность артериального эндотелия*. Тверь: ООО «Издательство «Триада». 2005.
7. Чехонин В.П., Баклашев В.П., Юсубалиева Г.М., Волгина Н.Е., Гурина О.И. Фундаментальные и прикладные аспекты изучения гематоэнцефалического барьера. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012; 8: 66 – 73.
8. Живень М.К., Захарова И.С., Шевченко А.И., Покушалов Е.А.,

- Закяин С.М. Гетерогенность клеток эндотелия. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2015; 19(4-2): 104 – 12.
27. Романов Ю.А. Структурно-функциональные особенности эндотелия человека в норме и при атеросклерозе. Дисс. ...канд.мед. наук. Москва; 2003.
31. Титов В.Н. Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез метаболических пандемий. Артериальная гипертензия. М.: ИНФРА-М; 2014.
34. Шойхет Я.Н., Момот А.П. О роли и взаимосвязи гемостатических и воспалительных реакций в формировании очагов гнойной деструкции органов и тканей. *Проблемы клинической медицины*. 2008; 16(4): 102 – 16.
35. Титов В.Н. Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез болезней цивилизации. Атеросклероз. М.: ИНФРА-М; 2014.
36. Титов В.Н. Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез метаболических пандемий. Сахарный диабет. М.: ИНФРА-М; 2014.
37. Федорович А.А., Соболева Г.Н. Состояние системы микроциркуляции у больных с артериальной гипертензией в сочетании с ишемической болезнью сердца и нарушениями когнитивных функций на терапии актовегином. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2015; 3(55): 40 – 51.
- the phylogeny of the cardiovascular (cardiovascular) system. *Vestnik Sankt-Petersburgskogo universiteta*. 2010; 11(2): 5 – 22. (in Russian)
18. Mel'kumyanz A.M., Balashov S.A. *Mechanosensitive arterial endothelium*. [Mehanochuvstvitel'nost' arterial'nogo endoteliya]. Tver': OOO «Izdatel'stvo «Triada»; 2005. (in Russian)
19. Rustenhoven J., Jansson D., Smyth L.C., Dragunow M. Brain pericytes as mediators of neuroinflammation. *Trends. Pharmacol. Sci.* 2017; 38(3): 291 – 304.
20. Gaxatte C., Faraj E., Lathuilliere O., Salleron J., Deramecourt V., Pardessus V. Alcohol and psychotropic drugs: risk factors for orthostatic hypotension in elderly fallers. *J. Hum. Hypertens.* 2017; 31(4): 299 – 304.
21. Schrimpf C., Duffield J.S. Mechanisms of fibrosis: the role of the pericyte. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2011; 20(3): 297 – 305.
22. Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yusubalieva G.M., Volgina N.E., Gurina O.I. Fundamental and applied aspects of studying the blood-brain barrier. *Vestnik Rosiyskoy akademii meditsinskih nauk*. 2012; 8: 66 – 73. (In Russian)
23. Gautam J., Zhang X., Yao Y. The role of pericytic laminin in blood brain barrier integrity maintenance. *Sci. Rep.* 2016; 6: 36450.
24. Kioc M., Kubiak J.Z., Li X.C., Ghobrial R.M. Pericytes, microvascular dysfunction, and chronic rejection. *Transplantation*. 2015; 99(4): 658 – 67.
25. Quimby S., Fern R. Novel morphological features of developing white matter pericytes and rapid scavenging of reactive oxygen species in the neighbouring endothelia. *J. Anat.* 2011; 219(1): 65 – 77.
26. Zhiven' M.K., Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Pokushalov E.A., Zakiyan S.M. Heterogeneity of endothelial cells. *Patologiya krovoobrasheniya i kardiokirurgiya*. 2015; 19(4-2): 104 – 12. (in Russian)
27. Romanov Yu.A. *Structural and functional features of human endothelium in norm and in atherosclerosis*. Diss. Moscow; 2003. (in Russian)
28. Lin S.L., Chang F.C., Schrimpf C., Chen Y.T., Wu C.F., Wu V.C. Targeting endothelium-pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis. *Am. J. Pathol.* 2011; 178(2): 911 – 23.
29. Guimaraes-Camboa N., Cattaneo P., Sun Y., Moore-Morris T., Gu Y., Dalton N.D. Pericytes of multiple organs do not behave as mesenchymal stem cells in vivo. *Cell Stem Cell*. 2017; 20(3): 345 – 59.
30. Cano E., Gebala V., Gerhardt H. Pericytes or mesenchymal stem cells: is that the question? *Cell. Stem. Cell*. 2017; 20(3): 296 – 7.
31. Titov V.N. *Phylogenetic theory of general pathology. Pathogenesis the pathogenesis of metabolic pandemics. Hypertension*. [Filogeneticheskaya teoriya obschey patologii. Patogenez metabolicheskikh pandemiy. Arterial'naya gipertoniya] Moscow: INFRA-M; 2014. (in Russian)
32. Birbrair A., Zhang T., Wang Z.M., Messi M.L., Enikolopov GN, Mintz A., Delbono O. Role of pericytes in skeletal muscle regeneration and fat accumulation. *Stem. Cells. Dev.* 2013; 22(16): 2298 – 2314.
33. Chang F.C., Chou Y.H., Chen Y.T., Lin S.L. Novel insights into pericyte-myofibroblast transition and therapeutic targets in renal fibrosis. *J. Formos. Med. Assoc.* 2012; 111(11): 589 – 98.
34. Shoyhet Ya.N., Momot A.P. On the role and interrelation of hemostatic and inflammatory reactions in the formation of foci of purulent destruction of organs and tissues. *Problemy klinicheskoy meditsiny*. 2008; 16(4): 102 – 16. (in Russian)
35. Titov V.N. *Phylogenetic theory of general pathology. The pathogenesis of the diseases of civilization. Atherosclerosis*. [Filogeneticheskaya teoriya obschey patologii. Patogenez bolezney zivilizatsii. Ateroskleroz]. Moscow: INFRA-M; 2014. (in Russian)
36. Titov V.N. *Phylogenetic theory of general pathology. The pathogenesis of metabolic pandemics. Diabetes*. [Filogeneticheskaya teoriya obschey patologii. Patogenez metabolicheskikh pandemiy. Saharniy diabet] Moscow: INFRA-M; 2014. (in Russian)
37. Fedorovich A.A., Soboлева G.N. The state of the microcirculation system in patients with arterial hypertension in combination with coronary heart disease and cognitive impairment in actovegin therapy. *Regionarnoye krovoobrasheniye i mikrotsirkulyatsiya*. 2015; 3(55): 40 – 51. (in Russian)
38. Chen W.C., Bailly J.E., Corselli M., Diaz M.E., Sun B, Xiang G. Human myocardial pericytes: multipotent mesodermal precursors exhibiting cardiac specificity. *Stem. Cells*. 2015; 33(2): 557 – 73.
39. Yamamizu K., Iwasaki M., Takakubo H., Sakamoto T. Ikuno T. Miyoshi M. Kondo T. In vitro modeling of blood-brain barrier with human iPSC-derived endothelial cells, pericytes, neurons, and astrocytes via notch signaling. *Stem. Cell. Reports*. 2017; 8(3): 634 – 47.

Поступила 07.04.17

Принята к печати 15.04.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616-056.257-06:616.1]-092-074

Бородкина Д.А.^{1,3}, Груздева О.В.^{1,2}, Белик Е.В.¹, Паличева Е.И.^{1,2}, Кузьмина А.А.¹

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕТИНОЛСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРА РИСКА КАРДИОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», 650002, Кемерово, Российская Федерация;

²ГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 650029, Кемерово, Российская Федерация;

³ГБУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница» им. С.В. Беляева, «Областной диабетологический центр», 650066, Кемерово, Российская Федерация

Жировая ткань является эндокринным органом, секретирующим биологически активные факторы, называемые адипокинами, которые обладают системными и локальными свойствами. Адипокины играют важную роль в развитии осложнений, обусловленных ожирением. В настоящее время ретинолсвязывающий белок 4 (RBP4), один из недавно идентифицированных адипокинов, рассматривают в качестве связующего звена между ожирением и его осложнениями. Адипокин участвует в развитии резистентности к инсулину и коррелирует с кардиометаболическими маркерами при хронических воспалительных заболеваниях, включая сахарный диабет 2-го типа, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ). Выказано мнение, что воспаление, продуцируемое RBP4, индуцирует резистентность к инсулину и ССЗ. RBP4, по-видимому, является адипокином, который не только индуцирует резистентность к инсулину, но также участвует в патогенезе других метаболических осложнений ожирения, что подтверждено тесной связью RBP4 с атерогенными липопротеинами, атеросклеротическим поражением сосудов и ССЗ. Однако важным ограничением некоторых исследований, связанных с RBP4, является то, что они включают пациентов, которые получали лекарственную терапию (сахароснижающие и гиполлипидемические средства) или имели почечную и печёночную недостаточность. Данные факторы влияют на концентрацию RBP4 в крови и могут исказить результаты. Несмотря на это, выявленная потенциальная метаболическая роль RBP4 требует дальнейшего изучения. Поэтому необходимы дальнейшие тщательно спланированные исследования, в которых основное внимание будет уделяться тому, чтобы установить, является ли RBP4 молекулярным участником метаболических изменений или всего лишь динамически меняющимся «свидетелем». В этом обзоре мы суммируем современные знания о роли RBP4 при ожирении, в развитии дислипидемии, инсулинорезистентности и ССЗ. Целью работы является обобщение данных, полученных при исследовании воспалительных и иммунных эффектов RBP4, особенно в случае ССЗ, а также определение перспективы использования ретинолсвязывающего белка как потенциального биомаркера кардиоваскулярного риска.

Ключевые слова: ретинолсвязывающий белок; сердечно-сосудистые заболевания; ожирение; инсулинорезистентность.

Для цитирования: Бородкина Д.А., Груздева О.В., Белик Е.В., Паличева Е.И., Кузьмина А.А. Перспективы использования ретинол-связывающего белка в качестве биомаркера риска кардиоваскулярной патологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (2): 79-84. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-79-84>

Borodkina D.A.^{1,3}, Gruzdeva O.V.^{1,2}, Belik E.V.¹, Palicheva E.I.^{1,2}, Kuzmina A.A.¹

THE PERSPECTIVES OF APPLICATION OF RETINOL-BINDING PROTEIN AS A BIOMARKER OF RISK OF CARDIOVASCULAR PATHOLOGY

¹The Federal State Budget Scientific Institution "The research institute of complex problems of cardio-vascular diseases", 650002 Kemerovo, Russia

²The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Kemerovo State Medical University" of Minzdrav of Russia, 650029, Kemerovo, Russia

³The State Autonomous Health Care Institution of Kemerovo Oblast "The S.V. Beliaev Kemerovo oblast clinical hospital", "The Oblast Diabetology Center", 650066, Kemerovo, Russia

The fatty tissue is an endocrine organ secreting biologically active factors called adipokines that have systemic and local features. The adipokines play an important role in development of complications caused by obesity. nowadays, retinol-binding protein 4 (RBP4), one of adipokines identified recently, is considered as a connecting link between obesity and its complications. Adipokine participates in development of resistance to insulin and correlated with cardio-metabolic markers at chronic inflammatory diseases, including diabetes mellitus type II, metabolic syndrome and cardio-vascular diseases. It is considered that inflammation, produced by RBP4, induces resistance to insulin and cardio-vascular diseases. It seems that RBP4 is an adipokine that both induces resistance to insulin and participates in pathogenesis of other metabolic complications of obesity. This is confirmed by a tight relationship between RBP4 and atherogenic lipoproteins, atherosclerotic affection of vessels and cardio-vascular diseases. However, an important restriction in certain studies related to RBP4 is that they included patients who received medicinal therapy (sugar lowering and hypo-lipidemic pharmaceuticals) or had renal and hepatic insufficiency. The mentioned factors impact concentration of RBP4 in blood and hence can distort the results. In spite of that, the established potential metabolic role of RBP4 requires a further investigation. Besides further carefully planned studies are required focusing on establishing is RBP4 a molecular participator of molecular alterations or it is only a dynamically volatile "witness". The present review summarizes actual knowledge concerning the role of RBP4 under obesity, in development of dyslipidemia, insulin resistance and cardio-vascular diseases. The purpose of the study is to summarize data of studying of inflammatory and immune effects of

Для корреспонденции: Бородкина Дарья Андреевна, канд. мед. наук, врач-эндокринолог Областного центра диабетологии ; e-mail: alpheia@mail.ru

RBP4 especially in case of cardio-vascular diseases and also establishment of perspective of applying retinol-binding protein as a potential biomarker of cardiovascular risk.

Key words: *retinol-binding protein; cardio-vascular diseases; obesity; insulin resistance.*

For citation: Borodkina D.A., Gruzdeva O.V., Belik E.V., Palicheva E.I., Kuzmina A.A. The perspectives of application of retinol-binding protein as a biomarker of risk of cardiovascular pathology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(2): 79-84. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-79-84>

For correspondence: Borodkina D.A., candidate of medical sciences, endocrinologist of the State Autonomous Health Care Institution of Kemerovo Oblast "The S.V. Beliaev Kemerovo oblast clinical hospital", "The Oblast Diabetology Center", e-mail: alphea@mail.ru

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

Acknowledgment. *The study was supported by the Russian Scientific Foundation grant № 17-75-20026.*

Received 10.09.2017
Accepted 01.11.2017

Жировая ткань является эндокринным органом, секретирующим биологически активные факторы, называемые адипокинами, которые обладают системными и локальными свойствами [1]. Адипокины играют важную роль в развитии осложнений, обусловленных ожирением. Так, изменение концентраций адипокинов на фоне воспаления жировой ткани потенцирует формирование резистентности к инсулину (ИР), развитие сахарного диабета 2-го типа (СД2) и метаболического синдрома (МС), а также связанных с ними рисков сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [2, 3]. Перечень продуцируемых в жировой ткани адипокинов весьма внушителен и, несомненно, будет дополняться. Основные свойства и функции некоторых адипокинов, таких как лептин и адипонектин, хорошо известны, другие только предстоит изучить.

Ретинолсвязывающий белок 4 (RBP4) является основным транспортным белком для ретинола (витамина А) в крови. Помимо транспортной функции RBP4, как и все адипокины, ассоциирован с метаболическими нарушениями на фоне ожирения. У мышей с ожирением и МС высокий уровень RBP4 связан с развитием ИР и СД2. Однако данные, полученные в исследованиях с участием людей, противоречивы и не позволяют сделать четкие выводы о роли RBP4 в развитии ИР. Так, концентрация RBP4 повышена в сыворотке и моче у людей с ожирением, МС и СД2, но значимые корреляции и причинно-следственные связи между этими факторами до конца не установлены [4]. Накопленные данные подтверждают наличие связи между уровнем циркулирующего RBP4 и традиционными факторами риска ССЗ (дислипидемией, гипертензией, альбуминурией), главным образом вследствие нарушения метаболизма глюкозы и липидов, а также дисфункции жировой ткани [5].

Одна из важнейших задач современной кардиологии – выявление пациентов с риском развития острого ишемического события. Хотя было доказано участие RBP4 в развитии субклинического атеросклероза [6], однако его прогностическая значимость в оценке риска прогрессирования атеросклеротического поражения всё еще не ясна. В этом обзоре мы суммируем современные знания о роли RBP4 при ожирении, в развитии дислипидемии, ИР и ССЗ. Цель работы – обобщить данные, полученные при исследовании воспалительных и иммунных эффектов RBP4, осо-

бенно в случае ССЗ, а также определить перспективы использования ретинолсвязывающего белка как потенциального биомаркера кардиоваскулярного риска.

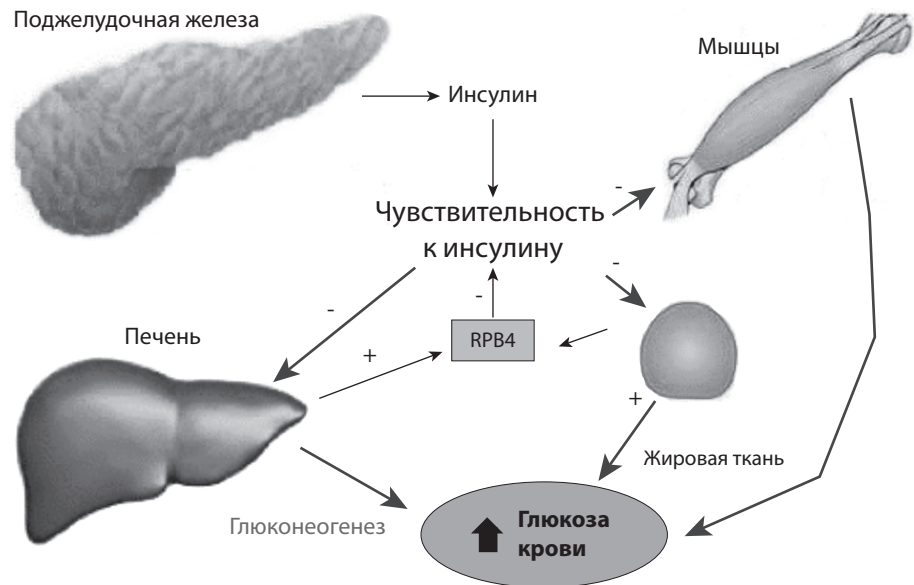
Общая характеристика RBP4. RBP4 является низкомолекулярным липокалином, относящимся к семейству адипокинов и транспортирующим три физиологически важных ретиноида (ретинол, ретиналь и ретиновую кислоту) [7]. Это небольшой транспортный белок с мол. массой 21 кДа, содержащий 201 аминокислоту. RBP4 имеет характерную бета-складчатую структуру, состоящую из 8 петель [8]. RBP4 образует комплекс с преальбумином в крови, но теряет свою аффинность к нему после доставки витамина А в клетки-мишени. Ген RBP4 расположен на хромосоме 10 (10q23–q24) вблизи области, которая ассоциирована с уровнем гликемии у некоторых этнических групп [9, 10]. Нормальное содержание RBP4 в сыворотке крови составляет 20,0–75,0 мкг/мл. Самый высокий уровень экспрессии RBP4 в гепатоцитах, так, около 40% всего RBP4 синтезируется в печени [11]. Хотя гепатоциты рассматриваются как основной источник циркулирующего RBP4 в нормальных условиях, жировая ткань занимает второе место по интенсивности секреции, причём синтез преобладает преимущественно в зрелых, нагруженных липидами адипоцитах [12]. Также способностью к выработке RBP4 обладают почки, лёгкие, сердце, скелетные мышцы, селезёнка и тестикулы [13]. RBP4 является не только транспортным белком для ретинола, но также служит для него депо, помогая организму адаптироваться к колебаниям поступления ретинола с пищей. Он переносит ретинол из печени в периферические ткани. Плазменные уровни RBP4 положительно коррелируют с уровнями витамина А. Поэтому ретиноловый статус субъекта может влиять на циркулирующие уровни RBP4. В клинических исследованиях отношение RBP4 к ретинолу используют для оценки ретинолового статуса обследуемого [14]. До 2001 г. единственной известной функцией RBP4 был транспорт ретинола, однако в ряде исследований продемонстрировано, что RBP4 является гормоном, который активируется при ИР, усугубляет её течение [15]. С тех пор RBP4 считается адипокином, который сигнализирует об изменении в массе и энергетическом статусе жировой ткани. Более того, RBP₄ был недавно предложен как новый кардио-метаболический фактор риска [16].

RBP4 в качестве адипокина.

Возможная роль RBP4 при ожирении и резистентности к инсулину была впервые продемонстрирована группой AbelED. Они обнаружили, что у мышей с адипозспецифическим снижением активности GLUT4 развивается резистентность к инсулину в мышцах и печени. Мыши с адипозспецифической сверхэкспрессией GLUT4, напротив, показывали высокую способность к утилизации глюкозы [17]. С использованием ДНК-матриц было показано, что экспрессия RBP4 увеличивается в жировой ткани тучных мышей с нокаутом инсулинзависимого транспортера глюкозы GLUT4. Изменения уровня RBP4 в сыворотке также коррелировали с изменениями уровня мРНК в жировой ткани. Сывороточные уровни RBP4 значительно увеличились в пяти дополнительных мышинных моделях с ожирением и резистентностью к инсулину [18]. Кроме того, трансгенная гиперэкспрессия или инъекции рекомбинантного RBP4 человека у нормальных мышей вызывают резистентность к инсулину. Увеличение сывороточного уровня RBP4 индуцирует экспрессию печёночного фермента глюконеогенеза фосфоенолпируваткарбоксикиназу и нарушает передачу сигналов инсулина в мышцах, в то время как мыши с гетерозиготным или гомозиготным нокаутом RBP4 имеют повышенную чувствительность к инсулину [19]. При использовании инсулинсенсбилизирующих лекарственных средств, PPAR-агонистов розиглитазона, чувствительность к инсулину нормализовалась у мышей с адипозспецифическим нокаутом GLUT4, а концентрация RBP4 снижалась в жировой ткани и сыворотке крови, но не в печени. Кроме того, фенретинид, синтетический ретиноид, увеличивает экскрецию RBP4, нормализует уровень RBP4 в сыворотке, улучшает резистентность к инсулину и вызывает нарушение толерантности к глюкозе у мышей с ожирением [20]. На основании этих исследований было высказано предположение, что RBP4 является адипоцитсинтезируемым фактором, который воздействует на мышцы и/или печень, ретинолзависимым или ретинолнезависимым образом, влияя на чувствительность к инсулину (см. рисунок).

Влияние ретинолсвязывающего белка как адипокина жировой ткани на чувствительность к инсулину.

Определение концентрации RBP4. Для измерения концентрации циркулирующего RBP4 большинство авторов в своих исследованиях использовали метод иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве альтернативы выступают белковый иммуноблот (вестерн-блоттинг) или нефелометрия. Высказывались предположения, что метод ИФА недостаточно



Влияние ретинолсвязывающего белка как адипокина жировой ткани на чувствительность к инсулину.

точен у пациентов с СД2, в то время как количественный белковый иммуноблот рассматривается в качестве наиболее надёжного метода для определения циркулирующего RBP4 [21]. Однако процедура количественного белкового иммуноблота слишком трудоёмкая и требует большого опыта, что делает нецелесообразным его использование для исследований большого количества образцов. Кроме того, в большинстве исследований не получено существенных различий между результатами ИФА и белкового иммуноблота [22], также метод ИФА намного проще и быстрее, чем иммуноблот. Поэтому в настоящее время метод ИФА представляется наиболее практичным и достаточно точным при измерении циркулирующего RBP4. Также до сих пор остаётся открытым вопрос, где лучше определять RBP4, – в плазме или сыворотке крови? Поскольку плазменные антикоагулянты могут давать ложные результаты, большинство авторов рекомендуют сыворотку [23]. Плазменные антикоагулянты (гепарин, ЭДТА, цитрат и хлорид лития) в пробирках изменяют абсолютное количество иммунореактивности RBP4. Таким образом, стеклянные вакуумные пробирки без добавок рассматриваются в качестве оптимального материала забора.

RBP4, ожирение и распределение жира в организме. Концентрация RBP4 в сыворотке положительно коррелирует с индексом массы тела (ИМТ) у лиц с ожирением, независимо от наличия сахарного диабета [24]. В дополнение к увеличению ИМТ и содержания общего жира в организме увеличение сывороточного уровня RBP4 связано с избыточным накоплением висцеральной жировой ткани [25]. Увеличение отношения окружности талии к окружности бедер ассоциируется с более высоким уровнем RBP4 и маркеров системного воспаления [26]. Более того, RBP4

экспрессируется преимущественно в висцеральном жировом депо, а не в подкожном [27]. Жировая ткань сальника является важным источником RBP4 у пациентов с тяжёлым ожирением [28]. Значительное снижение массы достигается за счёт диеты, физических упражнений или хирургического лечения ожирения, приводит к снижению уровня циркулирующего и/или RBP4 жировой ткани [29]. Изменения уровня RBP4 у нестрадающих диабетом во время потери массы достоверно коррелировали с количеством потери висцерального жира, но не были связаны с количеством потери общего жира или подкожного жира [30]. Снижение в сыворотке крови уровня RBP4 предсказывает повышение чувствительности к инсулину с большей специфичностью, чем лептин, адипонектин, интерлейкин-6 или С-реактивный белок [31].

Механизмы RBP4-индуцированной резистентности к инсулину. Механизм, с помощью которого RBP4 индуцирует резистентность к инсулину у мышей, был исследован Q. Yang и соавт. [14]. Ими было установлено, что RBP4 провоцирует снижение активности инсулинстимулированной фосфатидилинозитол-3-киназы [ПИ(3)к] в мышцах и в инсулинстимулированное фосфорилирование тирозина – субстрата рецептора инсулина-1 (IRS1), приводя к мышечной ИР. В том же исследовании показано, что связывание RBP4 с рецептором в печени индуцирует экспрессию печёночного глюконеогенного фермента фосфоинозитол-3-киназы, нарушает передачу сигналов инсулина в мышцах и уменьшает стимулированное инсулином поглощение глюкозы. На уровне периферических тканей RBP4 может вызывать нарушение тканевой чувствительности к инсулину непосредственно путём связывания с собственными рецепторами клеточной поверхности либо через рецепторы ретиноевой кислоты [32]. Недавно идентифицирован рецептор клеточной поверхности RBP4, стимулируемый гомологом гена 6-ретиноевой кислоты (STRA6), который угнетает экспрессию белка-переносчика глюкозы GLUT-4 и приводит к ИР [33]. Ещё один трансмембранный белок – SNPs, обладающий высоким сродством к RBP4 и являющийся главным медиатором внутриклеточного поглощения ретинола, был идентифицирован как ассоциированный с СД2 [34].

Взаимосвязь между RBP4 и риском развития атеросклероза. Несмотря на отсутствие в настоящее время точных данных о биохимических механизмах влияния RBP4 на липидный обмен, изменение его концентрации можно рассматривать как предиктор развития атеросклероза. В пользу этого предположения говорит наличие прямых корреляционных связей между концентрацией RBP4 и общим холестерином (ОХ), холестерином липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), триглицеридами (ТГ), аполипопротеином В (АпоВ), холестерином липопротеинов очень низкой плотности (ХС-ЛПОН) и обратной с липопротеинами высокой плотности (ХС-ЛПВП) [35, 36]. Следует отметить, что вышеупомянутые ассоциации были обнаружены, не только в условиях устойчивого метаболического состояния (т.е. в период обследо-

вания не было каких-либо существенных изменений в потреблении питательных веществ и массе тела). G. Christou и соавт. изучали взаимосвязь между изменениями концентрации циркулирующего RBP4 и параметров липидного обмена во время медицинских вмешательств, направленных на изменение липидного профиля [37]. В этом исследовании пациенты с гипертриглицеридемией на фоне ожирения были поделены две группы: 1-я соблюдала диету, 2-я получала фенофибраты в течение 3 мес. В ходе исследования обнаружено, что изменение плазменного уровня RBP4 положительно коррелировало с изменением концентрации ТГ, ЛПНП, ЛПОН, АпоВ и ОХ как у пациентов на диете, так и у получавших фенофибраты.

Хроническое воспаление сосудов является основным фактором развития атеросклероза [38]. Сосудистое воспаление начинается с секреции эндотелием молекул адгезии, включая молекулу адгезии клеток сосудистой клетки 1 (VCAM-1), молекулу межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) и молекулу адгезии эндотелиальных лейкоцитов 1 (Е-селектин), а также эндотелиальное производство растворимых провоспалительных факторов, включая моноцитарный хемоаттрактантный белок 1 (MCP-1) и интерлейкин -6 (IL-6). MCP-1 способствует миграции лейкоцитов к эндотелию [39]. Большинство исследований показало наличие положительной связи между RBP4 и окислительными маркерами стресса (8-изо-простагландина F2 (8-isoPGF2 α), 13-(S)-hydroxyoctadecadienoic кислоты и малонового альдегида) и отрицательной между RBP4 и антиоксидантным глутатионом [40, 41]. Как было показано K. Farjo и соавт., RBP4 способен индуцировать воспаление в капиллярных эндотелиальных клетках сетчатки человека и эндотелиальных клетках пупочной вены человека за счёт стимуляции экспрессии провоспалительных молекул, вовлечённых в рекрутинг лейкоцитов, включая VCAM-1, молекулы межклеточной адгезии 1 (ICAM-1), Е-селектин, MCP-1 и IL-6 [42]. Таким образом, RBP4 может играть роль в окислительном стрессе. Ряд клинических исследований продемонстрировал, что RBP4 может влиять на активность макрофагов эндотелия [43]. Провоспалительное воздействие RBP4 на макрофаги реализуется за счёт активации сигнальной линии 4 (toll-like receptor 4) и TL-N-концевой протеинкиназы (JNK). Так, повышение концентрации RBP4 усиливает поглощение холестерина макрофагами, опосредованного CD36 – поглотителем-рецептором, причём эти свойства RBP4 не зависят от ретинола и мембранного рецептора RBP4 STRA6, а происходят за счёт активации NADPH-оксидазы и NF- κ B. Важно отметить, что RBP4 (аро-RBP4), не содержащий ретинола, столь же активен, как RBP4, связанный с ретинолом (голо-RBP4). Исследования *in vitro* показали, что RBP4 играет важную роль в разрыве бляшек, увеличивая пролиферацию клеток гладких мышц сосудов и индукцию Е-селектина в качестве маркера образования бляшек [44]. RBP4 также известен как независимый детерминантный индекс тяжести бляшки. Циркулирующие уровни RBP4 положительно

связаны с толщиной интима-медиа – общепризнанным параметром атеросклероза [45]. Повышенная экспрессия RBP4 наблюдалась при атеросклеротических поражениях аорты у людей и apoE –дефицитных мышей. При ингибировании RBP4 снижается прогрессирование атеросклероза, в то время как сверхэкспрессия ускоряет атерогенез у apoE –дефицитных мышей [46]. Поэтому следует ожидать, что RBP4 положительно связан с толщиной среды интимы сонной артерии как маркер субклинического атеросклероза.

RBP4 и другие факторы риска ССЗ. Перспективные когортные исследования показали, что базовый уровень RBP4 в сыворотке был независимым предиктором неблагоприятных сердечно-сосудистых событий после корректировки традиционных факторов риска. Опубликованы результаты исследований с противоречивыми данными, показывающими связь RBP4 с факторами риска ССЗ. В одном из исследований снижение RBP4 предсказывало ишемию у пациентов с семейной гиперхолестеринемией [47]. В другом было показано, что RBP4 действует как независимый предиктор макрососудистых заболеваний у пациентов с СД2 [48]. Используя более длительное время наблюдения и масс-спектрометрический анализ, Q. Sun и соавт. [49]. также показали, что голо- или апо-RBP4 были связаны с маркерами риска ССЗ. Напротив, Z. Mallat и соавт. [50], изучая больший размер выборки, но за меньший промежуток времени, не сообщали о тех же результатах. Причиной этих противоречивых результатов могут быть различные методы измерения концентрации RBP4 и различия в размере выборки, пола и этнической принадлежности. Показано, что уровни RBP4 в плазме положительно коррелируют с толщиной стенки левого желудочка и отрицательно коррелируют с опосредованной потоком дилатацией по данным эхокардиографии [50]. Наличие клинического артериосклероза (определяемого как обнаружение по меньшей мере одного из следующих факторов: ишемическая болезнь сердца, инсульт или периферическое сосудистое заболевание) связано с более высоким циркулирующим RBP4 [51]. Аналогичным образом концентрация RBP4 была связана с любым предшествующим цереброваскулярным заболеванием и с любой предшествующей госпитализацией для пациентов с ССЗ [52]. У пациентов с фатальной или нефатальной болезнью коронарных артерий уровень RBP4 в сыворотке был выше, чем у пациентов группы контроля [53]. Таким образом, несмотря на наличие связи между RBP4 и ССЗ, остается неясным, является ли изменение содержания RBP4 причиной или следствием выявленных изменений.

Заключение. RBP4, по-видимому, является адипокином, который не только индуцирует резистентность к инсулину, но также участвует в патогенезе других метаболических осложнений ожирения, что подтверждено тесной связью RBP4 с атерогенными липопротеинами, атеросклеротическим поражением сосудов и ССЗ. Однако важным ограничением некоторых исследований, связанных с RBP4, является то, что они включают пациентов, которые получали

лекарственную терапию (сахароснижающие и гиполипидемические средства) или имели почечную и печеночную недостаточность. Данные факторы влияют на концентрацию RBP4 в крови и искажают результаты. Несмотря на это выявленная потенциальная метаболическая роль RBP4 требует дальнейшего изучения. Поэтому необходимы дальнейшие тщательно спланированные исследования, в которых основное внимание будет уделяться установлению того, является ли RBP4 молекулярным участником метаболических изменений или всего лишь динамически меняющимся «свидетелем».

Финансирование. Работа поддержана грантом РНФ № 17-75-20026.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Booth A., Magnuson A., Fouts J., Foster M.T. Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* 2016; 26(1).
2. Jung U., Choi M-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15(4):6184–223.
3. Nakamura K., Fuster J. J., Walsh K. Adipokines: A link between obesity and cardiovascular disease. *Journal of Cardiology.* 2014;63(4):250–9.
4. Abahusain MA, Wright J, Dickerson JW, De Vol EB. Retinol, α -tocopherol and carotenoids in diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1999;53(8):630–5.
5. Christou G.A., Tellis C.C., Elisaf M.S., Tselepis A.D., Kiortsis D.N. The changes in plasma retinol-binding protein 4 levels are associated with those of the apolipoprotein B-containing lipoproteins during dietary and drug treatment. *Angiology.* 2012; 63: 67–75.
6. Huang G., Wang D., Khan U.I., Zeb I., Manson J.E., Miller V. et al. Associations between retinol-binding protein 4 and cardiometabolic risk factors and subclinical atherosclerosis in recently postmenopausal women: Cross-sectional analyses from the KEEPS Study. *Cardiovascular diabetology.* 2012; 11(1):52.
7. Schieffner A., Skerra A. The Menagerie of Human Lipocalins: A Natural Protein Scaffold for Molecular Recognition of Physiological Compounds. *Acc. Chem. Res.* 2015;48(4):976–85.
8. Newcomer M.E., Ong D.E. Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.* 2000;1482(1-2):57–64.
9. Meigs J.B., Panhuysen C.I.M., Myers R.H., Wilson P.W.F., Cupples L.A. A Genome-Wide Scan for Loci Linked to Plasma Levels of Glucose and HbA1c in a Community-Based Sample of Caucasian Pedigrees: The Framingham Offspring Study. *Diabetes.* 2002;51(3):833–40.
10. Duggirala R., Blangero J., Almasy L., Dyer T.D., Williams K.L., Leach R.J. et al. Linkage of type 2 diabetes mellitus and of age at onset to a genetic location on chromosome 10q in Mexican Americans. *Am. J. Hum. Genet.* 1999;64:1127–40.
11. Alapatt P., Guo F., Komanetsky S.M., Wang S., Cai J., Sargsyan A. et al. Liver Retinol Transporter and Receptor for Serum Retinol-binding Protein (RBP4). *J. Biol. Chem.* 2012;288(2):1250–65.
12. Asha G.V., Mahesh M., Vajreswari A., Jeyakumar, S. M. Male mice are susceptible to high fat diet-induced hyperglycaemia and display increased circulatory retinol binding protein 4 (RBP4) levels and its expression in visceral adipose depots. *Archives of Physiology and Biochemistry.* 2016;122(1):19–26.
13. Kos K., Wong S., Tan B.K., Kerrigan D., Randeve H.S., Pinkney J.H., et al. Human RBP4 adipose tissue expression is gender specific and influenced by leptin. *Clinical Endocrinology.* 2011;74(2):197–205.
14. Janke J., Engeli S., Boschmann M., Adams F., Bohnke J., Luft F.C., et al. Retinol-Binding Protein 4 in Human Obesity. *Diabetes.* 2006;55(10):2805–10.

15. Yang Q., Graham T.E., Mody N., Preitner F., Peroni O.D., Zabolotny J.M., et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. 2005;436(7049):356–62.
16. Cabré A., Lázaro I., Girona J., Manzanares J., Marimón F., Plana N., et al. Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *J. In. Med.* 2007;262(4):496–503.
17. Abel E.D., Peroni O., Kim J.K., Kim Y.B., Boss O., Hadro E. et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*. 2001;409:729–33.
18. Moschen A.R., Adolph T.E., Gerner R.R., Wieser V., Tilg H. Lipocalin-2: A Master Mediator of Intestinal and Metabolic Inflammation. *Trends Endocrinol. Metab.* 2017;28(5):388–97.
19. Christou G., Tselepis A., Kiortsis D. The Metabolic Role of Retinol Binding Protein 4: An Update. *Horm Metab Res.* 2011;44(01):6–14.
20. Lee M.-J., Wu Y., Fried S.K. Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol. Aspects Med.* 2013;34(1):1–11.
21. Bobbert T., Raila J., Schwarz F., Mai K., Henze A., Pfeiffer A.F.H., et al. Relation between retinol, retinol-binding protein 4, transthyretin and carotid intima media thickness. *Atherosclerosis*. 2010(Dec.);213(2):549–51.
22. Gavi S., Qurashi S., Stuart L.M., Lau R., Melendez M.M., Mynarcik D.C., et al. Influence of Age on the Association of Retinol-binding Protein 4 With Metabolic Syndrome. *Obesity*. 2008;16(4):893–5.
23. Graham T.E., Wason C.J., Blüher M., Kahn B.B. Shortcomings in methodology complicate measurements of serum retinol binding protein (RBP4) in insulin-resistant human subjects. *Diabetologia*. 2007;50(4):814–23.
24. Olszanecka-Glinianowicz M., Madej P., Zdun D., Bożentowicz-Wikarek M., Sikora J., Chudek J., et al. Are plasma levels of visfatin and retinol-binding protein 4 (RBP4) associated with body mass, metabolic and hormonal disturbances in women with polycystic ovary syndrome? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reproductive Biol.* 2012;162(1):55–61.
25. Moraes-Vieira P.M., Yore M.M., Dwyer P.M., Syed I., Aryal P., Kahn B.B. RBP4 Activates Antigen-Presenting Cells, Leading to Adipose Tissue Inflammation and Systemic Insulin Resistance. *Cell Metab.* 2014;19(3):512–26.
26. Shea J.L., King M.T.C., Yi Y., Gulliver W., Sun G. Body fat percentage is associated with cardiometabolic dysregulation in BMI-defined normal weight subjects. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2012;22(9):741–7.
27. Carmina E. Obesity, Adipokines and Metabolic Syndrome in Polycystic Ovary Syndrome. *Polycystic Ovary Syndr.* 2012;40–50.
28. De Lorenzo A., Bianchi A., Maroni P., Iannarelli A., Di Daniele N., Iacopino L. et al. Adiposity rather than BMI determines metabolic risk. *Int. J. Cardiol.* 2013;166(1):111–7.
29. Lee J.W., Lee H.R., Shim J.Y., Im J.A., Lee D.C. Abdominal visceral fat reduction is associated with favorable changes of serum retinol binding protein-4 in nondiabetic subjects. *Endocrine Journal*. 2008;55:811–8.
30. Boonchaya-anant P., Apovian C.M. Metabolically Healthy Obesity—Does it Exist? *Curr. Atheroscler. Rep.* 2014;16(10).
31. Graham T.E., Yang Q., Blüher M., Hammarstedt A., Ciaraldi T.P., Henry R.R., Wason C.J., et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N. Engl. J. Med.* 2006;354:2552–63.
32. Barber T., Esteban-Pretel G., Marin M., Timoneda J. Vitamin A Deficiency and Alterations in the Extracellular Matrix. *Nutrients*. 2014;6(11):4984–5017.
33. Hu S., Liu Q., Huang X., Tan H. Serum level and polymorphisms of retinol-binding protein-4 and risk for gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2016;16(1).
34. Nair A.K., Sugunan D., Kumar H., Anilkumar G. Case-control analysis of SNPs in GLUT4, RBP4 and STRA6: association of SNPs in STRA6 with type 2 diabetes in a South Indian population. *PLoS ONE*. 2010;5:e11444.
35. Usui S., Ichimura M., Ikeda S., Okamoto M. Association between serum retinol-binding protein 4 and small dense low-density lipoprotein cholesterol levels in young adult women. *Clinica Chimica Acta*. 2009;399(1-2):45–8.
36. Klisić A. The Association Between Retinol-Binding Protein 4 and Cardiovascular Risk Score is Mediated by Waist Circumference in Overweight/Obese Adolescent Girls. *ACTA CLIN. CROAT.* 2017;92–8.
37. Christou G.A., Tellis C.C., Elisaf M.S., Tselepis A.D., Kiortsis D.N. The Changes in Plasma Retinol-Binding Protein 4 Levels are Associated With Those of the Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins During Dietary and Drug Treatment. *Angiology*. 2011;63(1):67–75.
38. Frey R.S., Ushio-Fukai M., Malik A.B. NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells: Role in Physiology and Pathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009;11(4):791–810.
39. Kern T.S. Contributions of Inflammatory Processes to the Development of the Early Stages of Diabetic Retinopathy. *Exp. Diabetes Res.* 2007;2007:1–14.
40. Codoñer-Franch P., Mora-Herranz A., Simó-Jordá R., Pérez-Rambla C., Boix-García L., Faus-Pérez A. Retinol-Binding Protein 4 Levels Are Associated with Measures of Liver and Renal Function and Oxidant/Antioxidant Status in Obese Children. *J. Pediatr.* 2013;163(2):593–5.
41. Liu Y., Wang D., Li D., Sun R., Xia M. Associations of retinol-binding protein 4 with oxidative stress, inflammatory markers, and metabolic syndrome in a middle-aged and elderly Chinese population. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2014;6(1):25.
42. Farjo K.M., Farjo R.A., Halsey S., Moiseyev G., Ma J.-x. Retinol-Binding Protein 4 Induces Inflammation in Human Endothelial Cells by an NADPH Oxidase- and Nuclear Factor Kappa B-Dependent and Retinol-Independent Mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 2012;32(24):5103–15.
43. Park S.E., Kim D.H., Lee J.H., Park J.S., Kang E.S., Ahn C.W. et al. Retinol-binding protein-4 is associated with endothelial dysfunction in adults with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2009;204(1):23–5.
44. Dessein P.H., Tsang L., Norton G.R., Woodiwiss A.J., Solomon A. Retinol Binding Protein 4 Concentrations Relate to Enhanced Atherosclerosis in Obese Patients with Rheumatoid Arthritis. Alemany M, editor. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e92739.
45. Bobbert T., Raila J., Schwarz F., Mai K., Henze A., Pfeiffer A.F.H., et al. Relation between retinol, retinol-binding protein 4, transthyretin and carotid intima media thickness. *Atherosclerosis*. 2010;213(2):549–51.
46. Zabetian-Targhi F., Mahmoudi M.J., Rezaei N., Mahmoudi M. Retinol Binding Protein 4 in Relation to Diet, Inflammation, Immunity, and Cardiovascular Diseases. *Adv. Nutr.: Int. Rev. J.* 2015;6(6):748–62.
47. Cubedo J., Padró T., Cinca J., Mata P., Alonso R., Badimon L. Retinol-binding protein 4 levels and susceptibility to ischaemic events in men. *Eur. J. Clin. Investig.* 2014;44(3):266–75.
48. Zhang M., Chen P., Chen S., Sun Q., Zeng Q., Chen J., et al. The association of new inflammatory markers with type 2 diabetes mellitus and macrovascular complications: a preliminary study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18:1567–72.
49. Sun Q., Kiernan U.A., Shi L., Phillips D.A., Kahn B.B., Hu F.B., et al. Plasma retinol-binding protein 4 (RBP4) levels and risk of coronary heart disease: a prospective analysis among women in the Nurses' Health Study. *Circulation*. 2013;127:1938–47.
50. Mallat Z., Simon T., Benessiano J., Clément K., Taleb S., Wareham N.J., et al. Retinol-Binding Protein 4 and Prediction of Incident Coronary Events in Healthy Men and Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009;94(1):255–60.
51. Sell H., Habich C., Eckel J. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology*. 2012;8(12):709–16.
52. Ingelsson E., Lind L. Circulating Retinol-Binding Protein 4 and Subclinical Cardiovascular Disease in the Elderly. *Diabetes Care*. 2008;32(4):733–5.
53. Won J.C., Park C.-Y., Oh S.W., Park S.W. Increased plasma levels of retinol-binding protein 4 with visceral obesity is associated with cardiovascular risk factors. *J. Diabetes Investig.* 2012;3(5):457–63.

Поступила 10.09.17

Принята к печати 01.11.17

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.127-005.8-036.11-037-074

Голощапов-Аксенов Р.С.¹, Аксёнов В.В.², Луценко В.Д.³

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ОСТРОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА ПО БИОХИМИЧЕСКИМ КАРДИОМАРКЕРАМ КРОВИ

¹ФПКМР «Медицинский институт РУДН» 117198, Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет» 305040, Курск, Россия;

³ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» 308015, Белгород, Россия

Острый инфаркт миокарда (ОИМ) в современных условиях – основная причина смертности населения практически во всех странах мира. Цель выполненной работы – определение прогностической значимости биохимических кардиомаркеров крови и создание прогностических моделей для ОИМ. У 157 больных ОИМ и 138 практически здоровых лиц изучены кардиомаркеры в крови посредством иммунохроматографического, спектрофотометрического методов, а также с помощью портативного биохимического анализатора MultiCareIn (Италия). Показано, что наибольшее прогностическое значение для развития ОИМ имеет повышение в крови уровня креатинкиназы-МВ более 25 МЕ/л, тропонина Т – более 0,5 мкг/л, ЛДГ₁ – свыше 200 МЕ/л и ЛДГ₂ – свыше 180 МЕ/л. Разработанная регрессионная модель для прогнозирования ОИМ по указанным выше показателям обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Заключение. Использование прогностически значимых кардиомаркеров крови и созданной регрессионной модели позволит прогнозировать развитие ОИМ и осуществлять профилактику и лечение на ранних сроках.

Ключевые слова: острый инфаркт миокарда; кардиомаркеры крови; прогнозирование.

Для цитирования: Голощапов-Аксенов Р.С., Аксёнов В.В., Луценко В.Д. Прогнозирование острого инфаркта миокарда по биохимическим кардиомаркерам крови. Клиническая лабораторная диагностика 2018; 63(2): 85-89. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-85-89>

Goloschapov-Aksenov R.S.1, Aksenov V.V.2, Lutsenko V.D.3

THE PROGNOSTICATION OF ACUTE MYOCARDIUM INFARCTION ACCORDING BIOCHEMICAL INDICES OF BLOOD

¹The Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "The Peoples' Friendship University of Russia", 117198, Moscow, Russia

²The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The South-Western State University", 308015, Kursk, Russia

³The Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "The Belgorod State National Research University", 308015, Belgorod, Russia

In actual conditions, the acute myocardium infarction is a main cause of population mortality factually in all countries. The purpose of study is to establish a prognostic significance of biochemical cardio-markers of blood and to develop prognostic models for acute myocardium infarction. The sampling included 157 patients with acute myocardium infarction and 138 healthy individuals. The cardio-markers in blood were analyzed using immune chromatographic and spectrometric techniques and also applying portable biochemical analyzer MultiCareIn (Italy). It is demonstrated that the highest prognostic value for development of acute myocardium infarction is increasing of level of creatine kinase in blood more than 25 ME/l, troponin - more than 0.5 mkg/l, lactate dehydrogenase 1 - more than 200 ME/l and lactate dehydrogenase 2 - more than 180 ME/l. The developed regression model for prognosis of acute myocardium infarction according to the indices mentioned above has a high sensitivity and specificity. Conclusion. The application of prognostically significant cardio-markers of blood and developed regression model permits to forecast development of acute myocardium infarction and to implement prevention and treatment in earlier period.

Key words: acute myocardium infarction; cardio-markers of blood; prognosis

For citation: Goloschapov-Aksenov R.S., Aksenov V.V., Lutsenko V.D. The prognostication of acute myocardium infarction according biochemical indices of blood. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(2): 85-89. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-85-89>

For correspondence: Aksenov V.V., the post-graduate student 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 20.09.2017
Accepted 01.11.2017

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти во всем мире: ни по какой другой причине ежегодно не умирает столько

людей, сколько от ССЗ [1–4]. Среди ССЗ приоритетное место принадлежит острому инфаркту миокарда (ОИМ) – неотложному клиническому состоянию, обусловлен-

Для корреспонденции: Аксенов Виталий Вячеславович, аспирант каф. биомедицинской инженерии; e-mail: vitalaxen@mail.ru

ному некрозом участка сердечной мышцы в результате нарушения ее кровоснабжения [5–8]. По оценкам учёных, в 2008 г. от ССЗ умерло 17,3 млн человек, что составило 30% всех случаев смерти в мире. Из этого числа 7,3 млн человек умерли от ишемической болезни сердца, включая ОИМ.

Данная проблема в разной степени затрагивает страны с низким и средним уровнем дохода [9–13]. Более 80% случаев смерти от ССЗ в этих странах регистрируется с одинаковой частотой как среди мужчин, так и женщин. К 2030 г. прогнозируется, что около 23,6 млн человек умрёт от ССЗ и главным образом от болезней сердца и инсульта. Ежегодно в мире от болезней сердца и сосудов умирает 17,5 млн человек, причем 1,2 млн из них составляют наши соотечественники.

При ОИМ прогноз заболевания в большинстве исследований сводится к прогнозу жизни, где в качестве конечных точек используются все случаи кардиальной смерти, включающие декомпенсацию сердечной недостаточности и внезапную сердечную смерть [14]. В отдельных исследованиях установлена прогностическая информативность некоторых факторов риска, нарушений липидного обмена на развитие неблагоприятных исходов ОИМ – летальность, повторный инфаркт миокарда, повторная госпитализация [15].

Вместе с тем до настоящего времени не исследована прогностическая значимость лабораторных кардиомаркёров ОИМ и прежде всего таких, как тропонин Т, креатинкиназа, фракции ЛДГ. Прогнозирование же ОИМ на основе названных кардиомаркёров крови позволит осуществлять раннюю профилактику и диагностику заболевания, корректировать схемы медикаментозной терапии, что в конечном итоге приведёт к снижению инвалидности, смертности и летальности вследствие ОИМ.

Цель выполненной работы – определение прогностической значимости биохимических кардиомаркёров крови и создание прогностических моделей для ОИМ.

Материал и методы. Исследование проведено у 157 больных ОИМ (основная группа) и 138 практически здоровых лиц (контрольная группа). Верификация ОИМ выполнялась с учётом клинической симптоматики, показателей электрокардиографии, лабораторных исследований, включая кардиомаркёры, образующиеся в результате гибели миокардиоцитов. Определение тропонина Т и креатинкиназы-МВ осуществлялось иммунохроматографическим методом, посредством тестов ACON Biotech, а содержание общей ЛДГ и её фракций – спектрофотометрическим методом. Уровень холестерина определяли с помощью портативного биохимического анализатора MultiCareIn (Италия).

При расчёте прогностических коэффициентов (ПК) использовалась формула:

$$ПК = 10 \lg (p_1/p_2),$$

где ПК – прогностический коэффициент, p_1 – частота встречаемости отклонений показателя в контроле, p_2 – частота встречаемости отклонений этого же показателя в основной группе.

Таблица 1

Лабораторные показатели у пациентов с ОИМ и в контрольной группе

Лабораторные показатели	Пациенты с ОИМ	Контрольная группа
ХС ЛПНП, ммоль/л	4,7±0,06*	3,9±0,09*
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,1±0,03*	1,6±0,05*
Креатинкиназа-МВ, МЕ/л	387,2±4,9*	0,8±0,06*
ЛДГ общая, МЕ/л	488,9±4,2*	206,4±6,1*
ЛДГ ₁ , МЕ/л	346,4±5,3*	114,2±3,7*
ЛДГ ₂ , МЕ/л	254,3±4,2*	96,4±5,1*
Тропонин Т, мкг/л	64,7±3,5*	0,31±0,04*

Примечание. * – достоверные различия в сравнении с контролем.

Далее, используя программу Statistica 6.0 и регрессионный метод разрабатывались прогностические модели развития ОИМ. Чувствительность и специфичность созданных моделей определялась по общепринятым формулам и правилам.

Результаты и обсуждение. Для решения задачи прогнозирования ОИМ проведена статистическая оценка основных лабораторных параметров (табл.1). Как видно из представленных ниже результатов, большая часть изученных лабораторных показателей

Таблица 2

Частота выявленных отклонений лабораторных параметров у пациентов с ОИМ и в контрольной группе ($p \neq tp, \%$)

Лабораторные показатели	Пациенты с ОИМ	Контрольная группа
ХС ЛПНП выше 4,3 ммоль/л	20,4±3,2*	5,3±1,9*
ХС ЛПВП ниже 1,4 ммоль/л	29,6±3,6*	5,7±2,0*
Креатинкиназа-МВ выше 25 МЕ/л	97,5±1,2*	0,05±0,2*
ЛДГ общая свыше 460 МЕ/л	80,2±3,2*	1,4±1,0*
ЛДГ ₁ более 200 МЕ/л	89,7±2,4*	0,08±0,2*
ЛДГ ₂ выше 180 МЕ/л	87,4±2,6*	0,1±0,3*
Тропонин Т более 0,5 мкг/л	93,6±2,0*	0,07±0,2*

Таблица 3

Прогностичность основных лабораторных показателей при выявлении их отклонений у больных ОИМ

Лабораторные показатели	Прогностический коэффициент при обнаружении отклонений	Ранговая позиция
ХС ЛПНП более 4,3 ммоль/л	-5,9	11-я
ХС ЛПВП менее 1,4 ммоль/л	-7,2	9-я
Креатинкиназа-МВ более 25 МЕ/л	-32,9	1-я
ЛДГ общая более 460 МЕ/л	-17,6	5-я
ЛДГ ₁ свыше 200 МЕ/л	-30,5	3-я
ЛДГ ₂ свыше 180 МЕ/л	-29,4	4-я
Тропонин Т более 0,5 мкг/л	-31,3	2-я
Итого	-154,8	-

у больных ОИМ и контрольной группы достоверно различаются. Кроме того, репрезентативно при ОИМ повышается содержание в сыворотке крови холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП) и снижается уровень холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП). Однако наиболее выраженные изменения среди биохимических параметров крови характерны для креатинкиназы–МВ, уровень которой повысился в 484 раза у пациентов с ОИМ и тропонина Т, его содержание возросло в 209 раз. Активность других ферментов (общей ЛДГ и её изоферментов) при развитии ОИМ достоверно повысилась. При этом более существенным оказалось повышение активности ЛДГ₁ ($p < 0,001$).

Данные о частоте отклонений лабораторных показателей приведены в табл. 2. Наиболее часто среди больных ОИМ встречается повышение уровня фракции МВ креатинкиназы – выше 25 МЕ/л ($p < 0,001$) в сравнении с контрольной группой. Высокой является распространённость увеличения тропонина Т в крови более 0,5 мкг/л, изоферментов ЛДГ₁ более 200 МЕ/л, ЛДГ₂ выше 180 МЕ/л. Несколько ниже указанных ферментов и кардиоспецифических маркёров регистрируется при ОИМ увеличение общей ЛДГ свыше 460 МЕ/л.

Величины прогностических коэффициентов лабораторных параметров в случае выявления отклонений при математическом ранжировании расположились в последовательности, показанной в табл. 3. Первая ранговая позиция принадлежит фракции МВ креатинкиназы. Второе и третье места занимают соответственно тропонин Т и ЛДГ₁. Высокое значение прогностического коэффициента присуще ЛДГ₂. Сумма прогностических коэффициентов при выявлении всех отклонений очень высокая.

Среди рассмотренных выше прогностических ферментов и кардиоспецифических маркёров для синтеза математической модели использовались фракция МВ креатинкиназы, ЛДГ₁, ЛДГ₂ и тропонин Т.

В результате получена следующая модель:

$$y_1 = -7,534 + 0,408x_1 + 9,547x_2 + 2,267x_3 + 1,117x_4,$$

где y_1 – вероятность развития ОИМ, x_1 – фракция МВ креатинкиназы,

x_2 – ЛДГ₁, x_3 – ЛДГ₂, x_4 – тропонин.

Созданная математическая модель является адекватной по критерию Фишера ($F_{расч.} = 32,5 > F_{табл.} = 4,7$). Чувствительность данной модели высокая и составляет 95,7%, а специфичность – 96,3%.

Регрессионная модель прогнозирования сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с хронической сердечной недостаточностью ишемического генеза, включающая в качестве независимых достоверных предикторов неблагоприятного исхода возраст, индекс массы тела, частоту сердечных сокращений, уровень мочевого кислоты, высокочувствительного С-реактивного белка, N-терминальный фрагмент промозгового натрийуретического пептида, позволяет рассчитать индивидуальный риск развития осложнений с чувствительностью 81% и специфичностью 85% [16]. При установленной прогностической ценности N-терминального фрагмен-

та промозгового натрийуретического пептида в общей популяции пациентов, перенёсших ОИМ, остаётся открытым вопрос возможных ограничений применения данного показателя [17].

Высокая прогностическая и диагностическая значимость тропонина в развитии ОИМ показана и в другом ранее выполненном исследовании [18]. Установлено, что тропонин обладает высокой специфичностью, приближающейся к 100% при диагностике как крупноочагового, так и мелкоочагового ОИМ.

С целью прогнозирования развития и тяжести ОИМ разработана нейросетевая модель, включая в качестве входных параметров следующие лабораторные показатели крови: уровень кортизола, адреналина, норадреналина, кальция, магния [19]. Нейросетевое моделирование на основе данных биохимических параметров позволяет прогнозировать вероятность ОИМ с точностью до 88,9%.

Исход ОИМ прогнозировался и на основании статистического метода с применением алгоритма Data Mining «дерево решений» [20]. В качестве входных данных использовались чувствительные и специфические векторкардиографические показатели. Установлены прогностически значимые маркеры исхода ОИМ. Если возраст больного был 57 лет и более, а скорость распространения возбуждения по миокарду высоких отделов передней стенки левого желудочка замедлялась до 6,33 мв/с, прогнозировался летальный исход с точностью 92,86 %. В случае регистрации у пациента увеличения площади предсердных петель более 0,188 мм² (в БА₂) с угловым расхождением петель QRS-P более 15,5° (в БА₁), размыкания петли QRS менее 2,834 мм (в 3-й проекции) и скорости распространения возбуждения в конечной части петли Т менее 2,338 мв/с (в БА₁) при различных значениях углового расхождения вектора QRS-T (в БА₂) прогнозировался благоприятный исход с точностью 97,67 % [20].

С помощью пошагового дискриминантного анализа параметров исходного эхокардиографического исследования выделены показатели, которые в совокупности уже на этапе первичного обследования позволяют среди лиц с постинфарктным кардиосклерозом выделить тех, у которых впоследствии развился повторный инфаркт миокарда [14]. В состав линейной дискриминантной функции вошли следующие показатели: систолическое давление до и после нагрузки, значение Е/А на фоне нагрузки, индекс конечного систолического объёма (p для всех включённых в формулу переменных от 0,03 до 0,05, p для построенного уравнения линейной дискриминантной функции $< 0,014$). Кроме того, было замечено, что увеличение возраста на 10% (в 1,1 раза) приводит к росту вероятности заболевания на 30% (1,3 раза). Поэтому для каждого пациента был рассчитан возрастной коэффициент (К):

$$K = (\text{Возраст (лет)} / 50)^3$$

Сравнительный анализ прогностической значимости применения базисной медикаментозной терапии в отношении вероятности развития неблагоприятных

исходов показал, что в качестве прогностических факторов следует рассматривать артериальную гипертензию, признак атерогенности в виде высокого уровня ЛПОНП ($> 0,35$ ммоль/л), признаки преходящей слабовыраженной ишемии миокарда – болевая безболевая ишемия миокарда на ЭКГ при суточном мониторинге, а также функциональный резерв миокарда левого желудочка – фракцию выброса ($< 55\%$) [14].

Имеются также данные, подтверждающие, что определение сразу нескольких нейрогормонов может повысить прогностическую значимость тестов, однако их оптимальная комбинация для диагностики и лечения ОИМ до сих пор не установлена. Существуют доказательства того, что оценка «комплексной панели» нейрогормонов позволит улучшить диагностику, стратификацию риска и прогноза у больных ОИМ, а также более точно выбрать препарат для воздействия на определённый процесс. Определение сразу нескольких показателей может быть использовано при создании алгоритма для принятия клинических решений. Тем не менее, в настоящее время эта цель представляется все ещё далекой [21].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гафарова А.В. Внезапная смерть: результаты исследования инфаркта миокарда на основе программы ВОЗ. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2009; 8(6): 86.
2. Никулина Н.Н., Якушин С.С. Регистрация заболеваемости и смертности от острых форм ИБС в России: выявленные проблемы и пути их решения. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2009; 8(6): 253-4.
3. Ahmed T., Atary J., Wolterbeek R., Hasan-Ali H., Abdel-Kader S.S., Schalij M.J., Jukema J.W. Aspiration Thrombectomy During Primary Percutaneous Coronary Intervention as Adjunctive Therapy to Early (in-ambulance) Abciximab Administration in Patients with Acute ST Elevation Myocardial Infarction: An Analysis from Leiden MISSION! Acute Myocardial Infarction Treatment Optimization Program. *Journal of Interventional Cardiology*. 2012; 1: 1-9.
4. Romaguera R., Gomez J.A., Romaguera G.R., Gómez-Lara J., Ferreira J.L., Roura G. MGuard Mesh-Covered Stent for Treatment of ST-Segment Elevation Myocardial Infarction with High Thrombus Burden Despite Manual Aspiration. *Journal of Interventional Cardiology*. 2013; 1: 1-7.
5. Александров А.А., Розанов В.Б., Зволинская Е.Ю., Шугаева Е.Н., Котова М.Б. Необходимость и возможность ранней профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2009; 8(6): 17.
6. Зельтин-Абрамов Е.М. Разрыв сердца при остром инфаркте миокарда (обзор литературы). *Сибирский медицинский журнал (г.Томск)*. 2010; 4-1: 14-22.
7. Кузьмин А.Г., Горбунов В.В., Горянова Е.В., Богатилов Е.В., Кошечкина О.Д. Изменение содержания некоторых цитокинов при хронической сердечной недостаточности. *Казанский медицинский журнал*. 2012; 3: 494-8.
8. Salto-Tellez M., Lim S., Menshawe R. Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: A quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovascular Pathology*. 2004; 2: 91-7.
9. Бокерия О.Л., Ахобков А.А. Внезапная сердечная смерть: механизмы возникновения и стратификация риска. *Анналы аритмологии*. 2012; 3: 5-13.
10. Николаев Н.А., Тращенко А.С., Судакова А.Н. Инфаркт миокарда, осложнённый пневмонией. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2012; 12: 93-4.

11. Biyik I., Akturk I.F., Yalcin A.A., Tanidir I.C., Erturk M. Cannabis joint triggered recurrent anterior myocardial infarction in an adolescent taking dual anti-platelet therapy. *Postep Kardiol Inter*. 2012; 28:156-9.
12. Gu R., Zheng D., Bai J., Xie J., Dai Q., Xu B. Altered melusin pathways involved in cardiac remodeling following acute myocardial infarction. *Cardiovascular Pathology*. 2012; 2: 105-11.
13. Siudak Z., Godlewski J., Badacz L. ST-elevation myocardial infarction with local infusion of abciximab using thrombectomy catheter in a patient with very late stent thrombosis. *Postep Kardiol Inter*. 2012; 30: 338-41.
14. Шопин А.Н., Хомаева Я.Б., Бурдина Е.Н. Прогнозирование повторного инфаркта миокарда у больных с постинфарктным кардиосклерозом. *Практическая медицина*. 2011; 48: 135-8.
15. Тиньков А.Н., Московцева Н.И., Столбова М.В. Алгоритмы прогнозирования неблагоприятного течения ИБС после впервые перенесенного инфаркта миокарда. *Современные проблемы науки и образования*. 2013; 1: 59-69.
16. Кошелева Н.А., Ребров А.П. Традиционные факторы риска и прогнозирование развития сердечно-сосудистых осложнений у больных с хронической сердечной недостаточностью ишемического генеза. *Клиницист*. 2011; 2: 39-45.
17. Фирстов Д.А., Нечаева Г.И., Друк И.В., Ткаченко Т.В. Прогнозирование неблагоприятных исходов у больных, перенесших инфаркт миокарда на фоне нарушения углеводного обмена. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2012; 7: 145-50.
18. Залевская Н.Г. Современные методы лабораторного подтверждения инфаркта миокарда. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2011;14(10): 260-7.
19. Прохоренко И.О. Метод нейросетевого моделирования и его использование для прогнозирования развития соматической патологии у лиц старших возрастных групп. *Современные проблемы науки и образования*. 2013; 1: 70.
20. Белая И.Е., Коломиец В.И., Мусаева Э.К. Прогностические маркеры исхода острого периода инфаркта миокарда. *Медицина неотложных состояний*. 2016; 1(72): 92-7.
21. Кокорин В.А., Люсов В.А., Шайдюк О.Ю. Прогностическая значимость повышения активности нейроморальных систем у больных инфарктом миокарда. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2011; 10: 37-43.

REFERENCES

1. Gafarova A.B. Sudden death: a study of myocardial infarction on the basis of WHO program. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2009; 8(6): 86.
2. Nikulina N.H., Jakushin S.S. Registration of morbidity and mortality from acute forms of ischemic heart disease in Russia: identified problems and ways of their solution. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2009; 8(6): 253-4.
3. Ahmed T., Atary J., Wolterbeek R., Hasan-Ali H., Abdel-Kader S.S., Schalij M.J., Jukema J.W. Aspiration Thrombectomy During Primary Percutaneous Coronary Intervention as Adjunctive Therapy to Early (in-ambulance) Abciximab Administration in Patients with Acute ST Elevation Myocardial Infarction: An Analysis from Leiden MISSION! Acute Myocardial Infarction Treatment Optimization Program. *Journal of Interventional Cardiology*. 2012; 1: 1-9.
4. Romaguera R., Gomez J.A., Romaguera G.R., Gómez-Lara J., Ferreira J.L., Roura G. MGuard Mesh-Covered Stent for Treatment of ST-Segment Elevation Myocardial Infarction with High Thrombus Burden Despite Manual Aspiration. *Journal of Interventional Cardiology*. 2013; 1: 1-7.
5. Aleksandrov A.A., Rozanov V.B., Zvolinskaja E.Ju., Shugaeva E.N., Kotova M.B. The Necessity and possibility of the early prevention of cardiovascular diseases. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2009; 8(6): 17.
6. Zeltyn'-Abramov E.M. Cardiac Rupture in acute myocardial infarction (literature review). *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (g.Tomsk)*. 2010; 4-1: 14-22.

7. Kuz'min A.G., Gorbunov V.V., Gorijanova E.V., Bogatkov E.V., Koshevaya O.D. Change in the content of some cytokines in chronic heart failure. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012;3: 494-8.
8. Salto-Tellez M., Lim S., Menshawe R. Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: A quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovascular Pathology*. 2004; 2: 91-7.
9. Bokerija O.L., Ahobekov A.A. Udden cardiac death: mechanisms and risk stratification. *Annaly aritmologii*. 2012; 3: 5-13.
10. Nikolaev N.A., Trashhenko A.S., Sudakova A.N. Myocardial infarction complicated by pneumonia. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2012; 12: 93-4.
11. Biyik I., Akturk I.F., Yalcin A.A., Tanidir I.C., Erturk M. Cannabis joint triggered recurrent anterior myocardial infarction in an adolescent taking dual anti-platelet therapy. *Postep Kardiol Inter*. 2012; 28:156-9.
12. Gu R., Zheng D., Bai J., Xie J., Dai Q., Xu B. Altered melusin pathways involved in cardiac remodeling following acute myocardial infarction. *Cardiovascular Pathology*. 2012; 2: 105-111.
13. Siudak Z., Godlewski J., Badacz L. ST-elevation myocardial infarction with local infusion of abiciximab using thrombectomy catheter in a patient with very late stent thrombosis. *Postep Kardiol Inter*. 2012; 30: 338-41.
14. Shopin A.N., Hovaeva Ja.B., Burdina E.N. Prediction of repeated myocardial infarction in patients with postinfarction cardiosclerosis. *Prakticheskaya meditsina*. 2011; 48: 135-8.
15. Tin'kov A.N., Moskovceva N.I., Stolbova M.V. Igorithms that predict unfavorable course of ischemic heart disease after first-time myocardial infarction. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013; 1:59-69.
16. Kosheleva N.A., Rebrov A.P. Traditional risk factors and prediction of cardiovascular complications in patients with chronic heart failure of ischemic Genesis. *Klinitsist*. 2011; 2: 39-45.
17. Firstov D.A., Nechaeva G.I., Druk I.V., Tkachenko T.V. rediction of adverse outcomes in patients after myocardial infarction on the background of violations of carbohydrate metabolism. *Kubanskiy nauchnyi meditsinskij vestnik*. 2012; 7: 145-50.
18. Zalevskaja N.G. ern methods of laboratory confirmation of myocardial infarction. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmacija*. 2011;14(10): 260-7.
19. Prohorenko I.O. MeMethod of neural network modeling and its use to predict the development of somatic pathology in individuals older age groups. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013; 1: 70.
20. Belaya I.E., Kolomiets V.I., Musaeva Je.K. Gnostic markers of the outcome of acute period of myocardial infarction. *Meditsina neotlozhnykh sostoyaniy*. 2016; 1(72): 92-7.
21. Kokorin V.A., Lyusov V.A., Shaidyuk O.Yu. rognostic significance of increasing the activity of neurohumoral systems in patients with myocardial infarction. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya*. 2011; 10: 37-43.

Поступила 20.09.17

Принята к печати 01.11.17

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.348/.351-006.04-06:616.155.194]-079.4

Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Матвеева И.И.

ОСНОВНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ФЕРРОКИНЕТИКИ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ АНЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА С МИКРОЦИТАРНЫМИ, ГИПОХРОМНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва

Проведен клинический анализ крови и основных метаболитов феррокинетики у 46 больных колоректальным раком, в основном III - IV стадии, до лечения. Изучение полученных результатов показало, что метод определения гепсидина 25 может быть использован в качестве дополнительного диагностического критерия анемического синдрома в комплексе с ферритином, растворимыми рецепторами трансферрина и расширенным клиническим анализом крови. Это особенно важно в дифференциальной диагностике анемии хронического заболевания (АХЗ) в сочетании с железodefицитной анемией и АХЗ с функциональным дефицитом железа, так как лечение принципиально различается. Перспектива состоит в патогенетическом подходе к лечению АХЗ у онкологических больных с применением антигепсидиновых препаратов на основе антител к гормону, ингибиторов и блокаторов его экспрессии под контролем концентрации гепсидина.

Ключевые слова: анемия; микроцитоз и гипохромия эритроцитов; железodefицитный эритропоэз; функциональный дефицит железа; гепсидин 25; растворимые рецепторы трансферрина; ферритин; эритропоэтин.

Для цитирования: Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Матвеева И.И. Основные метаболиты феррокинетики в дифференциальной диагностике анемического синдрома с микроцитарными, гипохромными характеристиками эритроцитов у больных колоректальным раком. 2018;63 (2): 89-94. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-89-94>

Для корреспонденции: Блиндарь Валентина Николаевна, д-р. биол. наук, вед.науч.сотр.; e-mail: bld51@list.ru

Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Matveeva I.I.

THE MAIN METABOLITES FERROKINETICS IN DIFFERENTIAL DIAGNOSTIC OF ANEMIC SYNDROME WITH MICROCYTIC, HYPOCHROMIC CHARACTERISTICS OF ERYTHROCYTES IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

FGBU "National Medical Research Center of Oncology N.N. Blokhin" of the Ministry of the Health of Russia, 115478, Moscow, Russia

The clinical analysis of blood and main metabolites of ferrokinetics was implemented before treatment in 46 patients with colorectal cancer mainly in stage III-IV. The analysis of obtained results demonstrated that the technique of detection of hepcidin 25 can be used as an additional diagnostic criterion of anemic syndrome in complex with ferritin, soluble receptors of transferrin and expanded clinical analysis of blood. This is especially important in differential diagnostic of anemia of chronic disease combined with iron-deficiency anemia and anemia of chronic disease with functional iron deficiency because treatment differs in the main. The perspective consists in pathogenic approach to treatment of anemia of chronic disease in oncologic patients using anti-hepcidin medications on the basis of antibodies to hormone, inhibitors and blockers of its expression under control of concentration of hepcidin.

Key words: anemia; microcythemia and hypochromia of erythrocytes; iron-deficiency erythropoiesis; functional iron deficiency; hepcidin 25; soluble receptors of transferrin; ferritin; erythropoietin.

For citation: Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Matveeva I.I. The main metabolites ferrokinetics in differential diagnostic of anemic syndrome with microcytic, hypochromic characteristics of erythrocytes in patients with colorectal cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(2): 89-94. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-89-94>

For correspondence: Blindar V.N., doctor of biological sciences, leading researcher of the Federal State Budget Scientific Institution "The N.N. Blokhin Russian Oncologic Scientific Center", e-mail: bld51@list.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 25.05.2017
Accepted 31.05.2017

Введение. Известно, что анемический синдром (АС) выявляется у онкологических больных еще до начала лечения. Его частота зависит от стадии злокачественной опухоли. Например, при колоректальном раке (КР) I - II стадии АС развивается в 40% случаев, III - IV стадии — в 80% [1]. В ряде исследований [2] показано, что истинный дефицит железа характерен для КР. Однако микроцитоз и гипохромия эритроцитов не всегда указывают на дефицит железа, а при длительном течении заболевания могут свидетельствовать об анемии хронических заболеваний (АХЗ). Важно дифференцировать железодефицитную анемию (ЖДА) от АХЗ, так как подходы к лечению принципиально различаются.

Когда АС установлен или предполагается с высокой долей вероятности, ключевой проблемой является определение типа дефицита железа: абсолютный (истинный) или функциональный. Принципиальная разница между ними состоит в том, что в случае абсолютного дефицита назначение препаратов железа приводит к активации эритропоэза, в периферической крови значительно увеличивается количество ретикулоцитов. Объем и среднее содержание гемоглобина восстанавливается до нормы, что свидетельствует об адекватности проводимой терапии. В то же время у пациентов с функциональным дефицитом железа при АХЗ такое назначение будет бесполезным [3].

Имеются данные о возможности использования гепсидина [4, 5] как маркера дефицита железа при АХЗ. Вместе с тем клиническая значимость этого показателя окончательно не определена.

Цель работы — исследование основных метаболитов феррокинетики для выявления их роли в дифференциальной диагностике АС. Основной задачей бы-

ла оценка показателей крови, исследование которых в дальнейшем сможет помочь в ранней диагностике и адекватной коррекции АС.

Материал и методы. Исследование проведено у 46 больных КР (рак прямой кишки у 29 человек, рак сигмовидной кишки у 7 человек, рак ободочной кишки у 7 человек, рак слепой кишки у 3 человек) до лечения. I стадия выявлена у 2 больных, II стадия — у 7, III стадия — у 25, IV стадия — у 12 больных. В исследование включено 24 мужчины и 22 женщины в возрасте от 33 до 89 ($62,5 \pm 1,8$) лет.

Расширенный клинический анализ крови с ретикулоцитарной формулой выполняли на гематологическом анализаторе Sysmex ХЕ-2100. В плазме крови методом иммуноферментного анализа определяли содержание ферритина (ФР) с помощью наборов фирмы «Orgentec Diagnostica GmbH» (Германия), растворимых рецепторов трансферрина (рРТФ) фирмы «BioVendor» (Чехия), уровень эндогенного эритропоэтина (ЭПО) с использованием наборов фирмы «Biomerica» (США) и гепсидина 25 (ГП25) с наборами «Peninsula Laboratories International, Inc.» (США).

Подсчитывали лейкоцитарную формулу и проводили детальный анализ морфологии эритроцитов. Число гипохромных и микроцитарных эритроцитов определяли на анализаторе Advia-120 (США).

Статистическую обработку данных (определение среднего значения, среднего квадратического отклонения, статистической значимости результатов) выполняли по Стьюденту с использованием критерия t , а при непараметрическом распределении — с помощью критерия Вилкоксона — Манна — Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Высокоинформатив-

Таблица 1

Сравнительная оценка показателей красной крови у пациентов с разными типами АС ($X \pm m$)

Группы	Показатели							
	RBC, $10^{12}/л$	HGB, г/л	MCV, фл	MCH, пг	MICRO, %	HYPO, %	RET, %	RET-HE, пг
Контроль ($n = 143$)	$4,5 \pm 3,7$	$146 \pm 7,3$	$87,3 \pm 5,5$	$28,9 \pm 1,7$	$0,5 \pm 0,04$	$0,7 \pm 0,1$	$0,91 \pm 0,4$	$30,9 \pm 1,7$
Больные без АС ($n = 10$)	$4,9 \pm 0,1$	$143,0 \pm 3,0$	$82,1 \pm 4,6$	$29,2 \pm 9,0$	$0,2 \pm 0,01$	$1,5 \pm 0,04^*$	$1,1 \pm 0,05$	$32,2 \pm 0,7$
Больные ЖДА ($n = 6$)	$4,2 \pm 0,2$	$96 \pm 6,0^*$	$75,3 \pm 1,4^*$	$22,7 \pm 0,9^*$	$9,9 \pm 2,2^*$	$12,1 \pm 4,0^{**}$	$1,1 \pm 0,2$	$23,1 \pm 1,0^*$
Больные ЖДЭ АХЗ ($n = 7$)	$4,2 \pm 0,2$	$93 \pm 3,2^*$	$73,9 \pm 4,2^*$	$22,3 \pm 1,7^*$	$33,4 \pm 9,6^{**}$	$22,2 \pm 4,4^{**}$	$1,7 \pm 0,3$	$22 \pm 1,6^*$
Больные с ФДЖ АХЗ ($n = 23$)	$4,0 \pm 0,1$	$96,0 \pm 1,0^*$	$77,7 \pm 1,2^*$	$24,0 \pm 0,5^*$	$5,0 \pm 1,6^*$	$21,2 \pm 1,4^{**}$	$2,7 \pm 1,1^*$	$24,6 \pm 0,6^*$

Примечание. Здесь и в табл. 3: RBC — эритроциты; HYPO — гипохромные эритроциты; MICRO — микроциты. Здесь и в табл. 2 и 3: * — различия показателей по сравнению с группой контроля статистически значимы ($p < 0,05$); ** — различия показателей по сравнению с группой контроля статистически значимы ($p < 0,01$).

ными маркерами, характеризующими железодефицитный эритропоэз, являются ФР, рРТФ в комплексе с клиническим анализом крови, особенно с определением среднего содержания гемоглобина в ретикулоците (RET-HE) [6 - 8]. Следует учитывать, что ФР не всегда может отражать истинный запас железа в организме и его доступность. ФР является острофазным белком, содержание которого может повышаться при острых и хронических воспалительных процессах, что дает неоднозначные результаты. В отличие от ФР концентрация рРТФ повышается при недостатке железа и существенно не изменяется при хронических болезнях. Таким образом, определение концентрации рРТФ наряду с ФР в значительной степени повышает точность лабораторного диагноза железодефицитного состояния даже у больных со злокачественными и сопутствующими хроническими заболеваниями. Однако традиционные методы исследования метаболизма железа (сывороточное железо, трансферрин, ФР, рРТФ, общая железосвязывающая способность (ОЖСС), RET-HE) не позволяют диагностировать

функциональный дефицит железа у онкологических больных.

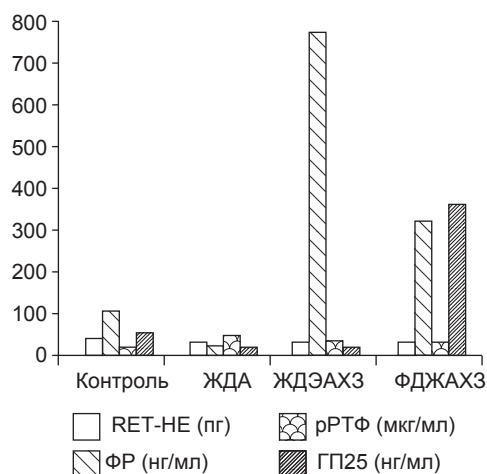
АС у онкологических больных имеет мультифакторное происхождение. Наиболее общим звеном патогенеза АС является участие провоспалительных цитокинов, которые индуцируют экспрессию гепатоцитами гормона гепсидина. В настоящее время считают, что основную роль в метаболизме железа играет гепсидин 25 (ГП25). ГП25 является 25-аминокислотным пептидом, который синтезируется в печени [9]. Экспериментально доказано, что ГП25 относится к отрицательным регуляторам метаболизма железа, при избытке железа его уровень значительно повышается, тем самым снижается всасывание и рециркуляция железа, при недостатке они снижаются. Железо экспортируется из тканей с помощью ферропортина — основного клеточного транспортера железа и рецептора для ГП25. Показано [10], что под воздействием ИЛ-6 ГП25 блокирует ферропортины и, следовательно, высвобождение железа макрофагами. Развивается функциональный

Таблица 2

Содержание ферритина, рРТФ, ГП25, ЭПО у пациентов с разными типами АС ($X \pm m$)

Группы	Число больных	Величина показателей	ФР, нг/мл	рРТФ, мкг/мл	ГП25, нг/мл	ЭПО, МЕ/мл	НЕАДЭПО, n (%)
Контроль	143	$X \pm m$	$97,9 \pm 15,8$	$0,9 \pm 0,08$	$4,3 \pm 0,7$	$15,4 \pm 3,7$	—
		Me	78,1	0,7	5,6	20,1	—
		Диапазон	34,6 - 234,1	0,3 - 1,1	0,5 - 7,5	3,7 - 35,3	—
Больные без АС	10	$X \pm m$	$176,2 \pm 47,4^*$	—	$40,0 \pm 13,3^{**}$	—	—
		Me	133	—	23	—	—
		Диапазон	28,2 - 165	—	7,5 - 100	—	—
Больные ЖДА	6	$X \pm m$	$13,9 \pm 1,9^{**}$	$3,8 \pm 0,6^{**}$	$1,0 \pm 0,4^{**}$	$62,6 \pm 29,8$	1 (16,6)
		Me	16	4,0	1	43	—
		Диапазон	4,7 - 18,8	2,5 - 5,4	0 - 1,7	3,2 - 160,5	—
Больные ЖДЭ АХЗ	7	$X \pm m$	$755,6 \pm 322,0^*$	$2,5 \pm 0,5^*$	$1,2 \pm 0,4^{**}$	$83,8 \pm 35,8$	2 (28,5)
		Me	309	3,0	1	78	—
		Диапазон	43,5 - 2229,3	1,3 - 3,7	0,04 - 2,6	10,8 - 227,7	—
Больные с ФДЖ АХЗ	23	$X \pm m$	$312,3 \pm 101,5^*$	$2,3 \pm 0,6^*$	$35,1 \pm 7,3^{**}$	$48,4 \pm 13,7$	19 (82,6)
		Me	124	2,0	25,5	18	—
		Диапазон	38,8 - 1596,4	0,1 - 9	4,9 - 100	3,2 - 216,5	—

Примечание. НЕАДЭПО — неадекватная продукция ЭПО степени АС.



Среднее содержание гемоглобина в ретикулоците, ФР, pРТФ, ГП25 (по оси ординат) у больных КР с разными типами АС (по оси абсцисс).

дефицит железа. Функциональным дефицитом железа называют ситуацию, когда, несмотря на достаточные его запасы, эритропоэз неадекватно обеспечивается железом. В периферической крови появляются эритроциты с низким объемом и гипохромией. Такая же картина отмечается при ЖДА, поэтому необходим дифференциально-диагностический критерий выявления АС с функциональным дефицитом железа. По предварительным данным, проведенным нами ранее, это может быть метод определения ГП25 [11]. В настоящее время проводится изучение новых лекарственных средств, мишенью которых являются основные патогенетические звенья АХЗ, в частности цитокины, корректоры ветви ИЛ-6 — гепсидин — ферропортин. Однако большая часть разработок находится в стадии экспериментальных исследований, другие — в разных стадиях клинических исследований [12].

Современные автоматические анализаторы крови дали объективную информацию о состоянии кроветворения больных. На основании клинического анализа крови были выделены 2 группы пациентов: 1-я с нормальными показателями красной крови ($n = 10$), 2-я с АС ($n = 36$).

Концентрация гемоглобина (HGB) в 1-й группе составила в среднем $143 \pm 13,0$ г/л при диапазоне 129 - 166 г/л, медиана (Me) - 140 г/л (табл. 1). Несмотря на

отсутствие АС у больных этой группы, у половины из них число гипохромных эритроцитов оказалось выше нормальных значений. Концентрация ФР и ГП25 составляла соответственно $176,2 \pm 47,4$ и $40,0 \pm 13,3$ нг (табл. 2), показатели значительно превышали норму, что свидетельствовало о нарушении метаболизма железа и не исключало начальную или предлатентную стадию АС у больных КР.

Больные с анемией 2-й группы имели одинаковые морфологические признаки эритроцитов крови, а именно микроцитоз ($MCV = 76,6 \pm 1,2$ фл) и гипохромия ($MCH = 23,5 \pm 0,5$ пг). Уровень HGB колебался от 79 до 118 г/л и в среднем по группе составил $76,6 \pm 12,1$ г/л, преобладали больные АС I и II степени тяжести. В анализаторах высшего класса возможно определение RET-HE. Это имеет важное диагностическое значение, так как в отличие от эритроцитов ретикулоциты характеризуются коротким сроком жизни. Они формируются и созревают в костном мозге за 1—2 дня, после чего покидают его и еще 1—3 дня дозревают в кровотоке [6]. Показатель RET-HE дает четкое представление о количестве гемоглобина во вновь поступающих из костного мозга эритроцитах. У пациентов с АС этот показатель в среднем по группе был низким ($23,8 \pm 0,6$ пг). В норме RET-HE колебался от 28 до 35 пг ($30,9 \pm 1,7$).

При анализе показателей ФР, pРТФ и ГП25 среди пациентов 2-й группы были выделены три типа АС (см. табл. 2). Первый тип — истинная ЖДА ($n = 6$; 16,6 %) с очень низкой ($13,9 \pm 1,9$ нг/мл) концентрацией ФР и высокой концентрацией pРТФ ($3,8 \pm 0,6$ мкг/мл). О ЖДА свидетельствовал и показатель ГП25, который был значительно ниже ($1,0 \pm 0,05$ нг/мл) нормы ($4,3 \pm 0,7$; $Me = 5,6$ нг/мл).

Второй тип ($n = 7$; 19,4%) АС был расценен как железodefицитный эритропоэз (ЖДЭ). Отличительной особенностью этой группы по сравнению с ЖДА была высокая концентрация ФР ($755,6 \pm 322,0$; $Me = 309$ нг/мл), которая значительно превышала норму ($97,7 \pm 15,8$; $Me = 78,1$ нг/мл) (см. табл. 2, рисунок). Возможно, это может свидетельствовать о переходе ЖДА в хроническую фазу АС. Несмотря на условно «большие запасы железа», ФР, являясь острофазным белком, вероятнее всего, необъективно отражал запасы железа. Уровень pРТФ был высоким, свидетельствуя о «железном голоде» эритрокариоцитов костного мозга. Концентрация pРТФ ($2,5 \pm 0,5$; $Me = 3$ мкг/мл) превышала верхнюю границу нормы ($0,9 \pm 0,08$; $Me =$

Таблица 3

Сравнительная оценка показателей красной крови у пациентов с разными стадиями заболевания ($X \pm m$)

Группы	Показатели							
	RBC, $\cdot 10^{12}/л$	HGB, г/л	MCV, фл	MCH, пг	MICRO, %	HYPO, %	RET, %	RET-HE, пг
Контроль ($n = 143$)	$4,5 \pm 3,7$	$146 \pm 7,3$	$87,3 \pm 5,5$	$28,9 \pm 1,7$	$0,5 \pm 0,04$	$0,7 \pm 0,1$	$0,91 \pm 0,4$	$30,9 \pm 1,7$
I–II стадия ($n = 9$)	$4,4 \pm 0,2$	$120,2 \pm 2,2^*$	$85,3 \pm 2,1$	$27,6 \pm 1,0$	$9,4 \pm 4,2^*$	$2,7 \pm 1,1^*$	$1,4 \pm 0,3$	$29,2 \pm 1,0$
III стадия ($n = 25$)	$4,2 \pm 0,1$	$105,0 \pm 5,0^*$	$76,4 \pm 2,2^*$	$24,7 \pm 0,7^*$	$15,8 \pm 1,8^*$	$6,7 \pm 2,4^*$	$2,4 \pm 1,0$	$25,4 \pm 0,8^*$
IV стадия ($n = 12$)	$4,3 \pm 0,1$	$97 \pm 4,0^{**}$	$74,6 \pm 1,8^{**}$	$22,6 \pm 0,7^{**}$	$27,5 \pm 2,7^{**}$	$15,4 \pm 6,2^{**}$	$1,3 \pm 0,1$	$23,6 \pm 1,0^{**}$

Таблица 4

Частота встречаемости различных типов АС у пациентов в зависимости от стадии заболевания

Группы	Без АС	ЖДА	ЖДЭ АХЗ	ФДЖ АХЗ
I-II стадия (<i>n</i> = 9)	5	1	3	—
III стадия (<i>n</i> = 25)	5	3	3	14
IV стадия (<i>n</i> = 12)	—	2	1	9
Всего ...	10	6	7	23

0,7 мкг/мл), но в меньшей степени, чем у пациентов с ЖДА. При этом среднее содержание гемоглобина в ретикулоците оказалось сниженным ($22 \pm 1,6$ пг), что свидетельствовало о ЖДЭ. Низкие показатели ГП25 ($1,2 \pm 0,4$ нг/мл) доказывали это.

АС третьего типа (табл. 3; см. рисунок) диагностирован у большинства (*n* = 23; 64%) больных. Как и у больных ЖДЭ концентрация RET-HE была низкой, ФР – высокой. Показатели рРТФ, как и в группе со вторым типом у больных ЖДЭ, превышали верхнюю границу нормы, что указывало на дефицит железа. Однако в отличие от второго типа АС с ЖДЭ выявлена очень высокая концентрация ГП25 ($35,1 \pm 7,3$ нг/мл), превышающая норму в десятки раз, что в большей степени свидетельствовало о функциональном дефиците железа на фоне АХЗ.

Большое значение для дифференциальной диагностики АС имеет определение ЭПО в плазме крови. ЭПО является ключевым регулятором эритропоэза. Неадекватно низкая продукция ЭПО по отношению к степени АС — характерная особенность АХЗ и в меньшей степени - ЖДА. Для оценки адекватности гормонального ответа на степень тяжести анемии у большинства больных АС определяли концентрацию эндогенного ЭПО. Анализируя уровень ЭПО, следует сказать, что его повышение отмечается при состоянии гипоксии. Среди больных АС (*n* = 36) повышение ЭПО более 100 МЕ/мл отмечено у 13 (36,2%) с при диапазоне от 57 до 227 МЕ/мл. У 23 (63,8%) больных ЭПО колебался от 3,2 до 43 МЕ/мл ($18,1 \pm 3,8$) при *Me* = 10,5 МЕ/мл, т.е. был неадекватным степени анемии. Как показало наше исследование (см. табл. 2), более низкая продукция ЭПО отмечалась у большинства (82,6%) больных с ФДЖ АХЗ, а, следовательно, у пациентов с распространенным опухолевым процессом (III - IV стадия), в меньшей степени (единичные случаи) - у пациентов с ЖДА и ЖДЭ.

Точное измерение уровней ЭПО в крови при ряде первичных и вторичных нарушений эритроэза имеет как диагностическое, так и терапевтическое значение. Что касается необходимости определения эндогенного ЭПО перед введением рекомбинантного человеческого ЭПО (рчЭПО), его адекватности при оценке положительного ответа, мы не согласны с рядом авторов [13, 14], которые считают, что это делать не обязательно. Наши исследования, проведенные ранее [15] на большом клиническом материале, свидетельствуют об обратном: только 70 - 78% пациентов имеют относительно низкий уровень ЭПО, у остальных

он более чем достаточный, иногда превышает норму в десятки раз. Есть ли необходимость вводить этой группе пациентов дополнительно рч-ЭПО? Вопрос дискуссионный.

Был проведен анализ частоты (см. табл. 3, 4) встречаемости различных типов АС в зависимости от стадии заболевания. Более глубокие изменения красной крови отмечались у пациентов с IV стадией (см. табл. 3). У пациентов этой группы выявлены самые низкие показатели красной крови (HGB, MCV, MCH, RET-HE), а число гипохромных и микроцитарных эритроцитов, напротив, было значительно выше по сравнению с предыдущими группами. Без анемии выявлены больные как с I-II, так и с III стадией (см. табл. 4). Случаи ЖДА и ЖДЭ встречались во всех группах в одинаковой степени. ФДЖ чаще всего наблюдался у пациентов с III - IV стадией.

Выводы. 1. У большинства (*n* = 36; 78,2%) больных КР еще до лечения выявляется АС. Особенностью АС является выраженный микроцитоз, гипохромия эритроцитов и низкое содержание RET-HE.

2. Чаще всего (*n* = 23; 64%) встречалась АХЗ с выраженным ФДЖ, которая сочеталась с относительно низким уровнем эндогенного ЭПО. Среди них преобладали пациенты с наиболее распространенным опухолевым процессом (III - IV стадия).

3. Для ФДЖ характерны гипохромия, микроцитоз эритроцитов и ретикулоцитов; нормальная или высокая концентрация ферритина; уровень растворимых рецепторов трансферрина выше нормы; концентрация ГП25 значительно превышает верхнюю границу нормы, чаще более 25 нг/мл. Уровень эндогенного ЭПО неадекватен степени тяжести анемии.

Абсолютный дефицит железа (ЖДА) выявлен у 6 (16,6%) больных, ЖДЭ на фоне АХЗ — у 7 (19,4%). У единичных больных ЖДА и ЖДЭ отмечался дефицит эндогенного ЭПО.

Для ЖДА характерны гипохромия, микроцитоз эритроцитов и ретикулоцитов; концентрация ферритина снижена; уровень растворимых рецепторов трансферрина значительно выше нормы; концентрация ГП25 снижена или в пределах нижней границы нормы.

Для ЖДЭ на фоне АХЗ характерны гипохромия, микроцитоз эритроцитов и ретикулоцитов; концентрация ферритина нормальная или высокая; уровень растворимых рецепторов трансферрина выше нормы, но в меньшей степени, чем у больных ЖДА; концентрация ГП25 снижена или в пределах нижней границы нормы.

Таким образом, определение уровня ГП25 в комплексе с другими традиционными методами, характеризующими АС (оценка уровня ферритина, растворимых рецепторов трансферрина, клинический анализ крови, определение RET-HE), позволяет провести более объективную оценку метаболизма железа. АС с микроцитарными, гипохромными характеристиками эритроцитов не всегда указывает на дефицит железа, а может свидетельствовать о функциональных нарушениях метаболизма железа на фоне хронических

болезней. Важно дифференцировать ЖДА, ЖДЭ от ФДЖ при АХЗ, так как подходы к лечению принципиально различаются.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп.2, 4, 5, 6, 9, 10, 12 см. REFERENCES)

1. Снеговой А.В., Ларионова В.Б., Манзюк Л.В., Кононенко И.Б. Анемии в онкологии: возможности поддерживающей терапии. *Клиническая онкогематология*. 2016; 3(9): 326—35.
3. Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Матвеева И.И. Новая концепция диагностики анемии с нарушением метаболизма железа. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина*. 2015-2016; 4-1 (26): 77—85.
7. Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н. Особенности метаболизма железа у онкологических больных. *Технология живых систем*. 2013; 10(5): 3—12.
8. Зубрихина Г.Н., Блиндарь В.Н., Матвеева И.И. Возможности современного автоматизированного клинического анализа крови в дифференциальной диагностике истинного и перераспределительного (функционального) дефицита железа при анемическом синдроме онкологических больных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 5: 21—5.
11. Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Матвеева И.И. Основные метаболиты феррокинетики в дифференциальной диагностике анемического синдрома. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(4): 219—23.
13. Рукавицын О.А. Актуальные вопросы диагностики и лечения анемии при хронических заболеваниях. *Клиническая онкогематология*. 2012; 5(4): 296—304.
15. Зубрихина Г.Н., Блиндарь В.Н., Матвеева И.И., Нестерова Ю.А. Анемический синдром у онкологических больных. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2009; 4 (6): 57 — 62.

REFERENCES

1. Snegovoj A.V., Larionova V.B., Manzjuk L.V., Kononenko I.B. Anemias in oncology: possibilities of the supporting therapy. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2016; 3(9): 326—35. (in Russian)
2. Beale A.L., Penney M.D., Allison M.C. The prevalence of iron defi-

- ciency among patients presenting with colorectal cancer. *Colorectal Disease*. 2005; 7(4): 398—402.
3. Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Matveeva I.I. New concept diagnosis of anemia. *Vestnik RONC. im. N.N. Blokhina*. 2015-2016; 4-1 (26): 77—85. (in Russian)
4. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu. Rev. Med.* 2011; 62: 347—60.
5. Coyne D. Hepcidin: clinical utility as a diagnostic tool and the therapeutic target. *Kidney Int.* 2011; 3(80): 240—9.
6. Brugnara C., Schiller B., Moran J. Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret-He) and assessment of iron-deficient states. *Clin. Laboratory Hematology*. 2006; 28(5): 303—8.
7. Blindar V.N., Zubrikhina G.N. Features of metabolism of iron at oncological patients. *Tekhnologiya zhivyyx sistem* 2013; 10(5): 3—12. (in Russian)
8. Zubrikhina G.N., Blindar V.N., Matveeva I.I. Possibilities of the modern automated clinical blood test in differential diagnostics of true and redistributive (functional) deficiency of iron at an anemic syndrome of oncologic patients. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 5: 21—5. (in Russian)
9. Pigeon C., Igin G., Courselaud A. A new mouse liverspecific protein homologous to human antibacterial peptid hepcidin is overexpressed during iron overload. *Journal Biological Chemistry*. 2001; 276: 7811—9.
10. Nemeth E., Rivera S, Gabajan V. IL6 mediates hypoferrremia inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *Journal Clinical Investigation*. 2004; 113(9): 1271—6.
11. Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Matveeva I.I. The main metabolites of a ferrokinetika in differential diagnostics of an anemic syndrome. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 4 (61): 219—23. (in Russian)
12. Nemeth E., Ganz T. Anemia of Inflammation. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2014 ; Aug; 28(4): 671—68.
13. Rukavitsyn O.A.. Topical issues of diagnostics and treatment of anemia at chronic diseases. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2012; 5(4): 296-304. (in Russian)
14. Schrijvers D., de Samblanx H., Roila F. Erythropoiesis-stimulating agents the treatment of anaemia in cancer patients: ESMO Clinical Practice for use. *Annals Oncology*. 2010; 21: 244—7.
15. Zubrikhina G.N., Blindar V.N., Matveeva I.I., Nesterova YU.A. Anemic syndrome at oncological patients. *Vestnik RONC. im. N.N. Blokhina*. 2009; 4 (6): 57 — 62. (in Russian)

Поступила 25.05.17

Принята к печати 31.05.17

КОАГУЛОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.111.7.083:615.38:614.2

Аюпова Р.Ф.¹, Султанбаев У.С.¹, Жибурт Е.Б.²

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИСТОРИЧЕСКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ В ОБСЛЕДОВАНИИ ДОНОРОВ

¹Республиканская станция переливания крови, 450106, Уфа;

²ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова», 105203, Москва

Историческая концентрация тромбоцитов – среднее трёх последовательных концентраций тромбоцитов до донорации (в течение двух лет) в крови доноров. Оценили характеристики исторической концентрации тромбоцитов относительно концентрации тромбоцитов в крови 99 регулярных доноров перед каждой донорацией аферезных тромбоцитов.

Установлено, что менее чем 20% дисперсия между исторической концентрацией тромбоцитов и значением, полученным в день донорации, наблюдается у 96% регулярных доноров.

Средняя концентрация тромбоцитов перед тремя последовательными донорациями аппаратного афереза у мужчин статистически значимо выше, чем у женщин: $235,2 \pm 6,7$ и $222,1 \pm 11,0$ ($\times 10^9$ клеток/л) соответственно ($p < 0,05$). Концентрация тромбоцитов не связана с интервалами между донорациями.

Нет статистически значимых отличий исторической концентрации тромбоцитов от концентрации тромбоцитов перед 4-й донорацией и в целом и между отдельными донорациями, причём как у мужчин, так и у женщин.

Целесообразно исследовать качество концентратов тромбоцитов, полученных по программе, учитывающей историческую концентрацию тромбоцитов.

Ключевые слова: тромбоциты, концентрат, переливание, донор, регулярный, донорация, концентрация тромбоцитов.

Для цитирования: Аюпова Р.Ф., Султанбаев У.С., Жибурт Е.Б. Возможность использования «исторической концентрации тромбоцитов» в обследовании доноров. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (2): 95-98.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-95-98>

Ayupova R.F.¹, Sultanbaev U.S.¹, Zhiburt E.B.²

THE POSSIBILITY OF APPLYING HISTORICAL CONCENTRATION OF THROMBOCYTES IN EXAMINATION OF DONORS

¹The Republican station of blood transfusion, 450106, Ufa, Russia

²The Federal State Budget Scientific Institution "The N.I. Pirogov National Medical Surgical Center", 105203, Moscow, Russia

The historical concentration of thrombocytes is an average of three subsequent concentrations of thrombocytes before donation (during two years) in blood of donors. The evaluation was applied to characteristics of historical concentration of thrombocytes concerning concentration of thrombocytes in blood of 99 regular donors before every donation of apheresis thrombocytes. It is established that less than 20% dispersion between historical concentration of thrombocytes and value obtained in day of donation is observed in 96% of regular donors. The average concentration of thrombocytes before three subsequent donations of apparatus apheresis in males is statistically higher than in females: $235,2 \pm 6,7$ and $222,1 \pm 11,0$ ($\times 10^9$ cells/l) correspondingly ($p < 0,05$). The concentration of thrombocytes has no relationship with intervals between donations. There is no statistically significant differences between historical concentration of thrombocytes and concentration of thrombocytes before fourth donation and in general and between separate donations both in males and females. It is appropriate to analyze quality of concentrates of thrombocytes received through program accounting historical concentration of thrombocytes.

Key words: thrombocytes; concentrate; transfusion; donor; regular; donation; concentration of thrombocytes.

For citation: Ayupova R.F., Sultanbaev U.S., Zhiburt E.B. The possibility of applying historical concentration of thrombocytes in examination of donors. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(2): 95-98. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-95-98>

For correspondence: Ayupova R.F., the deputy chief physician on common issues of the Republican station of blood transfusion. e-mail: ayupova63@yandex.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 20.10.2017
Accepted 25.10.2017

Для корреспонденции: Аюпова Рауля Фаязовна, зам. глав. врача по общим вопросам; e-mail: ayupova63@yandex.ru

Введение. Донорские тромбоциты, приготовленные методом афереза, переливают для коррекции глубокой тромбоцитопении. При программировании аппарата афереза тромбоцитов учитывают гематокрит и концентрацию тромбоцитов в крови донора. Как правило, аппаратный аферез выполняют у регулярных доноров. Традиционно концентрацию тромбоцитов в крови донора определяют непосредственно перед донацией [1–4].

Известно, что у регулярных и первичных доноров состояние тромбоцитарного звена гемопоэза существенно не различается [5]. Количество лейкоцитов и

тромбоцитов как у мужчин, так и у женщин в разных возрастных группах в целом остаётся стабильным, без значимых изменений [6].

Американское общество анестезиологов, стремясь избежать избыточных медицинских вмешательств, в первую очередь рекомендует не выполнять общий анализ крови перед операцией у пациентов без тяжёлой патологии и ожидаемой большой кровопотери [7].

Австралийцы лабораторные исследования и аферез проводят в разных организациях. Согласно инструкции к аппарату можно использовать исторические показатели концентрации тромбоцитов,

что снижает затраты и упрощает логистику донорства тромбоцитов. Внедрив эту стратегию в национальном масштабе, данные контроля качества концентратов тромбоцитов до внедрения (с 1 октября 2014 г. по 31 марта 2015 г.) сравнили с результатами, полученными в течение 6 мес после внедрения (с 1 октября 2015 г. по 31 марта 2016 г.). Средние исторические показатели концентрации тромбоцитов, используемые для программирования сбора тромбоцитов, также сравнивались с количеством тромбоцитов в день донации. Историческую концентрацию тромбоцитов рассчитали как среднее трёх результатов течение двух лет. Была поставлена цель – иметь для 90% образцов менее чем 20% дисперсию между исторической концентрацией тромбоцитов и значением, полученным в день донации. В указанные периоды количество тромбоцитов ($\times 10^9$) в дозе составило до внедрения инструкции $273,3 \pm 32,0$ ($n = 2639$), а после внедрения – $282,8 \pm 38,8$ ($n = 2689$) (непарный t-тест; $p < 0,001$). Более 95% результатов подсчёта тромбоцитов, полученных в день донации, изменились в пределах 20% от исторической оценки, при этом концентрация тромбоцитов в крови донора после донации была $> 140 \times 10^9 / \text{л}$. Удаление гематологических анализаторов из донорских центров и замена их использованием статистических средних показателей концентрации тромбоцитов привели к сокращению рабочей нагрузки в донорском центре, упрощению соблюдения нормативных требований и значительному снижению затрат, связанных со сбором тромбоцитов [8].

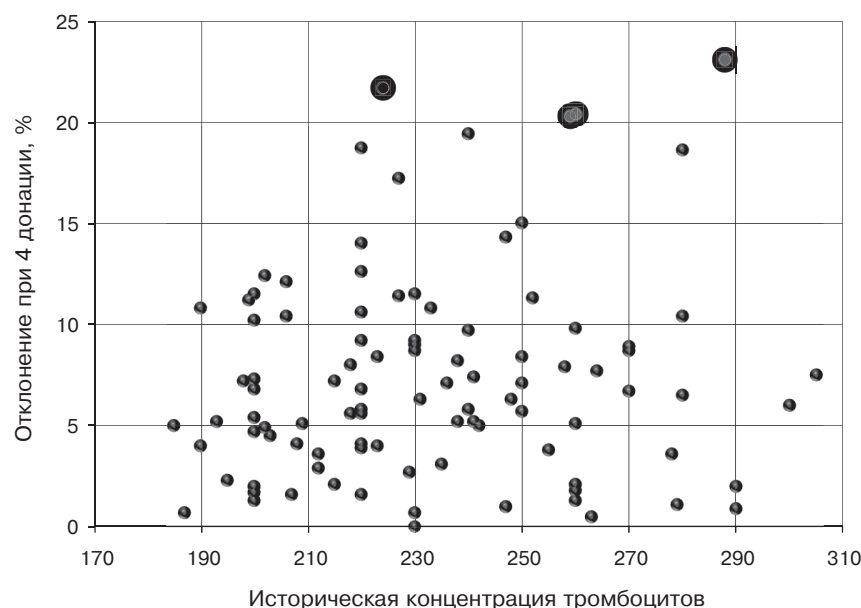


Рис. 1. Отклонение концентрации тромбоцитов от исторической концентрации.

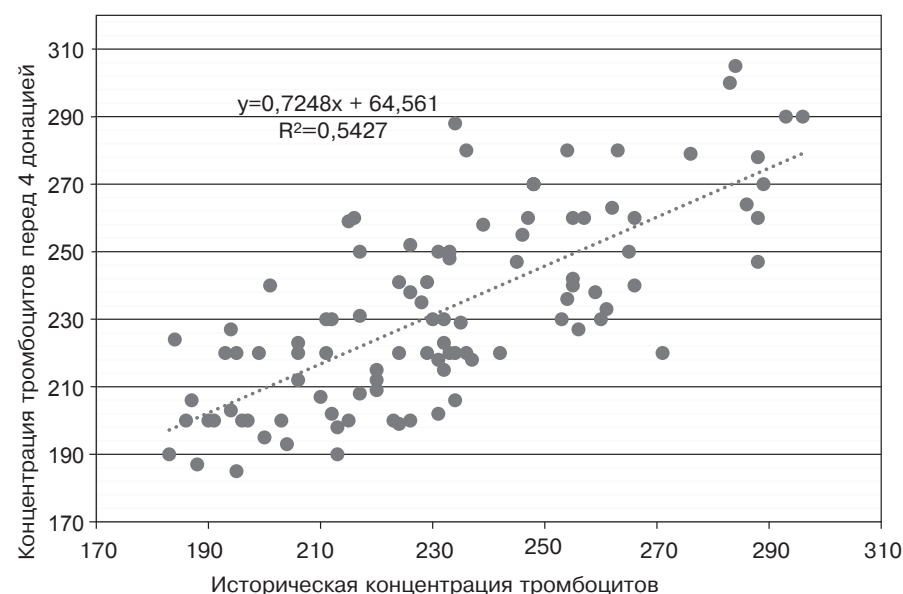


Рис. 2. Связь концентрации тромбоцитов перед 4-й донацией с исторической концентрацией тромбоцитов.

Таблица 1

Концентрация тромбоцитов перед донацией у регулярных доноров

Пол	Номер донации			
	1-я	2-я	3-я	4-я
Мужчины	237,0 (7,7)	237,8 (7,5)	234,7 (7,6)	233,9 (6,4)
Женщины	223,8 (14,7)	220,9 (11,0)	221,7 (11,8)	228,8 (12,4)
Оба пола	233,7 (6,8)	230,6 (6,3)	231,4 (6,4)	232,6 (5,6)

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 данные представлены в формате среднее (стандартное отклонение).

Таблица 2

Интервалы между донациями тромбоцитов у регулярных доноров (дни)

Пол	Интервал между донациями		
	1 и 2	2 и 3	3 и 4
Мужчины	87,0 (16,6)	92,0 (15,2)	86,9 (13,8)
Женщины	78,7 (22,2)	93,6 (33,4)	77,2 (17,7)
Оба пола	84,9 (13,5)	92,4 (13,8)	84,5 (11,1)

Таблица 3

Отклонение исторического контроля от реальной концентрации тромбоцитов у регулярных доноров

Показатель	Отклонение	
	концентрации клеток	доли концентрации, %
Мужчины	-1,2 (4,9)	7,7 (1,4)
Женщины	6,6 (7,5)	6,4 (2,3)
Оба пола	0,7 (4,1)	7,4 (1,0)

Цель исследования – оценить характеристики исторической концентрации тромбоцитов относительно концентрации тромбоцитов в крови регулярных доноров перед каждой донацией аферезных тромбоцитов.

Аналогично [8] приняли определение исторической концентрации тромбоцитов как среднее трёх последовательно определённых концентраций тромбоцитов до донации (в течение 2 лет) в крови доноров аппаратного афереза тромбоцитов.

Материал и методы. Оценили концентрацию тромбоцитов у 99 (74 мужчин и 25 женщин) регулярных доноров Уфы в 2015–2016 гг.

Концентрацию клеток в венозной крови оценивали перед каждой из четырёх последовательных донаций.

Образцы крови получали согласно рекомендациям [9].

Концентрацию тромбоцитов в венозной крови определяли на гематологическом анализаторе Swelab Alfa Basic (Boule Medical AB, Швеция). Далее концентрация тромбоцитов будет выражена как $n \times 10^9/\text{л}$.

Аферез тромбоцитов выполняли с использованием сепаратора клеток Naemonetics MCS+ (США), как описано ранее [10–15].

Результаты исследовали с использованием дескриптивных статистик, корреляционного и регрессионного анализа при уровне значимости 0,05.

Результаты. Установлено, что концентрация тром-

боцитов перед четвёртыми донациями не различалась как у мужчин и женщин, так и между отдельными донациями (табл. 1). Средняя концентрация перед первыми тремя донациями составила $231,9 \pm 5,7$. При этом у мужчин показатель статистически значимо не много, но выше, чем у женщин: $235,2 \pm 6,7$ и $222,1 \pm 11,0$ соответственно (t -критерий $-1,989$ при критическом значении 1, 985; $p < 0,05$).

Интервалы между донациями не отличалась как у мужчин и женщин, так и между отдельными донациями (табл. 2). Не выявлено никакой связи концентрации тромбоцитов с интервалами между донациями.

Нет статистически значимых отличий исторической концентрации тромбоцитов от концентрации тромбоцитов перед 4-й донацией у мужчин и женщин, а также между отдельными донациями (табл. 3).

Лишь у четырёх доноров концентрация тромбоцитов отклонилась более чем на 20 % от исторической (рис. 1).

Концентрация тромбоцитов перед 4-й донацией с высокой силой прямо коррелирует с исторической концентрацией тромбоцитов (коэффициент корреляции Пирсона 0,737 при критическом значении 0,198, $p < 0,001$) (рис. 2).

Итальянские коллеги, изучив в 2001–2010 гг. 170 238 результатов исследования концентрации тромбоцитов у 16 422 доноров установили значимое статистически, но не клинически увеличение этого показателя в декабре–феврале на 3,4 % [16].

Также следует учесть, что в России нижней границей нормальной концентрации тромбоцитов считают 180^1 , тогда как в других странах-членах Совета Европы к аферезу тромбоцитов допускают доноров с концентрацией клеток не менее 150^2 .

Закключение. Установлено, что менее чем 20% дисперсия между исторической концентрацией тромбоцитов и значением, полученным в день донации, наблюдается у 96% регулярных доноров.

Средняя концентрация тромбоцитов перед тремя последовательными донациями аппаратного афереза у мужчин статистически значимо выше, чем у женщин: $235,2 \pm 6,7$ и $222,1 \pm 11$ соответственно ($p < 0,05$).

Концентрация тромбоцитов не связана с интервалами между донациями.

Нет статистически значимых отличий исторической концентрации тромбоцитов от концентрации тромбоцитов перед 4-й донацией у всех доноров, у мужчин и женщин, а также между отдельными донациями.

Целесообразно исследовать качество концентратов тромбоцитов, полученных по программе, учитывающей историческую концентрацию тромбоцитов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

¹Приказ Минздрава России от 14 сентября 2001 г. № 364 «Об утверждении порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов».

²Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 19th edn. - Council of Europe Publishing, Strasbourg. - 2017.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жибурт Е.Б., Мадзаев С.Р. *Заготовка и переливание тромбоцитов*. М.: РАЕН; 2013.
2. Мадзаев С.Р., Губанова М.Н., Буркибаев Ж.К., Кузьмин Н.С., Жибурт Е.Б. Новое в доказательном переливании тромбоцитов. *Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И.Пирогова*. 2013;8(4):57-8.
3. Зарубин М.В., Губанова М.Н., Гапонова Т.В., Парамонов И.В., Мадзаев С.Р., Хальзов К.В. и др. Обеспечение эффективности и безопасности переливания тромбоцитов. *Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И.Пирогова*. 2016;11(3):118-25.
4. Pietersz R.N., Reesink H.W., Panzer S., Gilbertson M.P., Borosak M.E., Wood E.M. et al. Prophylactic platelet transfusions. *Vox Sang*. 2012;103(2): 159-76.
5. Тропская М.С., Луговская С.А., Данилова Е.М., Волкова Е.Н. Тромбоцитарные показатели периферической крови доноров, полученные на гематологическом анализаторе Advia 120. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 9: 73-4.
6. Казакова М.С., Луговская С.А., Долгов В.В. Референсные значения показателей общего анализа крови взрослого работающего населения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 6: 43-9.
7. American Society of Anesthesiologists. Five Things Physicians and Patients Should Question// <http://www.choosingwisely.org/societies/american-society-of-anesthesiologists/> [по состоянию на 31.07.2017].
8. Mondy P.J., Hirani R., Peberdy J. Can "historical donor platelet counts" results be used for programming platelet donation? *Vox Sang*. 2017; 112(Suppl. 1): 113.
9. Мамаев А.Н., Гильманов А.Ж., Вавилова Т.В., Момот А.П. Преаналитический этап исследования системы гемостаза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 4: 35-8.
10. Султанбаев У.С., Аюпова Р.Ф., Стрельникова Е.В., Салихова А.К., Батурина Г.А., Мусин А.Г., Жибурт Е.Б. Заготовка и обеспечение безопасности донорских тромбоцитов в Республике Башкортостан. *Трансфузиология*. 2015;16(2):16-21.
11. Губанова М.Н., Аюпова Р.Ф., Жибурт Е.Б. Полиморфизм заготовки, применения и эффективности концентратов донорских тромбоцитов. *Анестезиология и реаниматология*. 2017; 62(1): 77-9.
12. Аюпова Р.Ф., Султанбаев У.С., Жибурт Е.Б. Эффективность множественных переливаний тромбоцитов. *Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа*. 2017; 1:30-7.
13. Аюпова Р.Ф., Султанбаев У.С., Жибурт Е.Б. Нагрузка на службу крови медицинских учреждений в зависимости от объёмов тромбоцитотерапии по дням недели. *Менеджер здравоохранения*. 2017; 4: 36-41.
14. Давыдова Л.Е., Губанова М.Н., Аюпова Р.Ф., Зарубин М.В., Гапонова Т.В., Парамонов И.В. и др. Переливание донорских тромбоцитов. *Якутский медицинский журнал*. 2017;58(2):41-5.
15. Аюпова Р.Ф., Султанбаев У.С., Жибурт Е.Б., Жерносенко А.О. Эффективность переливания патогенредуцированных тромбоцитов взрослым пациентам. *Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И.Пирогова*. 2017;12(2):72-4.
16. Gallerani M., Reverberi R., Salmi R., Smolensky M.H., Manfredini R. Seasonal variation of platelets in a cohort of Italian blood donors: a preliminary report. *Eur. J. Med. Res*. 2013;18:31.

REFERENCES

1. Zhiburt E.B., Madzaev S.R. *Platelets collection and transfusion [Zagotovka i perelivanie trombocitov]*. Moscow: RAEN; 2013. (in Russian)
2. Madzaev S.R., Gubanova M.N., Burkitbaev Zh.K., Kuz'min N.S., Zhiburt E.B. New in evidence-based platelet transfusion. *Vestnik Natsional'nogo mediko-khirurgicheskogo tsentra im. N.I.Pirogova*. 2013;8(4):57-8. (in Russian)
3. Zarubin M.V., Gubanova M.N., Gaponova T.V., Paramonov I.V., Madzaev S.R., Hal'zov K.V. et al. Support for platelet transfusion effectiveness and safety. *Vestnik Natsional'nogo mediko-khirurgicheskogo tsentra im. N.I.Pirogova*. 2016;11(3):118-25. (in Russian)
4. Pietersz R.N., Reesink H.W., Panzer S., Gilbertson M.P., Borosak M.E., Wood E.M. et al. Prophylactic platelet transfusions. *Vox Sang*. 2012;103(2): 159-76.
5. Trop'skaja M.S., Lugovskaja S.A., Danilova E.M., Volkova E.N. Donor peripheral blood platelet indicators received with Advia 120 blood analyser. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2008; 9: 73-4. (in Russian)
6. Kazakova M.S., Lugovskaja S.A., Dolgov V.V. Reference indexes of common blood count for adult population. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 6: 43-9. (in Russian)
7. American Society of Anesthesiologists. Five Things Physicians and Patients Should Question// <http://www.choosingwisely.org/societies/american-society-of-anesthesiologists/> [according at 31.07.2017].
8. Mondy P.J., Hirani R., Peberdy J. Can "historical donor platelet counts" results be used for programming platelet donation? *Vox Sang*. 2017; 112(Suppl. 1): 113.
9. Mamaev A.N., Gil'manov A.Zh., Vavilova T.V., Momot A.P. Preanalytical step of hemostasis evaluation. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2011; 4: 35-38 (in Russian)
10. Sultanbaev U.S., Ayupova R.F., Strel'nikova E.V., Salihova A.K., Baturina G.A., Musin A.G., Zhiburt E.B. Donor platelet collection and safety in the Republic of Bashkortostan. *Transfuziologiya*. 2015;16(2):16-21. (in Russian)
11. Gubanova M.N., Ayupova R.F., Zhiburt E.B. Polymorphism of collection, use and effectiveness of the donor platelet concentrates. *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 2017; 62(1): 77-9. (in Russian)
12. Ayupova R.F., Sultanbaev U.S., Zhiburt E.B. Effectiveness of the multiple platelet transfusions. *Gematologiya. Transfuziologiya. Vostochnaya Evropa*. 2017; 1:30-7. (in Russian)
13. Ayupova R.F., Sultanbaev U.S., Zhiburt E.B. Press to the hospital blood service in dependence from volumes of platelet therapy according week days. *Menedzher zdavoohraneniya*. 2017; 4: 36-41. (in Russian)
14. Davydova L.E., Gubanova M.N., Ayupova R.F., Zarubin M.V., Gaponova T.V., Paramonov I.V. et al. *Platelet blood transfusion. Yakutskiy meditsinskij zhurnal*. 2017;58(2):41-5. (in Russian)
15. Ayupova R.F., Sultanbaev U.S., Zhiburt E.B., Zhernosenko A.O. Efficacy of pathogenreduced platelets transfusions to adult patients. *Vestnik Natsional'nogo mediko-khirurgicheskogo tsentra im. N.I.Pirogova*. 2017;12(2):72-4. (in Russian)
16. Gallerani M., Reverberi R., Salmi R., Smolensky M.H., Manfredini R. Seasonal variation of platelets in a cohort of Italian blood donors: a preliminary report. *Eur. J. Med. Res*. 2013;18:31.

Поступила 20.10.17

Принята к печати 25.10.17

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.11:579.252.55].083.1

Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Маянский Н.А.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАРБАПЕНЕМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Минздрава РФ, 119991, Москва

Pseudomonas aeruginosa принадлежит к числу лидирующих оппортунистических патогенов. Оценка чувствительности госпитальных изолятов *P. aeruginosa* к антибиотикам является важным этапом в борьбе с синегнойной патологией.

Цель работы – подтверждение диагностической эффективности масс-спектрометрического подхода для оценки карбапенемазной активности у клинических изолятов *P. aeruginosa*.

Исследования были направлены на выявление карбапенемаз у 50 клинических изолятов *P. aeruginosa*, нечувствительных к карбапенемам (контрольная группа – 9 изолятов *P. aeruginosa*, чувствительных к карбапенемам). Проведено сравнение результатов, полученных посредством лазерной десорбционно-ионизационной время-пролетной масс-спектрометрии (МАЛДИ-ВП МС) и при помощи известных методик – фенотипического определения наличия металло-бета-лактамаз (МБЛ) при помощи E-тестов и определения наличия генов карбапенемаз (VIM, IMP, NDM) при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

У 14 (28%) из 50 нечувствительных к карбапенемам штаммов была выявлена МБЛ-активность, все они несли гены карбапенемаз VIM-типа. Гены *imp* и *ndm* не были найдены ни у одного штамма. Гены *vim* были найдены только у МБЛ-позитивных штаммов, МБЛ-активность регистрировалась только у носителей генов *vim*. По данным МАЛДИ-ВП МС все МБЛ- и VIM-позитивные штаммы демонстрировали повышенную способность гидролизовать меропенем. Процент гидролиза при тестировании данных штаммов составлял от 7,6 до 59,3. Отсутствие карбапенемазной активности демонстрировали 36 (72%) из 50 нечувствительных к карбапенемам штаммов с процентом гидролиза от 0 до 4. Ни один из 9 контрольных чувствительных к карбапенемам изолятов не обладал МБЛ-активностью, не был носителем исследованных генов карбапенемаз и не гидролизировал меропенем.

МАЛДИ-ВП МС является перспективным методом для использования в практике клинической микробиологии для выявления изолятов *P. aeruginosa*, продуцирующих карбапенемазы.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, карбапенемы, карбапенемазы, масс-спектрометрия.

Для цитирования: Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Маянский Н.А. Масс-спектрометрическая оценка карбапенемазной активности *Pseudomonas aeruginosa*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (2): 99-105. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-99-105>

Bocharova Yu.A., Chebotar I.V., Kryzhanovskaya O.A., Mayansky N.A.

THE MASS-SPECTROMETRIC EVALUATION OF CARBAPENEMASE ACTIVITY OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA

The Federal State Autonomous Institution "The National Scientific Practical Center of Children Health" of Minzdrav of Russia, 119991, Moscow, Russia

The Pseudomonas aeruginosa is among number of leading opportunistic pathogens. The evaluation of sensitivity of hospital isolates of *P. aeruginosa* to antibiotics is an important stage in the struggle with *Pseudomonas sepsis* pathology.

The purpose of study is to confirm diagnostic efficiency of mass spectrometry approach in evaluation of carbapenemase activity in clinical isolates of *P. aeruginosa*. The study was targeted to detection of carbapenemases in 50 clinical isolates of *P. aeruginosa*, non-sensitive to carbapenemas (control group - 9 isolates of *P. aeruginosa* sensitive to carbapenemas). The comparative analysis was implemented concerning the results obtained using laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and using such common techniques as phenotype detection of presence of metallo-beta-lactamase using E-tests and detection of presence of genes of carbapenemases (VIM, IMP, NDM) using polymerase chain reaction in real-time.

The metallo-beta-lactamase activity was established in 14 (28%) out of 50 non-sensitive to carbapenemas strains. All of them had genes of carbapenemases VIM-type. No IMP and NDM genes were detected in any strain. The VIM genes were detected only in metallo-beta-lactamase positive strains and metallo-beta-lactamase activity was registered only in carriers of VIM genes. According data of MALDI-TOF, all metallo-beta-lactamase and VIM positive strains demonstrated increased capacity of hydrolyzing meropenem. The percentage of hydrolysis under testing of the given strains made up to from 7.6 to 59.3. The absence of carbapenemase activity was demonstrated by 36 (72%) out of 50 strains non-sensitive to carbapenemas with percentage of hydrolysis from 0 to 4. None of 9 control isolates sensitive to carbapenemas had metallo-beta-lactamase activity, carried analyzed genes of carbapenemas and hydrolyzed meropenem. The MALDI-TOF mass spectrometry is a perspective technique to be applied in practice of clinical microbiology for detect isolates of *P. aeruginosa*, producing carbapenemases.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; carbapenemas; carbapenems; mass spectrometry.

Для корреспонденции: Чеботарь Игорь Викторович, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. лаборатории микробиологии; e-mail: nizarnn@yandex.ru

For citation: Bocharova Yu.A., Chebotar I.V., Kryzhanovskaya O.A., Mayansky N.A. The mass-spectrometric evaluation of carbapenemase activity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic)* 2018; 63(2): 99-105. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-99-105>

For correspondence: Chebotar I.V., doctor of medical sciences, leading researcher of the laboratory of microbiology, e-mail: nizarnn@yandex.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 29.09.2017
Accepted 18.10.2017

Введение. Угроза, исходящая от одного из главных оппортунистических возбудителей, *Pseudomonas aeruginosa*, обусловлена не только его мощным патогенетическим потенциалом [1]. Госпитальные штаммы *P. aeruginosa* обладают исключительной способностью приобретать резистентность к разным группам антибиотиков, включая такие высокоэффективные препараты, как карбапенемы [2]. Одним из основных механизмов формирования карбапенемрезистентности *P. aeruginosa* является ферментативная инактивация антибиотика с помощью особых бета-лактамаз – карбапенемаз. Карбапенемазы – ферменты, которые гидролизуют пенициллины, карбапенемы и в различной степени цефалоспорины и монобактамы [3].

Согласно мировой статистике, до 40% карбапенеморезистентных штаммов *P. aeruginosa* являются продуцентами карбапенемаз [4, 5]. У *P. aeruginosa* чаще встречаются карбапенемазы IMP, VIM, NDM, относящиеся к металло-бета-лактамазам (МБЛ) [6, 7]. В России в 2013–2014 гг. МБЛ-позитивные штаммы *P. aeruginosa* составили 21,3% [8]. В странах СНГ – России, Беларуси и Казахстане – МБЛ-позитивные штаммы *P. aeruginosa* продуцируют карбапенемазу VIM-2 (99,6 %), реже (0,4 % штаммов) несут IMP-карбапенемазу [9]. Выявление штаммов-продуцентов карбапенемаз является крайне важным для клинической медицины, так как знание механизма резистентности даёт возможность для назначения адекватной антибиотикотерапии.

Подходы для детекции карбапенемаз можно условно разделить на генетические, фенотипические и аналитические [10]. Генетические подходы подразумевают выявление генов карбапенемаз с помощью различных видов ПЦР и секвенирования [11, 12]. Они позволяют быстро и надёжно определить наличие генов карбапенемаз и их типовую принадлежность. Недостаток генетических методов заключается в том, что наличие гена не гарантирует экспрессии признака. Это доказывается рядом наблюдений, в которых бактерии, несущие ген карбапенемазы, фенотипически могут быть чувствительными к карбапенемам [13]. Фенотипические подходы (модифицированный тест Ходжа, СИМ-тест, МБЛ-Е-тест и др.) просты для выполнения, но требуют больше времени для получения результата. К сожалению, они не позволяют расшифровать тип карбапенемазы, а некоторые из них (модифицированный тест Ходжа и биохимическое определение карбапенемаз, выполняемое на баканализаторах) характеризуются большой вероятностью ошибки [14–16]. Аналитическая группа методов

включает в себя электрофокусирование, иммунохроматографию и способы, основанные на выявлении продуктов гидролиза карбапенемов (Carba NP-тест, УФ-спектрометрия и масс-спектрометрия) [17–19]. Весьма перспективной технологией оценки гидролиза карбапенемов является матрично-активированная лазерная десорбционно-ионизационная время-пролетная масс-спектрометрия (МАЛДИ-ВП МС) [20]. Выявление продуцентов карбапенемаз с помощью масс-спектрометрии основано на оценке пиков, специфичных для нативных и гидролизированных форм карбапенемов после инкубации исследуемого штамма с антибиотиком. Известно большое число исследований по масс-спектрометрической детекции карбапенемаз энтеробактерий, которые показали хорошо воспроизводимые результаты [21, 22]. Более сложная ситуация складывается при выявлении карбапенемаз у *P. aeruginosa*. Разные авторские коллективы предлагают различные условия эксперимента, изменяя состав растворов, в которых происходит гидролиз, время реакции и даже тип матрицы для масс-спектрометрии [23–25]. Однако хорошо воспроизводимой методики так и не было предложено. Это говорит о необходимости оптимизации МС-технологии выявления карбапенемаз у *P. aeruginosa* для создания чувствительного, специфичного, хорошо воспроизводимого и простого в исполнении метода.

Цель настоящей работы – подтверждение диагностической эффективности масс-спектрометрического подхода для оценки карбапенемазной активности у клинических изолятов *P. aeruginosa*.

Материал и методы. Для исследования были использованы штаммы *P. aeruginosa* из коллекции лаборатории микробиологии ФГАУ «ННПЦЗД» Минздрава России, собранной в 2012–2015 гг. Штаммы были выделены от пациентов по принципу «один пациент – один (первый по времени) изолят». Критерием включения в исследование была нечувствительность (резистентность или промежуточная чувствительность) хотя бы к одному из тестируемых карбапенемов – меропенему и имипенему. Оценка чувствительности каждого штамма проведена при помощи Е-тестов в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя (Bio-Rad). Было отобрано 50 штаммов, для которых минимальная подавляющая концентрация (МПК) была > 2 мг/л для меропенема и > 4 мг/л для имипенема. Интерпретация чувствительности соответствовала критериям Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам (The European Commit-

tee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)) и национальным клиническим рекомендациям [26, 27]. Для контроля были использованы 8 чувствительных к карбапенемам госпитальных штаммов (МПК меропенема ≤ 2 мг/л, имипенема ≤ 4 мг/л), отобранных из коллекции по принципу случайной выборки, и один референс-штамм ATCC 27853. Штаммы были изолированы из образцов, полученных в ходе проведения плановых диагностических процедур, предусмотренных локальными стандартными протоколами. Видовая идентификация выполнена на основе рутинных микробиологических методов и МАЛДИ-ВП МС с помощью прибора Microflex и программного обеспечения MALDI Biotyper RTC 3.1 (Bruker Corp.).

Наличие генов карбапенемаз VIM, IMP и NDM определяли при помощи коммерческих наборов «АмплиСенс MDR MBL-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Для фенотипического выявления наличия МБЛ проведен МБЛ-Е-тест в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя (BioMérieux). Наличие МБЛ считалось установленным в случае 8-кратного уменьшения МПК имипенема на секторе тест-полоски, содержащем ингибитор МБЛ этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА).

Для определения наличия карбапенемаз с помощью МАЛДИ-ВП МС использовали суточную культуру *P. aeruginosa*, выращенную на агаре Мюллера-Хинтона. Материал, собранный бактериологической петлей (1 мкл) из одной колонии (диаметр 1,5–3,0 мм), добавляли к 0,2 мл базового раствора (фосфатный буфер, pH 7,2; ZnCl₂ (0,01 мг/мл); меропенем (1 мг/мл)), тщательно вортиксовали. Процедуру повторяли с тремя колониями данного изолята. Раствор с тестируемым штаммом и антибиотиком инкубировали при 37°C в течение 3 ч при встряхивании (240 колебаний в минуту), после чего останавливали реакцию добавлением эквивалентного объема ацетонитрила. В качестве негативного контроля использовали 0,2 мл базового раствора меропенема без добавления бактерий. Затем раствор центрифугировали, надосадочную жидкость помещали на мишень. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (ДНВ – от англ. 2,5-dihydroxybenzoic Acid) в концентрации 10 мг/мл в 50% растворе метанола. Спектры снимали на приборе Microflex (Bruker) в диапазоне 100–1000 Да. Масс-спектры обрабатывали с помощью программного обеспечения flexAnalysis 3.3 (Bruker). Учитывали значения интенсивности пиков нативного антибиотика, m/z = 384, 406, 428, и пиков продуктов его гидролиза – m/z = 358, 380. Процент гидролиза рассчитывали по формуле:

$$\text{ПГ} = \frac{\text{ППГ}}{(\text{ППГ} + \text{ПНА})} \times 100 - \text{ПГНК},$$

где ПГ – процент гидролиза, ППГ – сумма интенсивностей пиков продуктов гидролиза, ПНА – сумма интенсивностей пиков нативного антибиотика, ПГНК – процент гидролиза в негативном контроле (базовый

Характеристика нечувствительных к карбапенему изолятов *P. aeruginosa* в зависимости от отношения к гидролизу меропенема

Характеристика	Гидролиз- позитивные штаммы (n = 14)	Гидролиз- негативные штаммы (n = 36)
МБЛ-позитивные	14/14	0/36
VIM-позитивные	14/14	0/36
Диапазон гидролиза, %	7,6–59,3	0–4
Медиана гидролиза (25; 75 процентиль),%	12 (11; 15,5)	0 (0; 1,3)

раствор меропенема без бактерий).

Все эксперименты повторялись трижды. Статистическую обработку результатов, отражающих гидролиз меропенема, проводили при использовании программного пакета Statistica 6.0.

Результаты. МБЛ-Е-тест выявил наличие МБЛ у 14 изолятов (МБЛ-позитивные изоляты), что составило 28% от всех чувствительных к карбапенему штаммов (см. таблицу). Все МБЛ-позитивные изоляты несли ген карбапенемазы из группы VIM (VIM-позитивные изоляты). Гены *imp* и *ndm* не были найдены ни у одного штамма. У остальных 36 нечувствительных к карбапенему МБЛ-негативных штаммов не было обнаружено генов карбапенемаз (см. таблицу). Все чувствительные штаммы из контрольной группы (n = 9) показали отрицательные результаты в тестах на МБЛ и не несли генов *vim*, *imp* и *ndm*.

Процент гидролиза меропенема при тестировании всей выборки штаммов при помощи МАЛДИ-ВП МС составил от 0 до 59,3% и значимо различался ($p < 0,001$) между группами МБЛ/VIM-позитивных и МБЛ/VIM-негативных изолятов (рис. 1; см. таблицу).

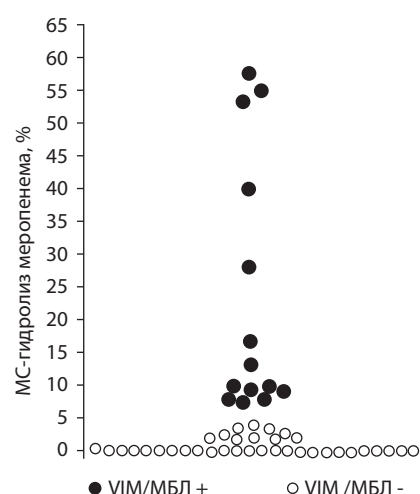


Рис. 1. Гидролиз меропенема в присутствии нечувствительных к карбапенемам изолятов *P. aeruginosa*, несущих МБЛ и vim-ген (черные круги) и не обладающих МБЛ и vim (белые круги).

По оси ординат – относительная интенсивность гидролиза, рассчитанная по специальному алгоритму (см. текст).

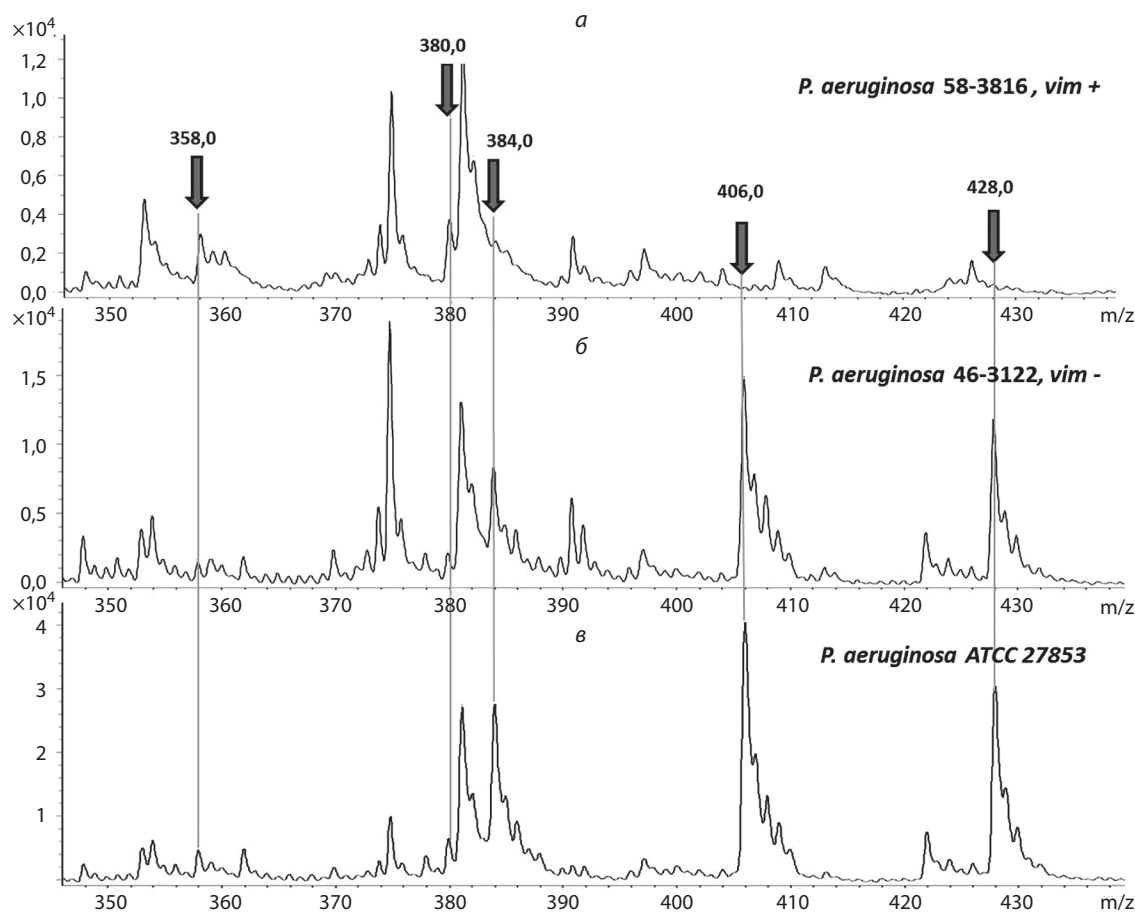


Рис. 2. Масс-спектры: *а* – резистентного к карбапенему гидролиз-положительного и МБЛ/VIM-положительного штамма *P. aeruginosa* 58-3816; *б* – резистентного к карбапенему гидролиз-негативного и МБЛ/VIM-негативного штамма *P. aeruginosa* 46-3122; *в* – чувствительного референс-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853.

По оси абсцисс – отношение массы ионизированных пептидов к их заряду (m/z) в диапазоне 346–440; по оси ординат – интенсивность пиков. Стрелками обозначены масс-пики продуктов гидролиза меропенема ($m/z = 358, 380$) и масс-пики нативного меропенема ($m/z = 384, 406, 428$).

В первой группе процент гидролиза колебался в диапазоне 7,6–59,3 (см. таблицу). Типовая картина масс-спектров МБЛ/VIM-положительных штаммов характеризовалась снижением пиков нативного меропенема ($m/z = 384, 406, 428$) и появлением пиков гидролизованного меропенема ($m/z = 358, 380$) (рис. 2, *а*), что свидетельствовало об их выраженной меропенем-гидролизующей активности (гидролиз-положительные изоляты).

В группе МБЛ/VIM-негативных нечувствительных к карбапенемам штаммов процент гидролиза меропенема не превышал 4 (см. таблицу и рис. 1). Масс-спектрограммы этих штаммов отличались наличием высоких пиков нативного меропенема ($m/z = 384, 406, 428$) и отсутствием (или малой интенсивностью) пиков гидролизованного меропенема (рис. 2, *б*), что дало повод отнести их в разряд гидролиз-негативных штаммов. Ни один из контрольных чувствительных к карбапенемам изолятов не проявлял карбапенемной активности: процент гидролиза также находился в диапазоне 0–4,0, они не демонстрировали снижения интенсивности пиков нативного меропенема и увели-

чения пиков гидролиза меропенема (рис. 2, *в*). Между максимальными показателями гидролиза меропенема (4,0%) у МБЛ/VIM-негативных изолятов и минимальными значениями (7,6%) у МБЛ/VIM-положительных штаммов регистрировался разрыв (см. рис. 1).

Обсуждение. Хотя масс-спектрометрия и признана надёжным инструментом для детекции бета-лактамаз у отдельных групп бактерий, её эффективность для определения карбапенемаз у *P. aeruginosa* до настоящего времени оставалась под сомнением. Некоторые методики, успешные для исследования энтеробактерий, оказываются неподходящими для тестирования *P. aeruginosa*. Примером этого является масс-спектрометрическая оценка карбапенемаз в работе A. Johansson и соавт., которые использовали эртапенем в качестве индикаторного карбапенема, а α -циано-4-гидроксикоричную кислоту – в качестве матрицы. С помощью этой методики были безошибочно выявлены все изоляты *K. pneumoniae*, продуцировавшие карбапенемазы KPC, VIM и NDM [24]. Использование предлагаемого метода для изучения *P. aeruginosa* не дало удовлетворительных резуль-

татов: лишь у 6 из 11 VIM-продуцирующих изолятов были получены положительные ответы [24]. Следовательно, для оптимизации методики МС-оценки карбапенемазной активности *P. aeruginosa* требуется дополнительный подбор условий анализа, касающийся антибиотика-индикатора и его концентрации, времени инкубации и выбора матрицы для МАЛДИ-ВП МС.

В настоящей работе мы оптимизировали МС-детекцию карбапенемазной активности у *P. aeruginosa*, объединив методику J. Hrabak и соавт. и статистическую обработку результатов С. Monteferrante и соавт. [23, 28]. В первой из этих работ было установлено, что оптимальным антибиотиком-индикатором карбапенемзависимого гидролиза для *P. aeruginosa* является меропенем, а оптимальной матрицей – DHB. Выбор матрицы связан с тем, что целевые пики нативного меропенема и продуктов его гидролиза скрываются шумами, создаваемыми сигналами стандартной матрицы для масс-спектрометрии – α -циано-4-гидроксикоричной кислоты. Матрица DHB не создает шумов, критично маскирующих целевые пики. Однако, как установили авторы метода, при данных условиях возникают единичные случаи ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Следовательно, учёт наличия/отсутствия сигналов нативного антибиотика и продуктов его гидролиза не позволяет правильно оценить карбапенемазную активность тестируемых штаммов, требуя дополнительной статистической обработки сигналов. Такая обработка была предложена С. Monteferrante и соавт. для оценки бета-лактамазной активности энтеробактерий [28].

Исследования, проведённые в соответствии с нашей методикой, показали полное соответствие результатов оценки карбапенемазной активности *P. aeruginosa*, полученных при помощи МАЛДИ-ВП МС и посредством традиционных методов. Гидролитическую активность в отношении меропенема демонстрировали те же штаммы (28%), у которых были детектированы МБЛ и найдены *vim*-гены. Ни у одного гидролиз-негативного штамма не выявлены гены карбапенемаз, по результатам МБЛ-Е-теста они также не проявляли карбапенемазной активности. Полученные данные логично подтверждают друг друга. VIM-карбапенемаза принадлежит к группе МБЛ (В класс по классификации Ambler) и лидирует по распространённости в России [8]. Металло-бета-лактамазы, и VIM в том числе, реализуют наиболее выраженный гидролиз карбапенемов, что нашло отражение в полученных при помощи МАЛДИ-ВП МС результатах: процент гидролиза меропенема у некоторых МБЛ- и VIM-позитивных штаммов за 3 ч приближался к 60. Ни у одного из МБЛ- и VIM-позитивных изолятов процент гидролиза не опускался ниже 7.

Наличие разрыва между максимальными и минимальными показателями гидролиза меропенема у гидролиз-негативных и гидролиз-позитивных изолятов позволяет обозначить линию разделения cut-off, которая будет соответствовать 5% гидролизу и станет

диагностическим критерием при определении карбапенемазной активности у исследуемого штамма.

Интересно, что полученные результаты говорят о том, что всего 28% нечувствительных к карбапенемам штаммов являются продуцентами карбапенемаз. По-видимому, остальные 72% изолятов устойчивы к карбапенемам за счёт альтернативных механизмов резистентности, связанных с нарушением транспорта антибиотика внутрь бактерии (дефект поринов) либо с усилением его выведения из клетки во внешнюю среду (активация эффлюксомпы) [29]. Эти данные соответствуют результатам, полученным зарубежными авторами, которые детектировали МБЛ-карбапенемазы лишь у 6,4% нечувствительных к имипенему и у 31,8% резистентных к меропенему изолятов *P. aeruginosa* [30].

Мы не исключаем возможности дальнейшей модификации методик МС-оценки механизмов чувствительности, но уверены в том, что в обозримом будущем МС-технологии станут рутинными в области изучения резистентности бактерий.

Заключение. На сегодняшний день существует множество способов выявления микроорганизмов-продуцентов карбапенемаз. Каждый из них обладает своими достоинствами и недостатками. Генетические методы позволяют быстро и надёжно определить наличие генов карбапенемаз и их типовую принадлежность, но не доказывают полноценной экспрессии этих генов. Фенотипические подходы экономичны и просты в выполнении, но требуют больше времени для получения результата. Метод МАЛДИ-ВП МС позволяет быстро и экономически эффективно выявлять продуценты карбапенемаз, но существующие протоколы не подходят для некоторых видов микроорганизмов, в том числе для *P. aeruginosa*. Проведённое исследование демонстрирует, что предложенная модификация протокола детекции карбапенемазной активности с помощью МАЛДИ-ВП МС позволяет достоверно выявлять продуценты карбапенемаз среди изолятов *P. aeruginosa*: результаты МС-анализа полностью совпадают с результатами генетического и фенотипического анализа. Следовательно, МАЛДИ-ВП МС является перспективным методом для выявления изолятов *P. aeruginosa*, продуцирующих карбапенемазы, в практике клинической микробиологии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015; 17(3): 170-86.
2. Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009; 22(4): 582-610.

3. Данные с сайта Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам. Available at: http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/. (дата обращения: сентябрь 2017 г.)
4. Rizek C., Fu L., Dos Santos L.C., Leite G., Ramos J., Rossi F. et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2014; 13: 43.
5. Sedighi M., Vaez H., Moghoofoeie M., Hadifar S., Oryan G., Faghri J. Molecular detection of metallo- β -lactamase gene blaVIM-1 in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in the hospitals of Isfahan. *Adv. Biomed. Res.* 2015; 4: 57.
6. Al Bayssari C., Diene S.M., Loucif L., Gupta S.K., Dabboussi F., Mallat H. et al. Emergence of VIM-2 and IMP-15 Carbapenemases and Inactivation of *oprD* Gene in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Lebanon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(8): 4966-70.
7. Paul D., Dhar D., Maurya A.P., Mishra S., Sharma G.D., Chakravarty A. et al. Occurrence of co-existing bla VIM-2 and bla NDM-1 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from India. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2016; 15: 31.
8. Эйдельштейн М.В., Сухорукова М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Микотина А.В., Шек Е.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. и исследовательская группа «МАРАФОН». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» в 2013–2014 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19(1): 37-41.
9. Edelstein M.V., Skleenova E.N., Shevchenko O.V., D'souza J.W., Tapalski D.V., Azizov I.S. et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13(10): 867-76.
10. Hammoudi D., Moubareck C.A., Sarkis D.K. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J. Microbiol. Methods.* 2014; 107: 106-18.
11. Poirel L., Walsh T.R., Cuvillier V., Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 70(1): 119-23.
12. Bogaerts P., Bebrone C., Huang T.D., Bouchahrouf W., Degheldre Y., Deplano A. et al. Detection and characterization of VIM-31, a new variant of VIM-2 with Tyr224His and His252Arg mutations, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(6): 3283-7.
13. Nordmann P., Gniadkowski M., Giske C.G., Poirel L., Woodford N., Miriagou V., European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(5): 432-8.
14. Cohen Stuart J., Leverstein-Van Hall M.A. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010; 36(3): 205-10.
15. Woodford N., Eastaway A.T., Ford M., Leanord A., Keane C. et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan Automated Systems for Detection and Inference of Mechanisms Responsible for Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(8): 2999-3002.
16. Sng W., Kim H., Kim J., Kim H.S., Shin D.H., Shin S. et al. Carbapenem Inactivation Method: Accurate Detection and Easy Interpretation of Carbapenemase Production in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. *Ann. Clin. Microbiol.* 2016; 19(4): 83-87.
17. Mathew A., Harris A.M., Marshall M.J., Ross G.W. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. *J. Gen. Microbiol.* 1975; 88(1): 169-78.
18. Kitao T., Miyoshi-Akiyama T., Tanaka M., Narahara K., Shimojima M., Kirikae T. Development of an immunochromatographic assay for diagnosing the production of IMP-type metallo- β -lactamases that mediate carbapenem resistance in *Pseudomonas*. *J. Microbiol. Methods.* 2011; 87(3): 330-7.
19. Bernabeu S., Poirel L., Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 74(1): 88-90.
20. Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Возможности, проблемы и перспективы масс-спектрометрических технологий в медицинской микробиологии (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(4): 249-56.
21. Knox J., Jadhav S., Sevier D., Agyekum A., Whipp M., Waring L. et al. Phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Carba NP test. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 4075-7.
22. Lasserre C., De Saint Martin L., Cuzon G., Bogaerts P., Lamar E., Glupczynski Y. et al. Efficient detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53: 2163-71.
23. Hrabak J., Walkova R., Studentova V., Chudackova E., Bergerova T. Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(9): 3222-7.
24. Johansson A., Ekelof J., Giske C., Sundqvist M. The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *BMC Microbiol.* 2014; 14: 89.
25. Hoyos-Mallecot Y., Cabrera-Alvargonzalez J.J., Miranda-Casas C., Rojo-Martin M.D., Liebana-Martos C., Navarro-Mari J.M. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014; 58(4): 325-9.
26. Данные с сайта Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам. Available at: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints. (дата обращения: Сентябрь 2017 г.)
27. Данные с сайта Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations/>. (дата обращения: сентябрь 2017 г.)
28. Monteferrante C.G., Sultan S., Ten Kate M.T., Dekker L.J., Sparbier K., Peer M. et al. Evaluation of different pretreatment protocols to detect accurately clinical carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; 71(10): 2856-67.
29. Wolter D.J., Lister P.D. Mechanisms of β -lactam Resistance Among *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Pharmaceutical Design.* 2013; 19: 209-22.
30. Fournier D., Richardot C., Müller E., Robert-Nicoud M., Llanes C., Plesiat P. et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68(8): 1772-80.

REFERENCES

1. Lazareva A.V., Chebotar' I.V., Kryzhanovskaya O.A., Chebotar' V.I., Mayanskij N.A. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenicity, pathogenesis and pathology. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimirnaya himioterapiya*. 2015; 17(3): 170-86. (in Russian)
2. Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009; 22(4): 582-610.
3. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Available at: http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/ (accessed September 2017)

4. Rizek C., Fu L., Dos Santos L.C., Leite G., Ramos J., Rossi F. et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2014; 13: 43.
5. Sedighi M., Vaez H., Moghooeie M., Hadifar S., Oryan G., Faghri J. Molecular detection of metallo- β -lactamase gene blaVIM-1 in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in the hospitals of Isfahan. *Adv. Biomed. Res.* 2015; 4: 57.
6. Al Bayssari C., Diene S.M., Loucif L., Gupta S.K., Dabboussi F., Mallat H. et al. Emergence of VIM-2 and IMP-15 Carbapenemases and Inactivation of *oprD* Gene in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Lebanon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(8): 4966-70.
7. Paul D., Dhar D., Maurya A.P., Mishra S., Sharma G.D., Chakravarty A. et al. Occurrence of co-existing bla VIM-2 and bla NDM-1 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from India. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2016; 15: 31.
8. Ejdel'shtejn M.V., Sukhorukova M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Mikotina A.V., Shek E.A., Dekhnich A.V., Kozlov R.S. and «MARAFON» study group. Antibiotic resistance of nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* in Russian hospitals: results of a multicentre epidemiological study "MARAFON" in 2013-2014. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya.* 2017; 19(1): 37-41. (in Russian)
9. Edelstein M.V., Skleenova E.N., Shevchenko O.V., D'souza J.W., Tapalski D.V., Azizov I.S. et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13(10): 867-76.
10. Hammoudi D., Moubareck C.A., Sarkis D.K. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J. Microbiol. Methods.* 2014; 107: 106-18.
11. Poirel L., Walsh T.R., Cuvillier V., Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 70(1): 119-23.
12. Bogaerts P., Bebrone C., Huang T.D., Bouchahrouf W., Degheldre Y., Deplano A. et al. Detection and characterization of VIM-31, a new variant of VIM-2 with Tyr224His and His252Arg mutations, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(6): 3283-7.
13. Nordmann P., Gniadkowski M., Giske C.G., Poirel L., Woodford N., Miriagou V., European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(5): 432-8.
14. Cohen Stuart J., Leverstein-Van Hall M.A. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010; 36(3): 205-10.
15. Woodford N., Eastaway A.T., Ford M., Leanord A., Keane C. et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan Automated Systems for Detection and Inference of Mechanisms Responsible for Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(8): 2999-3002.
16. Sng W., Kim H., Kim J., Kim H.S., Shin D.H., Shin S. et al. Carbapenem Inactivation Method: Accurate Detection and Easy Interpretation of Carbapenemase Production in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. *Ann. Clin. Microbiol.* 2016; 19(4): 83-7.
17. Mathew A., Harris A.M., Marshall M.J., Ross G.W. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. *J. Gen. Microbiol.* 1975; 88(1): 169-78.
18. Kitao T., Miyoshi-Akiyama T., Tanaka M., Narahara K., Shimojima M., Kirikae T. Development of an immunochromatographic assay for diagnosing the production of IMP-type metallo- β -lactamases that mediate carbapenem resistance in *Pseudomonas*. *J. Microbiol. Methods.* 2011; 87(3): 330-7.
19. Bernabeu S., Poirel L., Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 74(1): 88-90.
20. Bocharova J.A., Chebotar' I.V., Mayanskij N.A. Possibilities, problems and prospects of mass-spectrometric technologies in medical microbiology (literature review). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2016; 61(4): 249-56. (in Russian)
21. Knox J., Jadhav S., Seviar D., Agyekum A., Whipp M., Waring L. et al. Phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Carba NP test. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 4075-7.
22. Lasserre C., De Saint Martin L., Cuzon G., Bogaerts P., Lamar E., Glupczynski Y. et al. Efficient detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53: 2163-71.
22. Hrabak J., Walkova R., Studentova V., Chudackova E., Bergerova T. Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(9): 3222-7.
23. Johansson A., Ekelof J., Giske C., Sundqvist M. The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *BMC Microbiol.* 2014; 14: 89.
24. Hoyos-Mallescot Y., Cabrera-Alvargonzalez J.J., Miranda-Casas C., Rojo-Martin M.D., Liebana-Martos C., Navarro-Mari J.M. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014; 58(4): 325-9.
25. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Available at: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints (accessed September 2017)
26. The Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy (IACMAC). Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations/> (accessed September 2017). (in Russian)
27. Monteferrante C.G., Sultan S., Ten Kate M.T., Dekker L.J., Sparbier K., Peer M. et al. Evaluation of different pretreatment protocols to detect accurately clinical carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; 71(10): 2856-67.
28. Wolter D.J., Lister P.D. Mechanisms of β -lactam Resistance Among *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Pharmaceutical Design.* 2013; 19: 209-22.
29. Fournier D., Richardot C., Müller E., Robert-Nicoud M., Llanes C., Plesiat P. et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68(8): 1772-80.

Поступила 29.09.17
Принята к печати 18.10.17

Тец В.В.¹, Тец Г.В.¹, Смирнова Е.И.¹, Заславская Н.В.¹, Викина Д.С.¹, Артеменко Н.К.¹, Вечерковская М.Ф.¹, Казаков С.П.², Путков С.Б.², Эсауленко Н.Б.², Тугарина Т.М.²

ВЫБОР АНТИБИОТИКА ПО РЕЗУЛЬТАТАМ СТАНДАРТНОГО БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И ЭКСПРЕСС-МЕТОДА БЕЗ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

¹ГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург;

²ФГКУ ГВКГ им. акад. Н.Н. Бурденко Министерства Обороны РФ, 105229, Москва

Изучена эффективность выбора антибиотика с использованием двух методов. Первый основан на стандартном, лабораторном исследовании, включающем выделение чистых культур предполагаемого возбудителя и определение их индивидуальной чувствительности к антибиотикам. Второй основан на новом экспресс-методе, позволяющем одновременно оценивать действие препаратов на культивируемые и пока не культивируемые бактерии без выделения чистых культур. При этом второй метод позволяет определить эффективность антибиотиков именно в тех концентрациях, которые можно создать в данном очаге инфекции. Исследование показало существование расхождения между результатами, полученными с использованием данных методов. Причиной расхождений может быть наличие в патологическом материале пока не культивируемых бактерий. В пользу этого свидетельствуют полученные данные о наличии в материале от больных значительного количества спорообразующих бактерий, обладающих дополнительными механизмами антибиотикоустойчивости. Кроме того, проведенное исследование выявило антибиотики, для которых характерны наибольшие расхождения результатов, полученных использованными методами, что указывает на необходимость пересмотра схем проведения стартовой или эмпирической терапии.

Ключевые слова: выбор антибиотика; тест-система; экспресс-диагностика; пока не культивируемые бактерии.

Для цитирования: Тец В.В., Тец Г.В., Смирнова Е.И., Заславская Н.В., Викина Д.С., Артеменко Н.К., Вечерковская М.Ф., Казаков С.П., Путков С.Б., Эсауленко Н.Б., Тугарина Т.М. Выбор антибиотика по результатам стандартного бактериологического исследования и экспресс-метода без выделения чистых культур. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (2): 106-109. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-106-109>

Tetz V.V.¹, Tetz G.V.¹, Smirnova E.I.¹, Zaslavskaya N.V.¹, Vikina D.S.¹, Artemenko N.K.¹, Vecherkovskaya M.F.¹, Kazakov S.P.², Putkov S.B.², Esaulenko N.B.², Tugarina T.V.²

THE CHOICE OF ANTIBIOTIC ACCORDING TO THE RESULTS OF STANDARD BACTERIOLOGICAL ANALYSIS AND EXPRESS-METHOD WITHOUT ISOLATION OF PURE CULTURES

¹The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Pavlov First Saint Petersburg State Medical University" of Minzdrav of Russia, 197022, St. Petersburg, Russia

²The Federal State Official Institution "The N.N. Burdenko Main Military Clinical Hospital" of ministry of Defense of Russia, 105229, Moscow, Russia

The efficiency of choosing antibiotics using two methods was analyzed. The first method is based on standard laboratory analysis including isolation of pure cultures of prospective agent and detection of their individual sensitivity to antibiotics. The second method is based on a new express-technique permitting to simultaneously evaluate effect of pharmaceuticals on cultivated and not cultivated yet bacteria without isolation of pure cultures. At that, the second method permits to determine efficiency of antibiotics namely in those concentrations that can be made in the given nidus of infection. The study demonstrated existence of discrepancy between results obtained by using the given methods. The cause of discrepancy can be presence of not cultivated yet bacteria in pathologic sample. In favor of this assumption testify the received data concerning samples from patients where were presented a significant number of spore-former bacteria having additional mechanisms of resistance to antibiotics. Furthermore, the implemented study established antibiotics characterized by the greatest discrepancy of results obtained by applied methods that indicates the necessity of revision of schemes of implementation of start or empiric therapy.

Key words: choice; antibiotic; test-scheme; express diagnostic; not cultivated yet bacteria.

For citation: Tetz V.V., Tetz G.V., Smirnova E.I., Zaslavskaya N.V., Vikina D.S., Artemenko N.K., Vecherkovskaya M.F., Kazakov S.P., Putkov S.B., Esaulenko N.B., Tugarina T.V. The choice of antibiotic according the results of standard bacteriological analysis and express-method without isolation of pure cultures. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(2): 106-109. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-106-109>

For correspondence: Tetz V.V., doctor of medical sciences, professor, the head of the chair of microbiology and virology of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Pavlov First Saint Petersburg State Medical University", e-mail: vtetv@yahoo.com

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 27.09.2017
Accepted 09.10.2017

Введение. Эффективность лечения пациентов в значительной степени зависит от правильного и своевременного выбора антибиотикотерапии. Существующие методы анализа результатов лабораторных исследований и эмпирического выбора антибиотиков основаны на свойствах известных и хорошо изученных бактерий. Молекулярно-генетические исследования микробиоты человека и животных показали, что известные классические методы выделения различных бактерий позволяют получить в виде чистых культур лишь не более 20% от общего разнообразия. Бактерии, гены которых выявить можно, а методы выделения чистых культур которых ещё не найдены, получили название «пока не культивируемых» [1]. Представляется, что пока не культивируемые бактерии не только преобладают в микробиоте человека, но и распространены среди возбудителей многих заболеваний [1–3]. Ранее значимые различия были показаны при сравнении результатов стандартного бактериологического исследования патологического материала и его изучения методом метагеномного анализа. Так, при изучении мокроты там, где стандартный метод выявил всего один вид бактерий, метагеномный анализ показал присутствие более 10 различных бактерий, среди которых известные патогены, встречающиеся при заболеваниях дыхательной системы: *Pseudomonas* spp. (кроме *Pseudomonas aeruginosa*), *Achromobacter* spp., *Granulicatella* spp., *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. [4]. Схожие данные получены при аналогичном изучении мочи и раневого отделяемого [5, 6]. Обнаружено существование среди пока не культивируемых представителей микробиоты человека патогенных и условно-патогенных бактерий, способных вызывать болезни различной локализации. Таким образом, очевидно, что в развитии и поддержании многих патологических процессов принимают участие микробы, которые мы пока не можем выделить в виде чистой культуры, идентифицировать и определить их чувствительность к антибиотикам, что проявляется в недостаточной эффективности проводимой терапии. Другим важным фактором, влияющим на эффективность антибиотикотерапии, является скорость получения результатов лабораторного исследования. Разработаны различные схемы проведения таких исследований в том числе с использованием автоматических и полуавтоматических бактериологических анализаторов [7]. Как правило, такие методы занимают несколько дней, поскольку требуют выделения чистых культур. Развитие генетических подходов, основанных на выявлении и идентификации генов, кодирующих 16S рибосомальную РНК, позволило изучать материал от больного без выделения чистой культуры. Однако определить при этом возможно только ограниченное число известных бактерий и, как выяснилось, идентификация бактерий недостаточно точная, а выявление генов устойчивости не полностью соответствует их чувствительности к антибиотикам, поскольку гены хотя и присутствуют в геноме, но не всегда экспрессируются [8, 9]. Попытка совместить большую скорость диагностики с включением в число изучаемых культивируемые и пока не культивируемые бактерии принята в тест-системе «ВыборАнтибиотика» [10]. В тест-системе «ВыборАнтибиотика» использован новый алгоритм исследования, в котором за счёт богатой оригинальной питательной среды одновременно вырастают практически все бактерии из мокроты, мочи или раневого отделяемого (включая пока не культивируемые ви-

ды), а антибактериальные препараты тестируются в концентрациях, которые можно создавать непосредственно в очаге инфекции. В результате тест-система позволяет сравнительно быстро, в течение не более 24 ч, оценить суммарное отношение к различным антибиотикам всех бактерий, находящихся в патологическом материале.

Цель настоящей работы – сравнение результатов определения чувствительности к антибиотикам, полученным стандартными методами и с помощью тест-системы «ВыборАнтибиотика».

Материал и методы. Материал для исследования – мокрота больных с внебольничной пневмонией, раневое отделяемое и моча. Время между забором материала и включением его в исследование не превышало 24 ч с условием хранения при 4°C.

Питательные среды: Колумбийский и шоколадный агар, уриселект 4 (BioMerie, Франция), маннит-солевой агар (Биомедиа, СПб), агар Шедлера (Oxoid, Великобритания), оригинальная питательная среда «ВыборАнтибиотика».

Тест-система «ВыборАнтибиотика» для культивирования бактерий и оценки действия на них антибиотиков.

Микроскопия. Мазки окрашивали по Граму, микроскоп Axiostarplus (CarlZeiss, Германия), объективы A-Plan 100x/1.25, окуляр 10x (CarlZeiss, Германия).

Идентификацию микроорганизмов и определение чувствительности к антибактериальным препаратам проводили с помощью автоматического бактериологического анализатора Vitek 2 compact (bioMerieux, Франция).

Белковый состав определяли на спектрометре Bruker (Bruker Corporation, США).

Анализ последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК выполняли с использованием универсальных бактериальных праймеров 27f – 1492g.

Результаты и обсуждение. Исследование выполнено на основе биоматериала, полученного от больных реанимационных отделений ГВКГ им. акад. Н.Н. Бурденко Минобороны России (Москва). Изучен материал от 52 больных, в том числе мокрота и раневое гноевое отделяемое по 18 образцов и моча – 16 образцов. Поскольку набор антибиотиков, используемый в картах анализатора Vitek 2 compact и тест-системе «ВыборАнтибиотика» совпадает не полностью, результаты сравнивались по антибиотикам, используемым в обеих системах. Состав сравниваемых антибактериальных препаратов при изучении различных биоматериалов приведён в таблице.

В ходе стандартной лабораторной диагностики выделены чистые культуры, впоследствии исследованные на чувствительность к антибактериальным препаратам. Выделение чистой культуры осуществляли в соответствии с действующими рекомендациями в течение 24–72 ч, после чего определяли её антибиотикочувствительность.

При использовании тест-системы чистая культура не выделяется, патологический материал засевали в лунки со специальной питательной средой и определённым содержанием различных антибиотиков в концентрациях, которые можно создать непосредственно в очаге инфекции. В результате наличие или отсутствие микробного роста является главным маркером эффективности или неэффективности антибактериального препарата. При этом в тест-системе «ВыборАнтибиотика» оценивается действие лекарственного препарата сразу на все бакте-

Сравнение состава антибактериальных препаратов при изучении различных биоматериалов

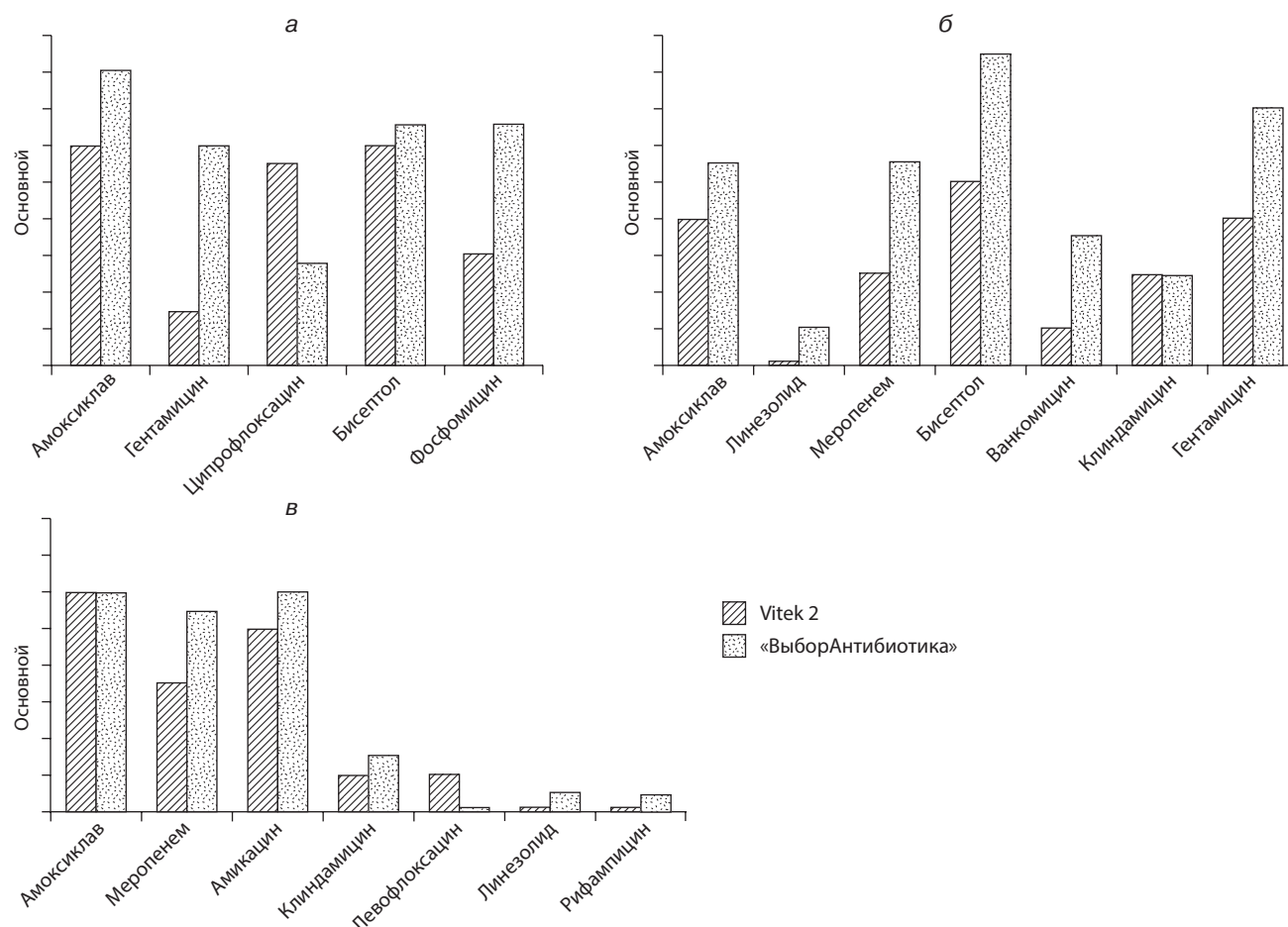
Антибактериальный препарат	Биоматериал		
	моча	раневое отделяемое	мокрота
Амикацин			+
Амоксиклав	+		+
Бисептол	+	+	+
Ванкомицин		+	+
Гентамицин	+	+	+
Клиндамицин		+	
Левифлоксацин		+	
Линезолид		+	
Меропенем			+
Фосфомицин	+		
Ципрофлоксацин	+		+

рии, которые присутствуют в биоматериале больного, с общим временем проведения анализа от 8 до 24 ч.

Результаты оценки возможной эффективности использования различных антибиотиков, полученные в ходе стандартного протокола исследования и экспресс-

методом «Выбор Антибиотика», имели ряд различий (см. рисунок, а, б, в). При анализе результатов выявлены определённые закономерности отличий, присущие всем типам испытанного патологического материала.

При изучении мокроты несовпадение результатов составило 42%. Наибольшее расхождение наблюдалось в действии меропенема, а минимальное количество несовпадений у амоксициллина - 20 %. В пробах мочи результаты не совпали в 32%. Максимальное несовпадение показал фосфомицин – 56,25%, а минимальное было у бисептола и ципрофлоксацина - 18,75%. Изучение раневого отделяемого показало, что несовпадения составили 48%. Больше всего несовпадений у ванкомицина - 62,5% и меропенема - 54,5%, меньше всего несовпадений у гентамицина - 28,5%. В среднем несовпадения по всем изученным материалам и антибиотикам составили около 37%. Полученные данные свидетельствуют о том, что несовпадений больше у препаратов узкого и суженного спектров действия, таких как фосфомицин и ванкомицин, а также длительно используемых бисептола и меропенема. Такой результат также свидетельствует об одновременном наличии в патологическом материале различных неродственных бактерий, в том числе грамположительных и грамотрицательных, которые оказываются недоступными для выделения и идентификации с использованием стандартных микробиологических подходов [11].



Количество проб, устойчивых к антибиотикам, при разных методах исследования.

Материал для исследования: а – моча, б – раневое отделяемое, в – мокрота.

Для подтверждения несоответствия микробного состава, определённого в результате стандартного микробиологического исследования, с реальным содержанием разных бактерий в патологическом материале мы произвели поиск малоизвестных бактерий в изучаемых пробах, сфокусировавшись на спорообразующих аэробных бактериях. Спорообразующие бактерии были идентифицированы по морфологическим свойствам, биохимической активности, составу протеома и гена, кодирующего 16S рибосомальную ДНК. При использовании стандартного метода ни в одной из изученных проб не были выделены спорообразующие бактерии. В то же время, используя тест-систему «Выбор Антибиотика», среди выросших бактерий в виде чистых культур мы получили и идентифицировали ряд малоизвестных спорообразующих бактерий: *Bacillus subtilis* – 2 штамма, *Bacillus licheniformis* – 4 штамма, *Bacillus firmus*, *Bacillus fardii*, *Bacillus oleronius*, *Virgibacillus sp.* – по одному штамму. Наличие в патологическом материале спорообразующих бактерий, значение которых в патологии человека в последнее время вызывает повышенный интерес исследователей, может указывать на серьёзные проблемы, с которыми на сегодняшний день связана антибактериальная терапия различных заболеваний [12,13].

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что существующие микробиологические методы пока не позволяют выделить чистые культуры и изучить все бактерии, находящиеся в очаге инфекции. Основной причиной ограниченных возможностей стандартных лабораторных методов следует считать широкое распространение пока не культивируемых бактерий, которые дают рост при совместном выращивании в составе смешанных сообществ и не могут быть выделены согласно существующим протоколам. Это значительно снижает реальную ценность осуществляемого в настоящее время лабораторного исследования, обнаружившего существование расхождения между тем, что показывают методы определения чувствительности к антибиотикам выделенных чистых культур, и выбором антибиотика с учётом свойств пока не культивируемых бактерий. Результаты исследования также указывают на антибиотики, по которым имеются максимальные расхождения результатов, что свидетельствует о необходимости пересмотра их использования в эмпирической терапии, а также на наличие в патологическом материале большого количества спорообразующих бактерий, обладающих дополнительными механизмами антибиотикостойчивости.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grice E.A., Segre J. A. The Human Microbiome: our second genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2012; 13: 151–70.
2. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010; 34: 415–25.
3. Lipkin W. I. The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11: 133–41.
4. Тец Г.В., Тец В.В., Ворошилова Т.М. Оценка микробного состава мокроты при внебольничной пневмонии. *Практическая пульмонология.* 2015; 2: 62–5.
5. Тец Г.В., Тец В.В., Ворошилова Т.М. Микробный состав отде-

- ляемого ожоговой раны и эффективность его изучения при лабораторной диагностике. *Инфекции в хирургии.* 2016; 2: 29–31
6. Тец Г.В., Тец В.В., Ворошилова Т.М. Метагеномный анализ проб при цистите. *Урология.* 2016; 1: 29–31.
7. Jorgensen J.H., Ferraro M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49 (11): 1749–55.
8. Вечерковская М.Ф., Тец Г.В., Тец В.В. Неизвестные бактерии в микрофлоре ротовой полости детей с онкогематологическими заболеваниями. *Клиническая онкогематология.* 2014; 7(2): 229–32.
9. Миронов А. Ю., В. Зур Н. В. *Молекулярные маркеры патогенов.* М.: ООО «Тираж»; 2013.
10. Тец Г.В., Смирнова Е.И., Кардава К.М., Викина Д.С., Заславская Н.В., Тец В.В. Выбор антибиотиков при смешанных инфекциях у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. *Практическая пульмонология.* 2015; 4: 39–41.
11. Тец Г.В., Тец В.В., Ворошилова Т.М., Смирнова Е.И., Кардава К.М., Карамян Т.А., Заславская Н.В., Викина Д.С., Зайцева М.А., Артеменко К.Л., Кауфман А.С. Выбор антибиотика в микробиологическом исследовании инфекций мочевыделительной системы. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 2:114–6.
12. Tuazon C.U., Murray H.W., Levy C., Solny MN, Curtin JA, Sheagren JN. Serious infections from *Bacillus* species. *JAMA.* 1979; 241: 1137–40.
13. Тец Г.В., Тец В.В., Артеменко Н.К. Спорообразующие бактерии – возбудители заболеваний дыхательной системы и предотвращение их распространения в стационаре. *Практическая пульмонология.* 2015;1: 43–5.

REFERENCES

1. Grice E.A., Segre J. A. The Human Microbiome: our second genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2012; 13: 151–70.
2. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010; 34: 415–25.
3. Lipkin W. I. The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11: 133–41.
4. Tetz G.V., Voroshilova T.M. Assessment of sputum microbial composition in community-acquired pneumonia. *Prakticheskaya pul'monologiya.* 2015; 2: 62–5. (in Russian)
5. Tetz G.V., Tetz V.V., Voroshilova T.M. Microbial composition of the burn wound discharge and effectiveness of its study in the laboratory diagnostics. *Infektsii v khirurgii.* 2016; 2: 29–31 (in Russian)
6. Tetz G.V., Tetz V.V., Voroshilova T.M. Metagenomic analysis of samples in cystitis. *Urologiya.* 2016; 1: 29–31. (in Russian)
7. Jorgensen J.H., Ferraro M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49 (11): 1749–55.
8. Vecherkovskaya M.F., Tetz G.V., Tetz V.V. Unknown bacteria in oral flora of children with hematological malignancies. *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2014; 7(2): 229–32. (in Russian)
9. Mironov A. Yu., B. Zur N. V., eds. Pathogen molecular markers [Molekulyarnye markery patogenov]. Moscow: Tirazh; 2013. (in Russian)
10. Tetz G.V., Smirnova E.I., Kardava K.M., Vikina D.S., Zaslavskaya N.V., Tetz V.V. The choice of antibiotics for mixed infections in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Prakticheskaya pul'monologiya* 2015; 4: 39–41. (in Russian)
11. Tetz G.V., Tetz V.V., Voroshilova T.M., Smirnova E.I., Kardava K.M., Karamyani T.A., Zaslavskaya N.V., Vikina D.S., Zaiceva M.A., Artemenko K.L., Kaufman A.S. The choice of an antibiotic in a microbiological study of urinary tract infections. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2016; 2:114–6. (in Russian)
12. Tuazon C.U., Murray H.W., Levy C., Solny M.N., Curtin J.A., Sheagren J.N. Serious infections from *Bacillus* species. *JAMA.* 1979; 241: 1137–40.
13. Tetz G.V., Tetz V.V., Artemenko N.K. Spore-forming bacteria – causative agents of the respiratory system diseases and prevention of their spread in the hospital. *Prakticheskaya pul'monologiya.* 2015;1: 43–5.

Поступила 27.09.17

Принята к печати 09.10.17

Юнусова Р.Ю.¹, Горелова В.Г.², Комбарова С.Ю.¹, Алешкин А.В.¹, Ефимова О.Г.¹, Бичучер А.М.¹,
Мартыненко И.Г.¹, Алиева Э.Р.²

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ЭНДО ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

¹ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

²ГБОУ ВПО Дагестанская государственная медицинская академия Минздрава РФ, 367016, Махачкала, Россия

Совершенствование традиционной питательной среды Эндо с целью подавления «роения» Proteus vulgaris и Proteus mirabilis. Объектом исследования служила коммерческая сухая среда Эндо. Посев референс-штаммов энтеробактерий и клинического материала (кал, моча, мокрота) проводили в соответствии с нормативными документами. Показано, что внесение в среду Эндо триптофана и натриевых солей желчных кислот в определенном соотношении их концентраций подавляло «роение» P. vulgaris и P. mirabilis. Полученные результаты показали, что использование усовершенствованной среды Эндо значительно повышает её дифференциальные и диагностические свойства.

Ключевые слова: среда Эндо; энтеробактерии; триптофан; натриевые соли желчных кислот; феномен «роения» P. vulgaris и P. mirabilis.

Для цитирования: Юнусова Р.Ю., Горелова В.Г., Комбарова С.Ю., Алешкин А.В., Ефимова О.Г., Бичучер А.М., Мартыненко И.Г., Алиева Э.Р. Совершенствование питательной среды Эндо для выявления и идентификации энтеробактерий. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (2): 110-113

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-110-113>

Yunusova R.Yu.¹, Gorelova V.G.², Kombarova S.Yu.¹, Aleshkin A.V.¹, Efimova O.G.¹, Bichucher A.M.¹, Martynenko I.G.¹, Alieva E.R.²

THE DEVELOPMENT OF ENDO GROWTH MEDIUM FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF ENTEROBACTERIA

¹The Federal Budget Institution of Science "G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology" of Rospotrebnadzor of Russia, 125212, Moscow, Russia

²The State Budget Educational Institution of Higher Professional Education "The Dagestan State Medical Academy" of Minzdrav of Russia, 367016 Makhachkala, Russia

The purpose of study is to develop a traditional Endo's growth medium with the view of suppression of swarming of Proteus vulgaris and Proteus mirabilis. The object of study was a commercial dry Endo's growth medium. The inoculation of reference strains of enterobacteria and clinical sample (feces, urine, phlegm) was implemented according the normative documents. It is demonstrated that brining into Endo's growth medium tryptophan and sodium salts of bile acids in a particular ratio of their concentrations suppressed swarming of Proteus vulgaris and Proteus mirabilis. The obtained results demonstrated that application of enhanced Endo's growth medium significantly increases its differential and diagnostic characteristics.

Key words: Endo's growth medium; enterobacteria; tryptophan; sodium salts of bile acids; phenomenon of "swarming" of P. vulgaris and P. mirabilis.

For citation: Yunusova R.Yu., Gorelova V.G., Kombarova S.Yu., Aleshkin A.V., Efimova O.G., Bichucher A.M., Martynenko I.G., Alieva E.R. The development of Endo growth medium for detection and identification of enterobacteria. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(2): 110-113. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-110-113>

For correspondence: Yunusova R.Yu., candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory of coccal infections of the Federal Budget Institution of Science "G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology", e-mail: proteika@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 16.10.2017
Accepted 20.10.2017

Введение. Выделение и идентификация микроорганизмов на питательных средах остаётся золотым стандартом и имеет важное значение и широкую область применения в микробиологии. Дифференциально-диагностические питательные среды, используемые при идентификации микроорганизмов, должны обе-

спечивать высокую специфичность, выделение культуры бактерий в максимально возможные короткие сроки, простоту, доступность и воспроизводимость результатов анализов.

Значительную часть регулярных исследований бактериологов, решающих задачи клинической и санитарной микробиологии, составляет лабораторная диагностика заболеваний, вызванных патогенными и условно-патогенными энтеробактериями, и санитарно-эпидемиологический мониторинг энтеро-

Для корреспонденции: Юнусова Раисат Юнусовна, канд. биол. наук, ст.науч.сотр. лаборатории кокковых инфекций; e-mail: proteika@mail.ru

бактерий в объектах внешней среды и в пищевых продуктах [1–3]. Основная питательная среда при этиологической диагностике энтеробактерий – Эндо.

Среда Эндо – это традиционная дифференциально-диагностическая питательная среда, которая позволяет дифференцировать прежде всего, лактозоположительные и лактозоотрицательные энтеробактерии. Разработанная в 1905 г., она остаётся наиболее часто применяемой в клинической микробиологии для первичного посева исследуемого материала с целью выявления патогенных¹ и условно-патогенных энтеробактерий².

В связи с широким применением среду Эндо описывают во всех руководствах и учебных пособиях по практической микробиологии, каталогах питательных сред [4, 5]. Однако на протяжении более 100 лет учёным-микробиологам не удалось устранить главный недостаток этой среды – «роение» протеев. В случае наличия в исследуемой микробной ассоциации «роящихся» форм протеев (*P. vulgaris* и *P. mirabilis*) на среде Эндо невозможно выделить изолированные колонии микроорганизмов, а также произвести подсчёт числа выросших колоний, вследствие образования сплошной плёнки протеев на поверхности [6]. Эта ситуация значительно усложняет трудоёмкость исследований из-за невозможности выделить изолированные колонии в случае присутствия в микробной ассоциации протеев.

Для подавления «роения» протеев обычно используют различные химические вещества. Однако они, препятствуя «роению» протеев, могут ингибировать и рост выделяемых микроорганизмов. Известна модификация, содержащая электролит-дефицитную питательную основу с минимальным составом минеральных веществ, которая снимает этот недостаток [7]. В Российской Федерации питательные среды на электролит-дефицитной основе были разработаны, но не выпускались из-за очень большой трудоемкости в приготовлении и высокой стоимости [8].

В связи с этим усовершенствование традиционной питательной среды Эндо с целью устранения её основного недостатка – «роения» *P. vulgaris* и *P. mirabilis* – актуальная задача для лабораторной службы.

Цель исследования – совершенствование среды Эндо для ускорения идентификации энтеробактерий.

Материал и методы. В работе использовали коммерческую питательную среду, сухую – среду Эндо, 10 референс-штаммов энтеробактерий и один штамм *Staphylococcus aureus*, полученных в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (перечислены в таблице), а также 210 образцов клинического материала (кал, моча, мокрота). Посев референс-штаммов проводили в соответствии с МУК 4.2.2316-08³. Посев кли-

нического материала – в соответствии с Приказом МЗ СССР №535⁴.

Результаты и обсуждение. Приступая к исследованиям, мы основывались на обнаруженном ранее свойстве L-триптофана связываться с родоспецифическим ферментом протеев – триптофандезаминазой [9]. Было показано, что при посеве референс-штаммов *P. mirabilis* 3177 и *P. vulgaris* Hx19 222 на среду Эндо, которая дополнительно содержала L-триптофан в количестве 7 г/л, колонии протеев окрашивались в вишнёво-коричневый цвет с таким же преципитатом вокруг колоний и вырастали в О-Н форме.

Первым этапом настоящих экспериментальных исследований были клинические испытания среды Эндо, описанной в указанной ранее статье, с использованием референс-штаммов и с использованием клинического материала, полученного от пациентов (моча, мокрота, кал). Было установлено, что данная среда, ингибируя «роение» референс-штаммов протеев, не подавляет «роение» клинических штаммов *P. vulgaris* и *P. mirabilis*.

С целью исключения «роения» клинических штаммов *P. vulgaris* и *P. mirabilis* было изучено влияние L-триптофана и натриевых солей желчных кислот, комплексно введённых в состав среды Эндо, при использовании их различных концентраций и в различных сочетаниях.

В результате серии экспериментов определены оптимальные концентрации L-триптофана и натриевых солей желчных кислот, при которых исключается «роение» клинических штаммов *P. vulgaris* и *P. mirabilis* (растут в О-Н-форме). Благодаря продукции высокоспецифичного фермента протеев – триптофандезаминазы, они вырастают на среде в виде колоний вишнёво-коричневого цвета с вишнёво-коричневым преципитатом. Идентификация протеев на предлагаемой среде осуществляется одновременно с их выделением, т. е. одноэтапно.

Так, учет результатов показал, что через 18 ± 2 ч инкубации посевов при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ как на традиционной, так и на усовершенствованной среде Эндо при посеве микробной смеси референс-штаммов из разведения 10^{-6} , патогенные энтеробактерии (*S. typhimurium*, *S. flexneri*, *S. sonnei*) формируют бесцветные колонии диаметром от 1,5 до 2 мм в S-форме. Колонии условно-патогенных энтеробактерий (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *E. cloacae*) вырастают размером 2–2,5 мм, в S-форме, красного цвета, с металлическим блеском или без него на фоне бледно-розового цвета питательной среды.

На усовершенствованной среде Эндо колонии референс-штаммов *P. mirabilis* и *P. vulgaris* из раз-

¹ Приказ МЗ СССР № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». М.: Медицина; 1985.

² СанПиН 2.3.2.1280-02. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Дополнения и изменения N 2 к СанПиН 2.3.2.1078-01. М.: Минздрав России; 2003.

³ Методы контроля бактериологических питательных сред. МУК 4.2.2316-08. М.: Минздрав России; 2008. 67с.

⁴ Приказ МЗ СССР № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». М.: Медицина; 1985.

Сравнительная характеристика дифференцирующих свойств среды Эндо и усовершенствованной среды Эндо

Референс-штаммы	Разведение	Среда Эндо		Усовершенствованная среда Эндо		
		лактоза	Цвет и форма колоний	лактоза	Триптофан (триптофандезаминаза)	Цвет и форма колоний
<i>Escherichia coli</i> Su 3912/41 O55 K:59	10 ⁻⁶	+	Красные, S-форма	+	-	Красные, S-форма
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3534/51	-/-	+	Красные, S-форма	+	-	Красные, S-форма
<i>Enterobacter cloacae</i> 10005	-/-	+	Красные, S-форма	+	-	Красные, S-форма
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	-/-	+	Красные, S-форма	+	-	Красные, S-форма
<i>Serratia marcescens</i> 1	-/-	+	Красные, S-форма	+	-	Красные, S-форма
<i>Proteus vulgaris</i> Hx19 222	-/-	-	Бесцветные R-форма, «роение»	-	+	Вишнёво-коричневые с таким же преципитатом, O-H форма
<i>Proteus mirabilis</i> 3177	-/-	-	Бесцветные R-форма, «роение»	-	+	Вишнёво-коричневые с таким же преципитатом, O-H форма
<i>Salmonella enterica typhimurium</i> 79	-/-	-	Бесцветные S-форма	-	-	Бесцветные, S-форма
<i>Shigella flexneri</i> 1a 8516	-/-	-	Бесцветные S-форма	-	-	Бесцветные, S-форма
<i>Shigella sonnei</i> 5063	-/-	-	Бесцветные S-форма	-	-	Бесцветные, S-форма
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	10 ⁻¹		Рост отсутствует			Рост отсутствует

ведения 10⁻⁶ вырастают в O-H форме (без «роения») вишнёво-коричневого цвета диаметром 2,5-3 мм с преципитатом вокруг колоний того же цвета. В то же время на традиционной среде Эндо при посеве референс-штаммов *P. mirabilis* и *P. vulgaris* даже из разведения 10⁻⁷ на поверхности среды образуется сплошная слизистая плёнка бледно-розового цвета, препятствующая выделению и идентификации выросших бактерий, а также подсчёту их количества (см.таблицу).

Установлено, что, несмотря на внесение в среду натриевых солей желчных кислот, которые, как известно, используют для ингибирования роста лактозоположительных энтеробактерий, в частности *E. coli*, рост колиформных бактерий на усовершенствованной среде не задерживается.

Остальные характеристики традиционной среды Эндо сохраняются. Так, лактозоотрицательные энтеробактерии вырастают на среде бесцветными, лактозоположительные энтеробактерии благодаря присутствию в среде лактозы и фуксина окрашиваются в красный цвет. Грамположительные микроорганизмы подавляются при посеве из разведения 10⁻¹ вследствие присутствия в среде фуксина основного (рис. 1-5, см.обложку).

Следующим этапом экспериментальных исследований были клинические испытания усовершенствованной среды Эндо с использованием 210 образцов клинического материала, полученного от пациентов (моча, мокрота, кал). Роящиеся формы протеев (*P. vulgaris* и *P. mirabilis*) обнаружены в 15 образцах (7%). *P. vulgaris* выявлены в 11 образцах (5%), а *P. mirabilis* - 4 (2%). Установлено, что на оптимизированной среде ингибируется «роение» не только референс-штаммов протеев, но и клинических штаммов *P. vulgaris* и *P. mirabilis*.

Заключение. Введение в состав усовершенствованной среды Эндо определённого сочетания концентраций L-триптофана и натриевых солей желчных

кислот устраняет основной недостаток традиционной среды Эндо - «роение» *P. vulgaris* и *P. mirabilis*. Несмотря на то, что соли желчных кислот подавляют рост кишечной палочки, на разработанной среде поддерживается рост всех лактозоположительных энтеробактерий, в том числе *E. coli*. Кроме того, на усовершенствованной среде стало возможным с помощью родоспецифического фермента протеев - триптофандезаминазы одновременно с выделением идентифицировать по цвету все формы штаммов протеев (как роящиеся, так и нероящиеся). Разработанный состав среды обеспечивает чёткую дифференциацию энтеробактерий по цвету: патогенные энтеробактерии вырастают в виде бесцветных колоний, протеи вырастают в виде вишнёво-коричневых колоний с таким же преципитатом вокруг колоний, остальные условно-патогенные энтеробактерии - в виде красных колоний с металлическим блеском или без него.

Таким образом, усовершенствованная среда Эндо поддерживает рост всех энтеробактерий и имеет явные преимущества перед традиционной средой Эндо, поскольку позволяет одновременно с выделением патогенных и условно-патогенных энтеробактерий идентифицировать протеи по цвету и преципитату вокруг колоний, а также выделить культуру в чистом виде и провести точный количественный учёт выросших микроорганизмов, что особенно важно при клинических и санитарных исследованиях.

Результаты исследования позволяют рекомендовать усовершенствованную питательную среду Эндо для широкого использования в бактериологической практике. На усовершенствованную среду Эндо получен патент РФ [10].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.7 см. REFERENCES)

1. Руководство по медицинской микробиологии. Кн. 2. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н., Иванова С.М., ред. М.: Бином; 2015.
2. Шендеров Б.А. Функциональное и персональное питание. Современное состояние и перспектива. *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга*. 2010; 2-3: 2-5.
3. Руководство по медицинской микробиологии. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика. Кн. 3. т. 1. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н., ред. М.: Бином; 2013.
4. Диагностические препараты. Каталог продукции ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора РФ. Шепелин А.П., ред. Оболensk: А-Принт; 2017.
5. Меджидов М.М. Справочник по микробиологическим питательным средам. М.: Медицина; 2003.
6. Голубева И.В., Килессо В.А., Киселева Б.С., Прямухина Н.С., Татаринова С.Д., Хоменко Н.А. и др. *Энтеробактерии. Руководство для врачей*. Покровский В.И., ред. М.: Медицина; 1985.
8. Султанов З.З. Разработка и усовершенствование технологий получения микробиологических питательных основ и сред. Дисс. д-ра биол. наук. Махачкала; 2007.
9. Степанова Э.Д., Юнусова Р.Ю., Меджидов М.М., Горелова В.Г. Модификации питательных сред для выделения и идентификации клинически значимых условно патогенных микроорганизмов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2012; 2: 117-9.
10. Степанова Э.Д., Юнусова Р.Ю., Горелова В.Г., Рамазанова Э.Р., Комбарова С.Ю., Алешкин А.В. и др. Модифицированная питательная среда Эндо для выявления и идентификации энтеробактерий. Патент РФ № 2574210; 2016: 4.

REFERENCES

1. *Medical microbiology manual. Book 2. Special medical microbiology and etiological diagnostics of infections. [Rukovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii. Kn. 2. Chastnaya meditsinskaya mikrobiologiya i etilogicheskaya diagnostika infektsij]*. Labinskaya A.S., Kostyukova N.N., Ivanova S.M., eds. Moscow: Binom; 2015. (in Russian)

2. Shenderov B.A. Functional and personal diet. Current state and perspective. *Zhurnal gastrojenterologiya Sankt-Peterburga*. 2010; 2-3: 2-5. (in Russian)
3. *Medical Microbiology Manual. Opportunistic infections: pathogens and etiological diagnostics. Book. 3. [Rukovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii. Opportunisticheskie infektsii: vzbuditeli i etilogicheskaya diagnostika. Kniga 3. Tom 1]*. Labinskaya A.S., Kostyukova N.N., eds. Moscow: Binom; 2013. (in Russian)
4. *Diagnostic preparations. Catalog of production FBIS SRC AMB. [Diagnosticheskie preparaty. Katalog produktsii FBUN GNC PMB Rospotrebnadzora RF]*. Shepelin A.P., ed. Obolensk: A-Print; 2017. (in Russian)
5. Medzhidov M.M. *Directory of microbiological media. [Spravochnik po mikrobiologicheskim pitatel'nyim sredam]*. Moscow: Meditsina; 2003. (in Russian)
6. Golubeva I.V., Kileso V.A., Kiseleva B.S., Pryamuhina N.S., Tatarinova S.D., Homenko N.A. et al. *Enterobacteriaceae: Manual for doctors. [Enterobakterii: Rukovodstvo dlya vrachey]*. Pokrovskiy V.I., ed. Moscow: Meditsina; 1985. (in Russian)
7. Sandys G.H. A new method of preventing swarming of *Proteus* spp. with a description of new medium suitable for use routine laboratory practice. *Medical Laboratory Technology*. 1960; 17: 224-33.
8. Sultanov Z.Z. Development and improvement of technologies for obtaining microbiological nutrient bases and media [Razrabotka i usovershenstvovanie tehnologiy polucheniya mikrobiologicheskikh pitatel'nyh osnov i sred]. Dis. Makhachkala; 2007. (in Russian)
9. Stepanova E.D., Yunusova R.Yu., Medzhidov M.M., Gorelova V.G. Modification of culture media for the isolation and identification of clinically significant opportunistic microorganisms. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2012; 2: 117-9. (in Russian)
10. Stepanova E.D., Yunusova R.Yu., Gorelova V.G., Ramazanova E.R., Kombarova S.Yu., Aleshkin A.V. et al. *Modified Endo culture medium for detection and identification of enterobacteriaceae [Modifitsirovannaya pitatel'naya sreda Endo dlya vyyavleniya i identifikatsii enterobakteriy]*. Patent RF № 2574210; 2016: 4. (in Russian)

Поступила 16.10.17

Принята к печати 20.10.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 614.2:616-022.7-084-078

Наумкина Е.В.^{1,2}, Матущенко Е.В.¹, Абросимова О.А.², Калитина И.И.², Соколова Т.Н.², Иванова С.Ф.², Пядочкина Т.В.²

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ КАК ОСНОВА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА И АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ В УСЛОВИЯХ МНОГОПРОФИЛЬНОГО СТАЦИОНАРА

¹ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 644050, Омск, Россия;

²БУЗОО «Городской клинический перинатальный центр», 644007, Омск, Россия

При изучении особенностей микробиоты и антибиотикорезистентности возбудителей, выделяемых из биоматериала пациентов в условиях многопрофильного стационара, проведено микробиологическое исследование 6148 образцов с использованием оптимального набора методов (классические тесты, хромогенные среды, иммуносерологические, масс-спектрометрия *Maldi-Tof*). Антибиотикорезистентность определяли диско-диффузионным методом (EUCAST 2016, анализатор *Adagio*).

Ведущая роль в этиологии гнойно-воспалительных процессов принадлежит *E. coli*, коагулазонегативным стафилококкам, энтерококкам, *C. albicans*. В отделении гнойной хирургии лидируют *S. aureus*, условно-патогенные энтеробактерии, гемолитические стрептококки, НФГОМ. В отделении травматологии и ортопедии на 1-м месте оказались представители семейства энтеробактерий во главе с *E. coli*, далее следует золотистый стафилококк, а затем – другие виды микроорганизмов.

Для корреспонденции: Наумкина Елена Витальевна, д-р мед. наук, проф. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, зав. лаб. клин. микробиологии; e-mail: evn04@mail.ru

Основными представителями микроорганизмов, выделяющихся от пациентов отделения анестезиологии и реанимации, оказались синегнойная палочка, *S. aureus*, клебсиелла. В терапевтическом отделении на 1-м месте выявлены пневмококк и дрожжеподобные грибы рода *Candida*.

Существенно отличается в разрезе профильных отделений и антибиотикорезистентность ведущей микрофлоры. Крайне важно точно обследовать пациентов с выявлением возбудителя заболевания и производить определение чувствительности к антибиотикам различных групп.

Ключевые слова: микроорганизмы; антибиотикорезистентность; мониторинг.

Для цитирования: Наумкина Е.В., Матущенко Е.В., Абросимова О.А., Калитина И.И., Соколова Т.Н., Иванова С.Ф., Пядочкина Т. В. Микробиологический мониторинг как основа эпидемиологического надзора и антимикробной терапии в условиях многопрофильного стационара. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (2): 113-118. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-113-118>

Naumkina E.V.^{1,2}, Matuschenko E.V.¹, Abrosimova O.A.², Kalitina I.I.², Sokolova T.N.², Ivanova S.F.², Pyadochkina T.V.²

THE MICROBIOLOGICAL MONITORING AS A BASIS OF EPIDEMIOLOGICAL CONTROL AND ANTI-MICROBIAL THERAPY IN CONDITIONS OF MULTI-TYPE HOSPITAL

¹The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Omsk State Medical University" of Minzdrav of Russia, 644050, Omsk, Russia

²The Budget Health Care Institution of the Omsk Oblast "The Municipal Clinical Perinatal Center", 644007, Omsk, Russia

The study was carried out to investigate features of microbiota and resistance to antibiotics of agents isolated from bio-material of patients in the conditions of multi-type hospital. The microbiological analysis was applied to 6148 samples using optimal set of corresponding techniques (classical tests, chromogenic mediums, immune serological, Maldi-Tof mass spectrometry). The resistance to antibiotics was established by using disk diffusion test (EUCAST 2016, Adagio analyzer).

The leading role in etiology of pyoinflammatory processes belongs to *E. coli*, coagulase-negative staphylococci, enterococci, *C. albicans*. In the department of contaminated surgery among leaders are *S. aureus*, opportunistic enterobacteria, hemolytic streptococci, non-fermentative gram-negative microorganisms. In the department of traumatology and orthopedics first place was for representatives of enterobacteria family headed by *E. coli*, then follows *S. aureus* and after that other types of microorganisms. The main representatives of microorganisms, isolated from patients of the department of anesthesiology and reanimation, occurred blue pus bacillus, *S. aureus*, *Klebsiella*. In the department of therapy first place was for pneumococcus and yeast-like fungi genus *Candida*.

The resistance to antibiotics of main microflora differs depending on perspective of profile departments. It is extremely important to examine accurately for detection of agent of disease and to establish sensitivity to antibiotics of various groups.

Key words: microorganisms; resistance to antibiotics; monitoring.

For citation: Naumkina E.V., Matuschenko E.V., Abrosimova O.A., Kalitina I.I., Sokolova T.N., Ivanova S.F., Pyadochkina T.V. The microbiological monitoring as a basis of epidemiological control and anti-microbial therapy in conditions of multi-type hospital. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(2): 113-118. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-113-118>

For correspondence: Naumkina E.V., doctor of medical sciences, professor, of the chair of microbiology, virology and immunology of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Omsk State Medical University", e-mail: evn04@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.09.2017
Accepted 26.09.2017

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, продолжают оставаться одной из актуальных проблем практического здравоохранения во всем мире [1–3]. Их возникновение объясняется реализацией механизмов передачи возбудителей среди пациентов и медицинского персонала в специфических условиях больничной среды с активной циркуляцией госпитальных штаммов микроорганизмов при наличии восприимчивого контингента иммунокомпрометированных пациентов [4–5].

Микробный пейзаж отдельных подразделений лечебно-профилактического учреждения имеет свои локальные особенности, связанные со структурой заболеваний и длительностью пребывания пациентов в стационаре, характером медицинских манипуляций в конкретном отделении, спектром применяемых антибактериальных и дезинфицирующих средств, особенностями противоэпидемического режима [6, 7]. Представляет интерес изучение локальных особеннос-

тей микробного пейзажа возбудителей, выделяемых из клинического материала в отделениях многопрофильного лечебного учреждения и распространённость среди этих возбудителей основных маркёров антибиотикорезистентности.

Цель исследования – локальный микробиологический мониторинг микрофлоры клинического материала в отделениях многопрофильного стационара.

Материал и методы. Проведён анализ результатов микробиологического исследования в микробиологической лаборатории в течение 2015–2016 гг. 10 451 образцов биологического материала от пациентов различных отделений многопрофильного стационара. Были применены классические микробиологические методы в соответствии со стандартными операционными процедурами, действующими в лаборатории, разработанными на основе существующей нормативно-методической документации. Посев биоматериала проводили на набор питатель-

ных сред, соответствующих предполагаемому спектру возбудителей, инкубировали аэробно, в условиях повышенного содержания CO₂, при необходимости анаэробно (газогенерирующие системы GasPak; идентификацию проводили с использованием оптимального в каждом случае набора доступных методов (классические биохимические тесты, хромогенные среды, иммуносерологические методы, автоматизированная идентификация с использованием Phoenix-100, масс-спектрометрия Vitec-MS Maldi-Tof). Антибиотикорезистентность выделенных клинически значимых микроорганизмов определяли в большинстве случаев диско-диффузионным методом с оценкой результатов в соответствии с критериями EUCAST 2014-2016 (анализатор Adagio). В ряде случаев определяли минимальные ингибирующие концентрации с помощью E-тестов или автоматизированным методом (Phoenix-100).

Проанализированы результаты обследований пациентов, находящихся на стационарном лечении в следующих отделениях: гинекологическое, специализирующееся на оказании круглосуточной неотложной помощи пациенткам с гнойно-воспалительными заболеваниями матки и придатков; гнойной хирургии с центром критической ишемии конечностей и диабетической стопы; хирургическое, оказывающее все виды хирургической помощи больным с патологией брюшной полости в плановом и неотложном порядке; травматологии и ортопедии для лечения больных с заболеваниями и повреждениями позвоночника; анестезиологии и реанимации; терапевтическое отделение поликлиники со стационаром на дому.

Результаты и обсуждение. Наибольшее количество исследований проведено на материале отделяемого половых путей пациенток гинекологического отделения – 5164 пробы (95,7%). Доля положительных высевок составила 95,1%; в спектре выделенных микроорганизмов доминировали *E. coli* (23,1%); коагулазонегативные стафилококки (20,3%); *E. faecalis* (13,9%); дрожжеподобные грибы рода *Candida*, преимущественно *C. albicans* (10,2%). Доля *S. aureus* составила 4,2%; *S. agalactiae* – 5,6%. Другие виды микроорганизмов (представители семейства *Enterobacteriaceae*, за исключением уже упомянутой *E. coli*, неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы (НФГОМ), *S. pneumoniae* и другие виды стрептококков, *Haemophilus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *G. vaginalis*, анаэробные кокки) высевались реже, составив в сумме около 23% находок. Более трети случаев приходилось на ассоциации микроорганизмов, основными участниками которых были *E. coli*, *E. faecalis*, коагулазонегативные стафилококки. Спектр микроорганизмов, выделяемых из клинического материала в гинекологическом отделении, представлен на рис. 1

Проведено 1159 исследований отделяемого пациентов отделения гнойной хирургии, 85,6% – раз-

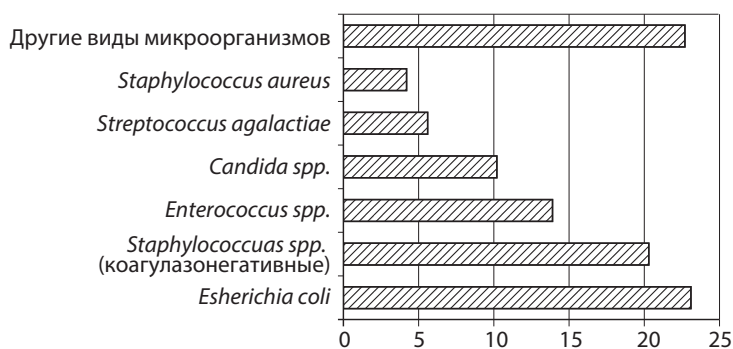


Рис.1. Спектр микроорганизмов, выделенных из клинического материала у пациентов гинекологического отделения.

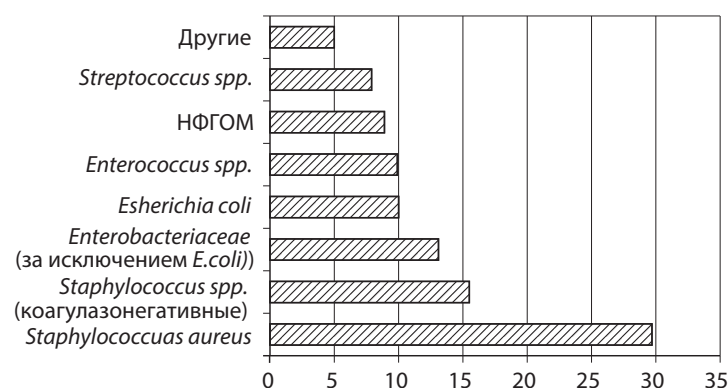


Рис.2. Спектр микроорганизмов, выделенных из клинического материала у пациентов отделения гнойной хирургии.

личные виды раневого отделяемого, 5,1% – кровь, в единичных случаях – другие виды биоматериала. В спектре микроорганизмов (рис. 2) доминировали стафилококки (45,2%, в основном *S. aureus* – 29,7%), представители семейства *Enterobacteriaceae* (23,1%; *E. coli* – 10%), *Enterococcus spp.* – 9,9%; НФГОМ (8,9%; *P. aeruginosa* – 5,2%). Представители семейства *Streptococcaceae* составили 7,9% культур, были в основном представлены *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*.

В хирургическом отделении проведено 137 исследований, 36,5% – раневого отделяемого, 18,2% – дренажа брюшной полости, 11,7% – крови. В спектре выделенных микроорганизмов доминировали представители семейства *Enterobacteriaceae* (67,5%), среди которых лидировали *E. coli* (22%) и *K. pneumoniae* (15,6%). На 2-м месте оказались *Staphylococcus spp.* (15,6%), далее следовали НФГОМ (10,4%).

В отделении травматологии и ортопедии основную часть исследований составили посевы крови (38%), мочи (37%) и раневого отделяемого (23%). Обращает на себя внимание высокая доля положительных результатов при посевах мочи – 73,7%, что связано с процедурой катетеризации мочевого пузыря у пациентов с заболеваниями и повреждениями позвоночника.

Среди выделенных возбудителей доминировали

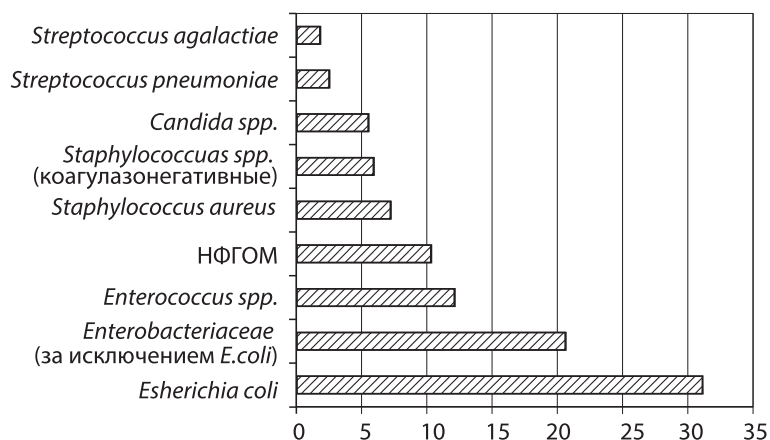


Рис. 3. Спектр микроорганизмов, выделенных из клинического материала у пациентов отделения травматологии и ортопедии.

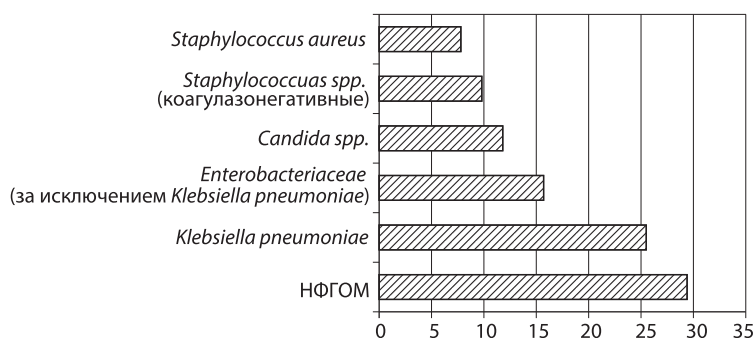


Рис. 4. Спектр микроорганизмов, выделенных из клинического материала у пациентов отделения реанимации.

энтеробактерии (37,3%), в основном *E. coli* (23,6%), *S. aureus* (17,5%), *Enterococcus* spp. Высеивались НФГОМ (6,1%), коагулазонегативные стафилококки (4,4%), пневмококки (3,5%) и бета-гемолитические стрептококки (*S. agalactiae*, *S. pyogenes*) – 1,8% (рис. 3).

Основными биоматериалами пациентов отделения анестезиологии и реанимации были кровь – 46,9% (положительных 25% проб были положительными) и мокрота – 15,6% (положительных 95%).

Спектр выделенных возбудителей очень широк. Доминировали НФГОМ (29,4%), представленные в основном тремя видами – *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*; представители семейства *Enterobacteriaceae* (41,2%), среди которых доминировала *K. pneumoniae* (25,5%). На долю стафилококков пришлось 17,6% (*S. aureus* 7,8%); дрожжеподобные грибы рода *Candida* высеивались в 11,8% случаев (рис. 4).

В терапевтическом отделении основными видами исследуемых биоматериалов были кровь – 46,5% (положительных 10%) и мокрота – 25,9% (положительных 96,3%). Среди выделенных микро-

организмов доминировали дрожжеподобные грибы рода *Candida* (32,5%, преимущественно *C. albicans* – 26,9%), *S. pneumoniae* (18,5%), реже встречались *K. pneumoniae* (7,8%), *S. aureus* (6,2%), НФГОМ (4,3%), *Enterococcus* spp. (4,1%), *H. influenzae* (3,8%) (рис. 5).

Анализ распространённости маркёров антибиотикорезистентности среди наиболее часто встречающихся возбудителей в динамике за 2015–2016 гг. показал следующее.

Частота выделения метициллинрезистентных штаммов *S. aureus* существенно отличалась в разных отделениях, составляя от 3,2% в отделении гинекологии до 45% в реанимационном отделении. При этом во всех отделениях отмечалось в среднем двукратное увеличение частоты встречаемости MRSA в 2016 г. в сравнении с предыдущим годом (рис. 6). Еще более значительной была доля метициллинрезистентных коагулазонегативных стафилококков – от 25,4% в гинекологическом отделении до 50,1 и 100% в отделениях гнойной хирургии и реанимации. Отмечалось увеличение этих показателей в 2016 г. (32,1, 70,4 и 100% соответственно).

Показатели резистентности стафилококков к другим группам антибактериальных препаратов отличались по отделениям. Ожидается более часто встречалась резистентность к макролидам (100%), линкозамидам (59,8%), фторхинолонам (75%) в отделении реанимации. Реже штаммы, устойчивые к этим группам антибиотиков, выделялись от пациенток гинекологического отделения (70,1, 23,5 и 20,2% соответственно) и отделения гнойной хирургии (15,3, 23,2 и 39% соответственно).

Все штаммы *Klebsiella pneumoniae*, выделенные от пациентов отделения реанимации, продуцировали β-лактамазы расширенного спектра (ESBL); в отделениях гнойной хирургии, травматологии и ортопедии частота встречаемости таких штаммов была очень высока (84,6 и 92% соответственно в 2016 г.). У пациентов гинекологического и терапевтического отделения ESBL-продуцирующие штаммы клебсиелл встре-

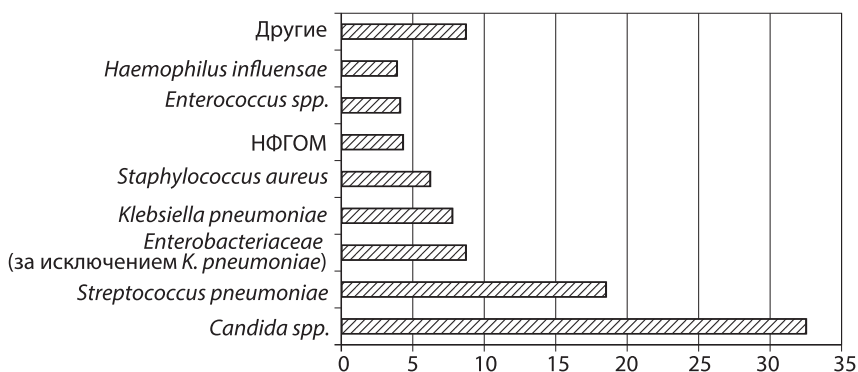


Рис. 5. Спектр микроорганизмов, выделенных из клинического материала у пациентов терапевтического отделения.

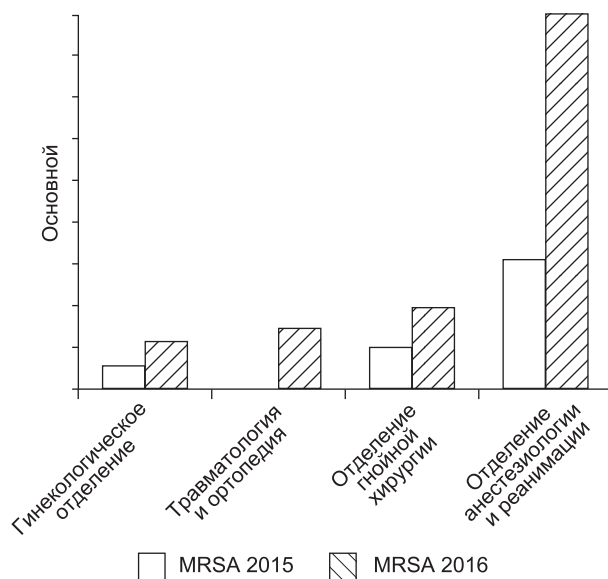


Рис. 6. Метициллинрезистентные *S. aureus* в отделениях многопрофильного стационара.

чались значительно реже – 22,5 и 30% соответственно (рис. 7).

Доля штаммов ESBL + *Escherichia coli* наиболее высока в отделении травматологии и ортопедии – 74% (все штаммы выделены из мочи), в остальных отделениях – не более 17,5%, за исключением реанимации, где выделены единичные штаммы *E. coli*, не вошедшие в анализ. Для отделения травматологии и ортопедии характерной оказалась высокая частота встречаемости устойчивости *E. coli* к фторхинолонам – 67%. В то же время большинство штаммов *E. coli*, выделенных из мочи, сохраняли чувствительность к фосфомицину и нитрофурантоину (7 и 5% соответственно).

НФГОМ, представленные в основном *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, наиболее часто выделялись от пациентов реанимационного отделения и характеризовались высоким уровнем устойчивости к имипенему (90,6%), меропенему (99,5%), амикацину (71%), фторхинолонам (98%). В остальных отделениях частота устойчивости этой группы микроорганизмов существенно ниже – 12,9, 13,5, 6,3 и 21% соответственно.

Анализ полученных результатов позволяет выявить особенности видов патологии и контингентов больных по профильным отделениям стационара и характер ведущей микрофлоры, выделяемой из клинического материала и формирующей популяцию госпитальных штаммов микроорганизмов. В отделении гинекологии ведущая роль в этиологии гнойно-воспалительных процессов принадлежит *E. coli*, коагулазонегативным стафилококкам, энтерококкам, *C. albicans*, что закономерно объясняется принадлежностью этих видов к факультативным представителям нормальной вагинальной микробиоты. В отделении гнойной хирургии лидирует *S. aureus*, в равной сте-

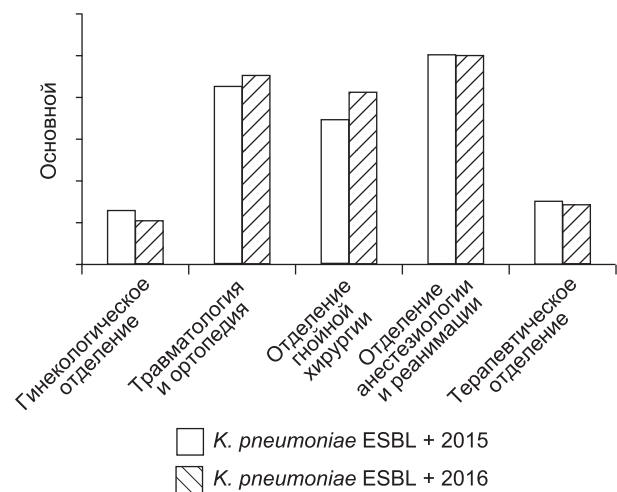


Рис. 7. Частота встречаемости ESBL+ штаммов *Klebsiella pneumoniae*.

пени представлены другие возбудители гнойно-воспалительных процессов – условно-патогенные энтеробактерии, гемолитические стрептококки, НФГОМ. Сходно выглядит спектр ведущей микрофлоры в отделении травматологии и ортопедии: здесь на 1-м месте оказались представители семейства энтеробактерий во главе с *E. coli*, выделяемыми прежде всего из мочевыводящих путей, что объясняется наличием пациентов с длительно стоящим мочевым катетером; далее следует золотистый стафилококк и затем уже другие виды микроорганизмов.

P. aeruginosa, *S. aureus*, клебсиеллы в основном выделялись от пациентов отделения анестезиологии и реанимации; в терапевтическом отделении на 1-м месте – пневмококк и дрожжеподобные грибы рода *Candida*.

Существенно отличается в разрезе профильных отделений и антибиотикорезистентность ведущей микрофлоры. Наиболее распространены маркеры антибиотикорезистентности у микроорганизмов, высевающихся в отделении анестезиологии и реанимации (45% MRSA и практически 100% устойчивость к цефалоспорином (ESBL) у клебсиелл и карбапенемам у *P. aeruginosa*). Очень высока доля ESBL-положительных штаммов *E. coli* в отделении травматологии и ортопедии, в то же время выделенные в этом отделении штаммы стафилококков в большинстве случаев оказались высокочувствительными к основным антибиотикам.

В отделении гнойной хирургии доля ESBL-положительных *E. coli* не так высока – 17,5%, однако этот показатель *K. pneumoniae* составил 84,6%. Более половины коагулазонегативных стафилококков в этом отделении оказались устойчивыми к метициллину, доля MRSA составила 9,5%.

Распространённость маркёров резистентности к бета-лактамам в отделении гинекологии относительно невысока, при этом обращает на себя внимание высокий процент стафилококков, устойчивых к ма-

кролидам, линкозамидам, тетрациклинам, что, вероятно, связано с широким применением антибактериальных препаратов этих групп для лечения инфекций в гинекологии на амбулаторном этапе.

Анализ локальных данных микробиологического мониторинга в лечебно-профилактическом учреждении позволяет планировать и своевременно корректировать рациональную и эффективную стратегию применения антибактериальных препаратов для лечения различных видов патологии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишена О.В. и др. *Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и информационный материал по ее положениям*. Н. Новгород: Издательство «Ремедиум Приволжье»; 2012.
2. Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И. Внутрибольничные инфекции: новые горизонты профилактики. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2011; 1: 4-7.
3. Маркович Н.И., Сергеев В.И., Шарафутдинов Р.Р. Экономический ущерб от ведущих внутрибольничных гнойно-септических инфекций новорожденных и родильниц. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2010; 52 (4): 4-8.
4. Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишена О.В. и др. Госпитальный штамм - непознанная реальность. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013; 68(1): 30-5.
5. Афанасьев С.С. Мониторинг антибиотикорезистентности как объективный диагностический и эпидемиологический критерий инфекционного процесса. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2014; 4: 61.
6. Шляпников С.А., Насер Н.Р., Попенко Л.Н. Профиль антибио-

тикорезистентности основных возбудителей госпитальных инфекций в ОРИТ многопрофильного стационара. *Инфекции в хирургии*. 2009; 1: 8.

7. Бабаев С.Ю., Руина О.В., Митрофанова Н.Н., Строганов А.Б. Сравнительный мониторинг антибиотикорезистентности микрофлоры многопрофильных стационаров городов Пензы и Нижнего Новгорода. *Медицинский Альманах*. 2016; 3: 67-70.

REFERENCES

1. Pokrovskiy V.I., Akimkin V.G., Briko N.I., Brusina E.B., Zueva L.P., Kovalishena O.V. et al. *National Concept of prevention of infections associated with medical care, and information material on its provisions [Natsional'naya kontseptsiya profilaktiki infektsiy, svyazannykh s okazaniem meditsinskoj pomoshchi, i informatsionnyy material po eyo polozheniyam]*. Nizhniy Novgorod: Izdatel'stvo «Remedium Privolzh'e»; 2012. (in Russian)
2. Pokrovskiy V.I., Akimkin V.G., Briko N.I. Nosocomial infections: prevention of new horizons. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2011; 1: 4-7. (in Russian)
3. Markovich N.I., Sergeev V.I., Sharafutdinov R.R. Economic damage from the leading hospital-acquired septic infection of newborns and postpartum. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2010; 52 (4): 4-8. (in Russian)
4. Briko N.I., Brusina E.B., Zueva L.P., Kovalishena O.V. et al. Hospital strain - the unknown reality. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2013; 68 (1): 30-5. (in Russian)
5. Afanas'ev S.S. Monitoring of antibiotic resistance as an objective diagnostic criteria and epidemiology of infection. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2014; 4: 61. (in Russian)
6. Shlyapnikov S.A., Naser N.R., Popenko L.N. Profile antibiotic main pathogens of nosocomial infections in intensive care department of general hospital. *Infektsii v khirurgii*. 2009; 1: 8. (in Russian)
7. Babaev S.Yu., Ruina O.V., Mitrofanova N.N., Stroganov A.B. Comparative monitoring of antibiotic resistance microflora of multidisciplinary hospitals in Penza and Nizhniy Novgorod. *Meditsinskiy Al'manakh*. 2016; 3: 67-70. (in Russian)

Поступила 01.09.17

Принята к печати 26.09.17

Уважаемые авторы и читатели журнала!

Обращаем ваше внимание на то, что мы обновили сайт нашего журнала, новый адрес сайта: www.medlit.ru/journalsview/lab

Теперь вы можете подписаться через наш сайт на электронную версию журнала или купить отдельные статьи по издательской цене. Для этого нужно пройти регистрацию на сайте.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 618.14-006.36-092:612.017.1]-076.5-078.33

Воронин Д.Н., Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И., Лицова А.О., Анциферова Ю.С.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ОСОБЕННОСТЕЙ АКТИВАЦИИ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ CD56+ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ С ХАРАКТЕРОМ РОСТА МИОМАТОЗНЫХ УЗЛОВ У ПАЦИЕНТОК С ЛЕЙОМИОМОЙ МАТКИ

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н.Городкова» Минздрава РФ, 153045, г. Иваново, Россия

У пациенток с различными клиническими вариантами лейомиомы матки (большие или малые размеры, наличие или отсутствие интенсивной пролиферации опухолевых клеток) был проведен сравнительный анализ особенностей активации CD56+эндометриальных естественных киллеров. Методом проточной цитометрии в популяции эндометриальных лимфоцитов определяли относительное содержание CD56+клеток, экспрессирующих молекулы CD158a и CD158i из семейства KIR (киллерные иммуноглобулин-подобные рецепторы), интерферон γ (IFN γ) и трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF $\beta 1$). У всех пациенток с лейомиомой независимо от размеров опухоли в эндометрии выявлено повышение общего содержания CD56+ ЕК и количества ЕК с активирующими (CD158i) и ингибирующими (CD158a) рецепторами. В группе пациенток с лейомиомой матки стабильно малых размеров было повышено количество CD56+IFN γ + лимфоцитов, а у женщин с быстрорастущей опухолью отмечалось увеличение пула ЕК, экспрессирующих TGF $\beta 1$. Дифференцированный анализ данных у пациенток с лейомиомой матки больших размеров в зависимости от типа роста узла показал, что при увеличении размеров миомы за счёт усиленной пролиферации клеток уровень CD56+ ЕК и соотношение количества ЕК с активирующими и ингибирующими рецепторами в эндометрии было ниже, а содержание CD56+TGF $\beta 1$ + – выше, чем у женщин, рост лейомиомы у которых осуществлялся преимущественно за счёт выработки компонентов внеклеточного матрикса. Полученные результаты свидетельствуют об угнетении цитотоксической активности эндометриальных ЕК клеток при лейомиоме матки с признаками пролиферации. Выявленные изменения могут служить дополнительными диагностическими критериями типа роста лейомиомы матки.

Ключевые слова: лейомиома матки; эндометрий; естественные киллеры; KIR рецепторы; интерферон γ ; трансформирующий фактор роста $\beta 1$.

Для цитирования: Воронин Д.Н., Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И., Лицова А.О., Анциферова Ю.С. Взаимосвязь особенностей активации эндометриальных CD56+ естественных киллеров с характером роста миоматозных узлов у пациенток с лейомиомой матки. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(2): 119-123. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-119-123>

Voronin D.N., Sotnikova N.Yu., Malyshkina A.I., Litsova A.O., Antsiferova Yu.S.

RELATIONSHIP BETWEEN ACTIVATION OF ENDOMETRIAL CD56+ NATURAL KILLERS AND THE CHARACTER OF LEIOMYOMA NODULES GROWTH IN PATIENTS WITH UTERINE LEIOMYOMA

Federal State Budgetary Establishment "Research Institute of Maternity and Childhood named V.N.Gorodkov" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 153045 Ivanovo, Russia

In patients with different clinical variants of uterine leiomyoma (large or small size, presence or absence of intensive proliferation of tumor cells) the comparative analysis of endometrial CD56+ natural killers (NK) activation was carried out. The relative content of CD56+ cells, expressing of CD158a and CD158i molecules from KIR (killer immunoglobuline-like receptors) family, interferon γ (IFN γ) and transforming growth factor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), was estimated by flow cytometry method. It was found that in the endometrium of all patients with uterine leiomyoma independently of tumor size the content of CD56+ cells and the amount of NK, expressing both activating (CD158i) and inhibitory (CD158a) receptors, were increased. In group of women with stably small uterine leiomyoma the amount of CD56+IFN γ + lymphocytes was increased, and in women with rapidly growing tumor the elevation of NK, expressing TGF $\beta 1$, was noted. Differential analysis of data in patients with large leiomyoma in dependence of type of leiomyoma growth was shown that in patients with the high level of tumor cells proliferation the amount of CD56+ NK and the ratio of NK with activating and inhibitory receptors were lower and the content of CD56+TGF $\beta 1$ + lymphocytes was higher than that in women with leiomyoma, which grew due to accumulation of the extracellular matrix components. Received results showed on the suppression of cytotoxic activity of endometrial NK in patients with uterine leiomyoma with increased proliferation. These changes can be used as additional diagnostic criteria of type of leiomyoma growth.

Key words: uterine leiomyoma, endometrium, natural killers, KIR receptors, interferon γ , transforming growth factor $\beta 1$.

For citation: Voronin D.N., Sotnikova N.Yu., Malyshkina A.I., Litsova A.O., Antsiferova Yu.S. Relationship between activation of endometrial CD56+ natural killers and the character of leiomyoma nodules growth in patients with uterine leiomyoma. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(2): 119-123. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-119-123>

Для корреспонденции: Воронин Дмитрий Николаевич, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. клин. иммунологии, e-mail: niimid.immune@mail.ru

For correspondence: *Voronin D.N.*, candidate of biological sciences, researcher of the laboratory of clinical immunology of the Federal State Budget Scientific Institution "The V.N. Gorodkov Ivanovo research institute of maternity and childhood", e-mail: niimid.immune@mail.ru

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 14.11.2017
Accepted 18.11.2017

Введение. Лейомиома матки, доброкачественная гормональнозависимая опухоль миометрия, является в настоящее время одним из наиболее распространённых гинекологических заболеваний, которое диагностируют у 25–50% всех женщин репродуктивного возраста [1, 2]. Клинические симптомы, такие как болевой синдром, анемия, дизурические явления, а также нарушения фертильности существенно снижают качество жизни пациенток с лейомиомой матки [1]. Хотя патогенез лейомиомы матки до конца ещё не установлен, существует гипотеза, что эта опухоль является моноклональной по происхождению и развивается из одной гладкомышечной клетки миометрия в результате соматических мутаций [3]. В настоящее время ведутся интенсивные исследования иммунных механизмов, участвующих в формировании и росте миоматозных узлов, поскольку именно иммунная система играет основную роль в осуществлении противоопухолевого надзора в организме. Показано, что развитие лейомиомы матки сопровождается нарушениями реакций адаптивного и врождённого иммунитета на системном уровне, проявляющимися увеличением количества клеток Th1 и Th2, регуляторных Т-лимфоцитов, усиленной активацией моноцитов и нейтрофилов [1]. Менее изучены особенности иммунного ответа в эндометрии пациенток с лейомиомой матки, хотя предварительные исследования позволяют предположить непосредственное участие иммунокомпетентных клеток эндометрия в процессах, регулирующих рост миоматозного узла. Так, в работе К. Kitaуа и Т. Yasuo [4] были продемонстрированы значительные изменения состава и плотности лейкоцитарного инфильтрата эндометрия у пациенток с лейомиомой матки, причём максимальные изменения отмечены для эндометрия, локализованного в непосредственной близости от миоматозного узла. Выявлено, что в течение всего менструального цикла в эндометрии пациенток с лейомиомой матки значительно усилена макрофагальная инфильтрация, пик плотности нейтрофилов отмечен в пролиферативную фазу, высокая плотность Т-лимфоцитов – в секреторную фазу, а уровень естественных киллеров (ЕК) в этот период, напротив, снижен [4].

Известно, что ЕК играют ведущую роль в формировании противоопухолевого иммунного ответа, поскольку эти клетки способны без предварительной стимуляции оказывать прямое цитотоксическое действие в отношении инфицированных и трансформированных клеток собственного организма [5]. Регуляция активности ЕК осуществляется с помощью специфических активирующих и ингибирующих рецепторов, причём активация ЕК в обычных условиях подавлена за счёт высокого уровня экспрессии ингибирующих рецепторов, которые взаимодействуют с молекулами МНС (главного комплекса гистосовместимости) I класса на поверхности клеток-мишеней. При нормальном уровне экспрессии молекул МНС ингибирующие рецепто-

ры предотвращают возможную атаку ЕК в отношении клеток собственного организма. В случаях изменённой экспрессии молекул МНС, как это отмечается у опухолевых клеток, через активирующие рецепторы в ЕК проводится стимулирующий сигнал, что приводит к развитию цитотоксических реакций в отношении потенциально опасных для организма трансформированных клеток [6]. Идентифицировано несколько семейств рецепторов ЕК, таких как NCR (рецепторы естественной цитотоксичности), лектиновые рецепторы С-типа, а также KIR или иммуноглобулинподобные рецепторы [5]. В каждом семействе выявлены как активирующие, так и ингибирующие рецепторы. Так, рецепторы KIR различаются между собой наличием либо длинного, либо короткого цитоплазматического домена. Длинный домен характерен для ингибиторных форм рецепторов, так как он содержит последовательность ITIM (иммунорецепторный тирозиносодержащий ингибиторный мотив), которая фосфорилируется при взаимодействии KIR с МНС I класса, активирует тирозиновые фосфатазы, предотвращая активацию ЕК [5]. В число ингибиторных рецепторов KIR входит молекула KIR2DL1 или CD158a. Активирующие KIR с коротким цитоплазматическим доменом лишены последовательности ITIM и содержат положительно заряженный аминокислотный остаток в трансмембранном регионе, который связан с KARAP/DAP-12 сигнальным полипептидом, известным как иммунорецепторный тирозин-основанный активирующий мотив (ITAM) [5]. Примером активирующего рецептора KIR является KIR2DS4 или молекула CD158i. Характер экспрессии рецепторов KIR эндометриальными ЕК при различных клинических вариантах лейомиомы матки до настоящего времени остаётся практически не изученным.

Функциональное состояние ЕК также зависит от спектра продуцируемых ими цитокинов. Известно, что в процессе распознавания и элиминации клеток-мишеней ЕК высвобождают различные цитолитические молекулы и цитокины, в том числе интерферон γ (IFN γ), которому отводят важную роль в обеспечении цитотоксического действия ЕК [7]. В то же время показано, что ЕК могут продуцировать и противовоспалительные цитокины, такие как IL-10 и TGF β , которые оказывают супрессорное влияние на реакции адаптивного и врожденного иммунитета, в том числе и при опухолевом процессе. Так, есть данные, что у больных раком груди в крови циркулируют ЕК TGF β +, которые подавляют активность противоопухолевых иммунных реакций [8]. Таким образом, особенности рецепторного репертуара и цитокинового профиля ЕК играют важную роль в обеспечении эффективного противоопухолевого иммунного ответа. Можно предположить, что изменение активности эндометриальных ЕК, локализованных в непосредственной близости от опухолевой ткани, оказывает непосредственное влияние на развитие и рост лейомиомы матки. Однако данные литерату-

ры о функциональном состоянии эндометриальных ЕК при лейомиоме матки отсутствуют.

Цель исследования – установить особенности мембранной экспрессии активирующих и ингибирующих KIR рецепторов, а также внутриклеточной экспрессии IFN γ и TGF β эндометриальными CD56+ лимфоцитами пациенток с различными клиническими вариантами лейомиомы матки для уточнения иммунных механизмов роста данной опухоли.

Материал и методы. В условиях гинекологической клиники ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт имени В.Н.Городкова» Минздрава России было проведено обследование 44 женщин с лейомиомой матки, поступивших на обследование и лечение. У 19 из них была диагностирована лейомиома матки стабильно малых размеров, при этом общие размеры матки у пациенток этой группы не превышали 9-недельного срока беременности и в течение предшествующего года наблюдения отсутствовал рост миомы. У 25 женщин была диагностирована быстрорастущая лейомиома матки больших размеров, общие размеры матки составляли более 10 нед беременности, за последний год наблюдения наблюдалось увеличение размеров на 4–5 нед беременности и более. Этим женщинам было проведено оперативное лечение лейомиомы матки, и в зависимости от выявленных морфологических особенностей типа роста миоматозных узлов пациентки ретроспективно были разделены на две подгруппы: 11 женщин с признаками активной пролиферации опухолевых клеток («истинный» тип роста) и 14 женщин с лейомиомой, рост которой был обусловлен не активной пролиферацией клеток, а накоплением компонентов внеклеточного матрикса («ложный» тип роста). 17 здоровых фертильных женщин, обратившихся на приём к гинекологу по поводу подбора метода контрацепции, составили контрольную группу. От всех женщин, вошедших в исследование, было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Материалом для исследования служили биоптаты эндометриальной ткани, полученной в ходе проведения гистероскопического обследования. Из эндометрия выделяли популяцию мононуклеарных клеток (МНК) стандартным механическим способом с последующим центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина ($d = 1,078$) [9]. Фенотип эндометриальных ЕК оценивали методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с помощью моноклональных антител: FITC-конъюгированных анти-CD56, PE-конъюгированных анти-CD158i, анти-CD158a («Becton Coulter», Франция), анти-human-IFN γ , анти-human- TGF β 1 («Becton Dickinson», США). Процедуру окрашивания и фиксации клеток проводили стандартным способом в соответствии с указаниями фирмы-разработчика. При оценке внутриклеточной продукции цитокинов предварительно проводили процедуру фиксации и пермеабиллизации клеточной мембраны с использованием коммерческого набора Fixative Solution IOTest®3 10x Concentrate (Beckman Coulter, USA). При анализе данных определяли относительное содержание клеток с фенотипом CD56+, CD56+CD158i+, CD56+CD158a+, CD56+IFN γ +, CD56+TGF β 1+ в лимфоцитарном гейте. Кроме того, высчитывали соотношение процента ЕК, экспрессирующих рецепторы различного типа, по формуле: CD56+CD158i+/ CD56+CD158a+.

При проведении статистической обработки результатов проверка нормальности распределения полученных данных с помощью критерия Колмогорова–Смирнова выявила нормальное распределение данных. В связи с этим достоверность различий оценивали с помощью параметрического t -критерия Стьюдента с использованием статистической программы STATSYICA 6.0. Различия в группах расценивались как статистически значимые при значении показателя $p < 0,05$.

Результаты. Нами было установлено, что общее содержание эндометриальных ЕК CD56+ было повышено в обеих группах пациенток с лейомиомой матки по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 1). При этом у женщин с лейомиомой матки больших размеров уровень ЕК был достоверно ниже, чем у женщин с малой лейомиомой матки. У всех женщин с лейомиомой матки мы выявили увеличение относительного содержания CD56+ ЕК, экспрессирующих как активирующие (CD158i), так и ингибирующие (CD158a) рецепторы, по сравнению с контрольной группой. При этом соотношение активирующих и ингибирующих рецепторов эндометриальными ЕК было сходным как при миоме матки, так у здоровых женщин и свидетельствовало о преобладании популяции клеток с ингибирующими рецепторами. Оценка характера внутриклеточной экспрессии цитокинов эндометриальными ЕК показала, что отличительной характеристикой пациенток с лейомиомой матки стабильно малых размеров было повышенное по сравнению с контрольной группой содержание CD56+IFN γ + лимфоцитов. У пациенток с растущей лейомиомой матки больших размеров мы выявили статистически значимое увеличение пула ЕК, экспрессирующих TGF β 1, как по сравнению с контрольной группой, так и с группой женщин с лейомиомой матки стабильно малых размеров (см. табл. 1).

Таблица 1

Характеристика активации ЕК CD56+ в эндометрии пациенток с лейомиомой матки

Показатель	Контроль ($n = 17$)	Лейомиома матки малых раз- меров ($n = 19$)	Лейомиома матки боль- ших размеров ($n = 25$)
CD56+, %	21,22 $\pm$ 2,21	38,16 $\pm$ 2,02 $p_1 = 0,000$	31,57 $\pm$ 1,76 $p_1 = 0,001$, $p_2 = 0,017$
CD56+CD158i+, %	4,13 $\pm$ 0,59	7,20 $\pm$ 0,87 $p_1 = 0,008$	7,45 $\pm$ 0,87 $p_1 = 0,004$, $p_2 = 0,842$
CD56+CD158a+, %	4,76 $\pm$ 0,85	8,53 $\pm$ 0,79 $p_1 = 0,004$	8,47 $\pm$ 0,73 $p_1 = 0,004$, $p_2 = 0,953$
CD56+CD158i+/ CD56+CD158a+	0,81 $\pm$ 0,17	0,89 $\pm$ 0,16 $p_1 = 0,802$	0,94 $\pm$ 0,08 $p_1 = 0,589$, $p_2 = 0,626$
CD56+IFN γ +	3,78 $\pm$ 0,95	6,73 $\pm$ 0,94 $p_1 = 0,040$	5,71 $\pm$ 0,65 $p_1 = 0,117$, $p_2 = 0,376$
CD56+TGF β 1+	4,99 $\pm$ 0,83	6,21 $\pm$ 0,67 $p_1 = 0,270$	8,94 $\pm$ 1,05 $p_1 = 0,008$, $p_2 = 0,041$

Примечание. p_1 – по сравнению с контрольной группой; p_2 – по сравнению с пациентками с лейомиомой матки малых размеров.

Таблица 2

Характеристика активации ЕК CD56+ в эндометрии пациенток с лейомиомой матки различных типов роста

Показатель	Контроль (n = 8)	Лейомиома матки «истинный» рост (n = 11)	Лейомиома матки «ложный» рост (n = 14)
CD56+,%	21,22±2,21	29,73±1,39 $p_1 = 0,079$	36,84±2,21 $p_1 = 0,003$, $p_2 = 0,013$
CD56+CD158i+,%	4,13±0,59	7,25±1,34 $p_1 = 0,033$	8,47±1,20 $p_1 = 0,003$, $p_2 = 0,503$
CD56+CD158a+,%	4,76±0,85	9,51±0,99 $p_1 = 0,001$	7,59±1,02 $p_1 = 0,019$, $p_2 = 0,192$
CD56+CD158i+/CD56+CD158a+	0,81±0,17	0,86±0,11 $p_1 = 0,462$	1,32±0,19 $p_1 = 0,065$, $p_2 = 0,047$
CD56+IFN γ +	3,78±0,95	5,11±1,08 $p_1 = 0,371$	6,18±0,79 $p_1 = 0,072$, $p_2 = 0,437$
CD56+TGF β 1+	4,99±0,83	11,72±1,71 $p_1 = 0,012$	6,96±0,71 $p_1 = 0,096$, $p_2 = 0,046$

Примечание. p_1 – по сравнению с контрольной группой; p_2 – по сравнению с пациентками с лейомиомой матки с «истинным» типом роста.

Для уточнения взаимосвязи характера активации эндометриальных ЕК с типом роста лейомиомы матки мы провели дифференцированный анализ иммунологических показателей в группе пациенток с быстрорастущей лейомиомой матки в зависимости от интенсивности пролиферации клеток миоматозных узлов (табл. 2). В подгруппе пациенток с быстрорастущей лейомиомой матки, размеры которой увеличивались преимущественно за счёт усиленной клеточной пролиферации («истинный» рост), мы выявили достоверно более низкое содержание ЕК CD56+ в эндометрии по сравнению с таковым у пациенток с лейомиомой без признаков активной пролиферации. Кроме того, эти две подгруппы различались по индексу соотношения количества ЕК с активирующими и ингибирующими рецепторами. При «истинном» типе роста этот показатель был достоверно ниже, чем у пациенток с «ложным» типом роста. При этом численные значения этого показателя свидетельствовали о преобладании пула ЕК с активирующими рецепторами при «ложном» типе роста лейомиомы, тогда как активные пролиферативные процессы в миоматозном узле ассоциировались с доминированием в эндометрии ЕК, экспрессирующих ингибиторные рецепторы. Кроме того, подгруппа с «истинным» типом быстрого роста лейомиомы матки характеризовалась более высокими значениями количества эндометриальных ЕК, экспрессирующих TGF β 1, чем у пациенток с «ложным» характером роста миомы (см. табл. 2).

Обсуждение. Таким образом, развитие лейомиомы матки сопровождается изменением активности ЕК с фенотипом CD56+ в эндометрии. Вне зависимости от размера опухоли у пациенток с лейомиомой матки в эндометрии по нашим данным повышено относительное содержание ЕК, что позволяет говорить об

индукции локального иммунного ответа на опухоль, развивающуюся в миометрии. Наряду с повышением общего количества ЕК у всех пациенток с лейомиомой матки мы выявили повышение количества ЕК с мембранной экспрессией как активирующих, так и ингибирующих KIR рецепторов. При этом соотношение ЕК с рецепторами различного типа у пациенток с миомой матки соответствовало таковому у здоровых фертильных женщин и характеризовалось более высоким уровнем лимфоцитов CD56+CD159a+ по сравнению с содержанием клеток CD56+CD158i+. Как известно, в норме баланс соотношения экспрессии активирующих и ингибирующих рецепторов в популяции ЕК сдвинут в сторону последних, что предотвращает возможность развития цитотоксических реакций против клеток собственного организма [5]. Однако развитие патологических состояний, в частности появление трансформированных клеток, приводит к индукции экспрессии активирующих рецепторов на поверхности ЕК, а также к усилению продукции ими цитолитических молекул и эффекторных цитокинов, важнейшим из которых является IFN γ [10]. Показано, что IFN γ играет ключевую роль в активации ЕК, он способен модулировать экспрессию каспаз, FasL и TRAIL, стимулируя, таким образом, развитие противовирусного и противоопухолевого иммунного ответа [11]. Выявленное нами у пациенток с лейомиомой матки стабильно малых размеров одновременное повышение уровня ЕК и увеличение выработки ими IFN γ , по-видимому, отражает усиленную активацию ЕК, обусловленную наличием миомы, и является одним из факторов, сдерживающих рост опухоли миометрия. При этом отсутствие изменений в продукции IFN γ , сочетающееся с повышенной экспрессией супрессорного фактора TGF β 1, было отмечено нами у пациенток с быстрорастущей лейомиомой матки.

Как известно, ЕК, локализованные в эндометрии, функционально существенно отличаются от пула периферических CD56+ лимфоцитов. Так, из эндометриальных ЕК формируется уникальный пул децидуальных ЕК, основной функцией которых является регуляция формирования и роста плаценты и сдерживание потенциально опасного для семиаллогенного плода материнского иммунного ответа [12]. Поэтому CD56+ лимфоциты, инфильтрирующие ткань эндометрия в ранние сроки беременности, характеризуются высоким уровнем синтеза и продукции TGF β [13]. Выявленное нами значительное увеличение пула CD56+TGF β 1+ лимфоцитов в эндометрии пациенток с быстро растущей лейомиомой матки свидетельствует о сниженной цитотоксической активности ЕК в данной клинической группе, что в отсутствие беременности может приводить к нарушению распознавания и элиминации трансформированных опухолевых клеток и лежать в основе механизмов быстрого роста лейомиомы матки.

Установленные нами особенности рецепторного репертуара и продукции цитокинов в пуле ЕК у пациенток с различным типом быстрого роста лейомиомы матки подтверждают значимость иммунных реакций, обусловленных лимфоцитами CD56+, в регуляции пролиферации клеток лейомиомы матки. Так, по нашим данным, высокий уровень пролиферативной активности клеток лейомиомы матки ассоциирован с максимально высоким содержанием в эндометрии лимфоцитов CD56+TGF β 1+. Отсутствие активно пролиферирующих клеток в опухоли

ли отмечается при повышенной активации эндометриальных ЕК, о чём свидетельствует сдвиг баланса соотношения ЕК с рецепторами различного типа в сторону доминирования пула ЕК, экспрессирующих активирующие рецепторы.

Таким образом, оценка функционального состояния эндометриальных ЕК у пациенток с лейомиомой матки позволяет судить об активности пролиферативных процессов в ткани миоматозных узлов и даёт нам важную информацию о характере роста опухоли. Выявленные нами особенности мембранной экспрессии рецепторов KIR и внутриклеточной экспрессии IFN γ и TGF β 1 эндометриальными ЕК CD56+ можно использовать в качестве дополнительных диагностических критериев темпа и типа роста лейомиомы.

Выводы. 1. У пациенток с лейомиомой матки вне зависимости от размера опухоли в эндометрии повышено общее количество ЕК CD56+ и увеличено содержание лимфоцитов CD56+CD158i+ и CD56+CD158a+.

2. Отличительной характеристикой пациенток с лейомиомой матки стабильно малых размеров является повышенное количество эндометриальных лимфоцитов CD56+IFN γ +, тогда как развитие быстрого роста опухоли сопровождается увеличением в эндометрии пула ЕК, экспрессирующих TGF β 1.

3. Быстрое увеличение размеров миомы матки за счёт усиленной пролиферации опухолевых клеток ассоциировано со снижением уровня ЕК CD56+ и максимальным повышением содержания лимфоцитов CD56+TGF β 1+ в эндометрии, тогда как рост опухоли преимущественно за счёт накопления компонентов внеклеточного матрикса сопровождается изменением соотношения количества эндометриальных ЕК с активирующими и ингибирующими в сторону преобладания активирующих рецепторов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-13 см. REFERENCES)

1. Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Анциферова Ю.С., Красильникова А.К. Иммуные механизмы быстрого роста миомы матки. Иваново: ОАО «Издательство Иваново»; 2010.

REFERENCES

1. Malysheva, A.I., Sotnikova N.Yu., Antsiferova Yu.S., Krasil'nikova A.K. *Immune mechanisms of rapid growth of uterine fibroids*. [Immunnye mekhanizmy bystrogo rosta miomy матки]. Ivanovo: OAO «Izdatel'stvo Ivanovo»; 2010. (in Russian)
2. Ciarmela P., Islam M.S., Reis F.M., Gray P.C., Bloise E., Petraglia F., et al. Growth factors and myometrium: biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. *Hum. Reprod. Update*. 2011; 17(6): 772-90.
3. Moravek M.B., Yin P., Ono M., Coon J.S., Dyson M.T., Navarro A., et al. Ovarian steroids, stem cells and uterine leiomyoma: therapeutic implications. *Hum. Reprod. Update*. 2015; 21(1):1-12.
4. Kitaya K., Yasuo T. Leukocyte density and composition in human cycling endometrium with uterine fibroids. *Hum. Immunol*. 2010; 71(2): 158-63.
5. Moretta L., Montaldo E., Vacca P., Del Zotto G., Moretta F., Merli P., et al. Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications. *Int. Arch. Allergy Immunol*. 2014; 164(4): 253-64.
6. Del Zotto G., Marcenaro E., Vacca P., Sivori S., Pende D., Della Chiesa M., et al. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clin. Cytom*. 2017; 92(2): 100-14.
7. Paolini R., Bernardini G., Molletta R., Santoni A. et al. NK cells and interferons. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015; 26(2):113-20.
8. Ostapchuk Y.O., Cetin E.A., Perfil'yeva Y.V., Yilmaz A., Skiba Y.A., Chirkin A.P., et al. Peripheral blood NK cells expressing HLA-G, IL-10 and TGF- β in healthy donors and breast cancer patients. *Cell Immunol*. 2015; 298(1-2): 37-46.
9. Boum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Invest*. 1968; 21(97): 77.
10. Fauriat C., Long E.O., Ljunggren H.G., Bryceson Y.T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010; 115(11): 2167-76.
11. Paul S., Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8: Article 1124
12. Sotnikova N., Voronin D., Antsiferova Y., Bukina E. Interaction of decidual CD56+ NK with trophoblast cells during normal pregnancy and recurrent spontaneous abortion at early term of gestation. *Scand J Immunol*. 2014; 80(3): 198-208.
13. Faas M.M., de Vos P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta*. 2017; 56:44-52.

Поступила 14.11.17

Принята к печати 18.11.17

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.697-092:612.6.051:577.21.083

Аксельрод Э.В.¹, Миронов К.О.¹, Михайленко Д.С.^{2,3}, Ефремов Г.Д.³, Перепечин Д.В.³, Алексеев Б.Я.³, Потехина Е.С.¹, Шипулин Г.А.¹

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ МЕТОДИКИ НА ОСНОВЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МИКРОДЕЛЕЦИЙ В Y-ХРОМОСОМЕ

¹ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия;

²НИИ молекулярной медицины ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, Москва, Россия;

³НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава РФ, 105425, Москва, Россия

Одна из распространённых генетических причин идиопатического мужского бесплодия связана с микроделециями в локусе AZF, расположенном в Y-хромосоме. Частота таких микроделений в общей популяции составляет 1:4000, однако у инфертильных мужчин их частота варьирует от 2 до 10%. В локусе AZF различают три субрегиона: AZFa, AZFb и AZFc. Потеря одного или нескольких субрегионов может приводить к различной степени нарушения сперматогенеза – от снижения его активности до Сертולי-клеточного синдрома, выраженного азооспермией или олигоспермией тяжёлой степени. Поэтому проведение генетического тестирования на наличие микроделений в локусе AZF является необходимым тестом при прогнозировании мужского бесплодия и его лечения. Цель настоящего исследования – разработать и апробировать диагностическую систему для выявления микроделений в субрегионах локуса AZF с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. В качестве референсного метода использовали методику, описанную в рекомендациях, выпущенных Европейской академией андрологии (European Academy of Andrology, EAA) совместно с Европейской сетью качества молекулярно-генетических исследований (European Molecular Genetics Quality Network, EMQN) (Krausz C. и соавт., 2014). При апробации методики было проанализировано 33 образца ДНК, выделенных из крови мужчин с азооспермией и олигоспермией тяжёлой степени. В сравнении с референсной методикой дискордантных результатов получено не было. В 27 образцах ДНК выявлены делеции в локусе AZF: 4 делеции AZFa (15%), 2 делеции AZFb (7%), 17 делеций AZFc (63%) и 6 сочетанных делеций AZFb+c и AZFa+b+c (22%). Предлагаемая методика позволяет выявлять микроделеции субрегионов локуса AZF.

Ключевые слова: мужское бесплодие; микроделеции AZF локуса; субрегион AZFa; субрегион AZFb; субрегион AZFc; ИКСИ; ПЦР в режиме реального времени.

Для цитирования: Аксельрод Э.В., Миронов К.О., Михайленко Д.С., Ефремов Г.Д., Перепечин Д.В., Алексеев Б.Я., Потехина Е.С., Шипулин Г.А. Разработка и апробация методики на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для определения клинически значимых микроделений в Y-хромосоме. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (2): 124-128. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-124-128>

Akselrod E.V.¹, Mironov K.O.¹, Mikhailenko D.S.^{2,3}, Efremov G.D.³, Perepechin D.V.³, Alekseev B.Ya.³, Potekhina E.S.¹, Shipulin G.A.¹

THE DEVELOPMENT AND APPROBATION OF METHODOLOGY ON THE BASIS OF MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION IN REAL-TIME TO DETERMINE CLINICALLY SIGNIFICANT MICRO-DELETION IN Y-CHROMOSOME

¹The Federal Budget Institution of Science "The Central Research Institute of Epidemiology" of Rospotrebnadzor, 111123, Moscow, Russia

²The Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "The I.M. Sechenov First Moscow State Medical University" of Minzdrav of Russia, 119991, Moscow, Russia

³The N.A. Lopatkin research institute of urology and intervention radiology - the Branch of The Federal State Budget Scientific Institution "The National Medical Research Center" of Minzdrav of Russia, 105425, Moscow, Russia

One of the prevalent genetic causes of idiopathic male sterility is related to micro-deletions in AZF locus located in Y-chromosome. In total population, rate of such micro-deletions makes up to 1:4000. however, in infertile males their rate varies from 2% to 10%. In AZF locus three subregions are distinguished: AZFa, AZFb and AZFc. The loss of one or several subregions can result in disorder of spermatogenesis of various degree - from decreasing of its activity to Sertoli-cell syndrome manifested by azoospermia or oligospermia of severe degree. Therefore, implementation of genetic testing for presence of micro-deletions in AZF locus is a necessary test in case of prognosis of male sterility and its treatment. The purpose of study is to develop and

test a diagnostic system of detection of micro-deletions in subregions of AZF locus using multiplex polymerase chain reaction in real-time. As a reference method a technique was implemented described in guidelines of the European Academy of Andrology conjointly with European Molecular Genetics Quality Network. The technique testing specified analysis of 33 samples of DNA separated from blood of males with azoospermia and oligospermia of severe degree. No discordant results were received as compared with reference method. In 27 DNA samples the deletions were detected in AZF locus: 4 AZFa deletions (15%), 2 AZFb deletions (7%), 17 AZFc deletions (63%) and 6 combined deletions of AZFb+c and AZFa+b+c (22%). The proposed technique permits detect micro-deletions of subregions of AZF locus.

Key words: male sterility; micro-deletions; AZF locus; subregion AZFa; subregion AZFb; subregion AZFc; polymerase chain reaction in real-time

For citation: Akselrod E.V., Mironov K.O., Mikhailenko D.S., Efremov G.D., Perepechin D.V., Alekseev B.Ya., Potekhina E.S., Shipulin G.A. The development and approbation of methodology on the basis of multiplex polymerase chain reaction in real-time to determine clinically significant micro-deletion in Y-chromosome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(2): 124-128 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-124-128>

For correspondence: Akselrod E.V., researcher of the scientific group of development of new methods of detection of genetic polymorphisms of the Federal Budget Institution of Science "The Central Research Institute of Epidemiology", e-mail: sil-elia@rambler.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 13.09.2017
Accepted 17.11.2017

Введение. Среди основных причин идиопатического мужского бесплодия важную роль играют различные генетические отклонения: хромосомные аномалии, микроструктурные перестройки, генные мутации [1, 2]. Наиболее значимыми являются генетические нарушения в Y-хромосоме [3–6]. К одним из таких нарушений относят микроделеции, располагающиеся в локусе AZF (Azoospermia Factor, фактор азооспермии) на длинном плече Y-хромосомы, содержащем гены, контролирующие сперматогенез [7]. В локусе AZF различают три субрегиона: AZFa, AZFb и AZFc [8, 9]. Микроделеции в локусе AZF встречаются в среднем у одного из 4000 мужчин в общей популяции, а у инфертильных мужчин их частота варьирует от 2 до 10%. Они не обнаруживаются у мужчин с нормозооспермией, но их частота повышена у мужчин с азооспермией (8–12%) и олигоспермией (3–7%) при концентрации спермы менее 5 млн/мл [10, 11].

У бесплодных мужчин наиболее распространены микроделеции в субрегионе AZFc (65–70%), реже – в субрегионах AZFb, AZFb+c, AZFa+b+c (28–30%) и очень редко в субрегионе AZFa (5%) [12]. Потеря всего субрегиона AZFa фенотипически выражается Сертоли-клеточным синдромом (отсутствием половых клеток во всех или части семенных канальцев) и азооспермией, поэтому выделение сперматозоидов из ткани яичка для проведения интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) невозможно. Потеря всего субрегиона AZFb или AZFb+c приводит к Сертоли-клеточному синдрому или блоку сперматогенеза, выраженному азооспермией. В этом случае вероятность получить сперматозоиды из тканей яичка для ИКСИ незначительна и близка к нулю. Потеря всего субрегиона AZFc выражается в широком спектре возможных нарушений сперматогенеза от азооспермии до олигозооспермии и в 50% случаев позволяет получить сперматозоиды из ткани яичка для проведения ИКСИ [13].

Таким образом, проведение генетического тестирования на наличие микроделеций в локусе AZF Y-хромосомы является необходимым как при прогнозировании мужского бесплодия и его лечения, так и при планировании проведения ИКСИ [14, 15].

В 2014 г. были опубликованы рекомендации по

молекулярно-биологической диагностике нарушений сперматогенеза, выпущенные под эгидой Европейской академии андрологии (European Academy of Andrology, EAA) и Европейской сетью качества молекулярно-генетических исследований (European Molecular Genetics Quality Network, EMQN) [16], которые включали базовый и расширенный алгоритмы обследования бесплодных мужчин. Базовый алгоритм содержит 6 основных STS-маркеров: по 2 маркера на каждый субрегион локуса AZF, а расширенный алгоритм, который используют в случае обнаружения микроделеций в локусе AZF базовым методом, содержит дополнительные 13 STS-маркеров, с помощью которых возможно установить точные границы и длины делетированных областей субрегионов локуса AZF, имеющих важное клиническое значение.

В связи с этим цель работы заключалась в разработке и апробации диагностической системы для выявления микроделеций в субрегионах локуса AZF с помощью мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с учетом последних рекомендаций EAA/EMQN.

Материал и методы. Клинические образцы. При апробации методики использовано 33 образца ДНК, выделенных из крови мужчин с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени; образцы предоставлены отделом патологической анатомии с группой молекулярной генетики НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России. Выделение геномной ДНК из цельной крови проводили с помощью набора «Wizard® Genomic DNA Purification Kit» («Promega», США). Клинические образцы были предварительно проанализированы по 12 STS-маркерам (sY83, sY84, sY86, sY127, sY134, sY143, sY152, sY157, sY254, sY255, SRY, AMELX/Y) методом мультиплексной ПЦР в четырех комбинациях анализируемых локусов с последующим разделением продуктов амплификации в полиакриламидном геле. В основе методики – амплификация с праймерами, последовательности которых были опубликованы ранее [17–22].

ПЦР в режиме реального времени. Для определения микроделеций использовали две пентаплексные

Таблица 1

Результаты анализа 33 образцов ДНК на наличие микроделений в локусе AZF

Субрегион локуса AZF						Количество образцов
AZFa		AZFb		AZFc		
Sy84	sY86	sY127	sY134	sY254	sY255	
+	+	—	—	—	—	2
+	+	+	+	—	—	17
—	—	+	+	+	+	4
+	+	—	—	+	+	2
+	+	+	+	+	+	6
—	—	—	—	—	—	2

Примечание. «+» - делеция не найдена, «–» - делеция найдена.

ПЦР-смеси с праймерами и зондами для локусов sY84, sY134, sY255 (ПЦР-смесь 1) и sY86, sY127, sY254 (ПЦР-смесь 2). Каждая ПЦР-смесь содержала праймеры и зонды для амплификации фрагментов генов SR Y (ген Y-хромосомы, определяющий пол) и ZFX/Y (ген «цинковых пальцев», присутствующий на хромосомах Y и X), которые являются внутренними контролями и

позволяют определить соответствие фенотипического пола генетическому.

Амплификацию фрагментов локуса AZF, содержащих субрегионы AZFa, AZFb и AZFc, проводили с помощью приборов «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия) и «Rotor-gene 6000» («Corbett Research», Австралия) по следующей программе: 95°C – 15 мин, далее 45 циклов: 95°C – 10 с и 60°C – 20 с. ПЦР проводили в объёме 25 мкл, состав реакционной смеси содержал смесь 0,44 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0,28 мкМ праймеров, 0,08 мкМ зондов, реагенты «Полимераза Taq-F» – 0,5 мкл, «ОТ-ПЦР-смесь 2-FEP/FRT» – 4,5 мкл и выделенная ДНК – 10 мкл в количестве 10 нг. В качестве положительного образца был использован образец ДНК мужчины, не содержащий делеции, а в качестве отрицательного – образец ДНК женщины.

Учёт результатов проводился по пяти каналам флуоресценции: по каналу Green детектировалось наличие или отсутствие делеций в субрегионе AZFa (маркеры sY84, sY86), Yellow – делеции в субрегионе AZFb (sY127 и sY134), Orange – делеции в субрегионе AZFc (sY254 и sY255), по каналам Red и Crimson проводилась детекция контрольных фрагментов амплификации локусов SR Y и

Таблица 2

Последовательности праймеров и зондов для ПЦР-смесей 1 и 2

Локус	Последовательности олигонуклеотидов (5'–3')*	п.о. ***
sY84 (AZFa)	gCACgAAACATgggCTggAgATT gCCTACTACCTggAggCTTC** (FAM)gggACCCCT(BHQ1)TTCTTTAgTgTCTgCCTAATgC(P)	117
sY134 (AZFb)	ggTTTCATTATCATATCCTCTTTCAgTCAC CTTTTAgAggAATAgTACAggTCAAaggAA (R6G)ggggTTg+AT(BHQ1)+ACT+AA+AgT+TT+AAA+ACATCTgg(P)	122
sY255 (AZFc)	gTTACAggATTCggCgTgAT** CTCgTCATgTgCagCCAC** (ROX)CCgCCAgACgTTCTgAAACTgTggTgg(BHQ2)	114
sY86(AZFa)	CACTTTgCAggACAgAgACTTggTA CTAgCCTCAAggACTgTgAgAATCAA (FAM)ggggCCCAgT(BHQ1)CTTTgggATTTCTTTgTAACAACCTC(P)	110
sY127 (AZFb)	ggCTCACAAACgAAAAgAAA gTgACACAgAAATgCCTTTgTCTT (R6G)gCCCACTgTgTT(BHQ1)CATgCCCAAAAAgAg(P)	134
sY254 (AZFc)	gggTgTTACCAgAAggCAAA** gCAATTCTAAACCTCCAggAAgTAC (ROX)CAgggCCACAT(BHQ2)CCCATgTTCATgATgT(P)	117
SR Y	gCagTTTgCTTCCCgCagAT gCTggTgCTCCATTCTTgAg** (Cy5)CCCgCTTCggTACTCTgCagCgAAgTgC(BHQ2)	114
ZFX/Y	ACCtCTgTACTgACTgTgATTACAC CTCATCrCATCAATggCCTTCT** (Cy5.5)CCACCTggAgAgCCACAAGCTgACCAgC(BHQ2)	110

Примечание. * - перед конформационно-блокированным нуклеотидом стоит знак +; ** – праймеры, взятые из рекомендаций EAA/EMQN [16]; *** – количество пар нуклеотидных оснований (п.о.) амплифицируемого фрагмента.

ZFX/Y соответственно. При накоплении сигнала флуоресценции по каналам Green, Yellow и Orange результат интерпретировался как отрицательный (отсутствие микроделений в субрегионах AZF локуса); при положительных сигналах флуоресценции по каналам Red и Crimson и отсутствие сигнала накопления флуоресценции по каналам Green, Yellow или Orange интерпретировалось как наличие микроделений в субрегионах AZF локуса.

Метод сравнения. В качестве метода сравнения использована методика, рекомендованная EAA/EMQN [16], со следующими изменениями: объем ПЦР-смеси составил 25 мкл, амплификация фрагментов проводилась на приборе «Терцик» («ДНК-технология», Россия), продукты разделялись в 1,7% агарозном геле.

Результаты. Разработана методика на основе ПЦР в режиме реального времени, позволяющая выявлять микроделения субрегионов AZFa, AZFb и AZFc локуса AZF. Проанализировано по два локуса из каждого субрегиона: sY84 и sY86 (субрегион AZFa), sY127 и sY134 (субрегион AZFb) и sY254 и sY255 (субрегион AZFc).

На первом этапе проведена апробация разработанной методики на образцах ДНК, полученных от мужчин, у которых отсутствовали микроделения в локусе AZF (положительный контроль) и от женщин (отрицательный контроль). В результате для образцов ДНК, полученных от мужчин, наблюдалось накопление флуоресценции по всем пяти каналам детекции, что свидетельствовало об отсутствии микроделений в локусе AZF. В образцах ДНК, полученных от женщин, накопление флуоресценции наблюдалось только по каналу Crimson, по которому определялась мишень ZFX/Y.

На втором этапе было исследовано 33 образца ДНК, полученных от мужчин с азооспермией и олигозооспермией тяжелой степени. Делеции локуса AZF были подтверждены в 27 образцах. Образцы были проанализированы параллельно с помощью двух ПЦР-методик, дискордантных результатов получено не было. В четырех образцах были найдены делеции субрегиона AZFa, в двух образцах – субрегиона AZFb, в 17 образцах – субрегиона AZFc. В двух образцах были найдены делеции субрегионов AZFb и AZFc (AZFb+c) и в двух других образцах – трех субрегионов (AZFa+b+c). В остальных шести образцах ДНК ни в одном из субрегионов локуса AZF микроделений найдено не было. Результаты анализа локуса AZF представлены в табл. 1.

Обсуждение. Согласно существующим рекомендациям EAA/EMQN по молекулярно-биологической диагностике нарушений сперматогенеза [16], базовый алгоритм обследования бесплодных мужчин включает анализ шести STS-маркёров: sY84 и sY86 для субрегиона AZFa, sY127 и sY134 для субрегиона AZFb и sY254 и sY255 для субрегиона AZFc. Расширенный анализ, который рекомендован в случае обнаружения микроделений в ходе базового анализа, включает исследование дополнительных маркёров для каждого субрегиона: sY82, sY83/sY1064, sY1065/sY1182, sY88 – для субрегиона AZFa, sY105, sY121/sY1224, sY143/sY1192, sY153 – для субрегиона AZFb и sY160 – для субрегиона AZFc.

По данным EAA/EMQN более 95% известных микроделений локуса AZF хромосомы Y могут быть определены при детекции STS-маркёров sY84 и sY86 (субрегион AZFa), sY127 и sY134 (субрегион AZFb) и sY254 и sY255 (субрегион AZFc) [16], поэтому при разработке данной методики было выбрано шесть рекомендованных STS-

маркёров базового анализа. Разработанная методика предполагает использование лишь части праймеров, рекомендованных EAA/EMQN для проведения базового анализа [16] (табл. 2). Необходимость модификации остальных праймеров была связана с изменённым способом детекции продукта амплификации – проведением ПЦР в режиме реального времени.

В результате апробации методики с использованием образцов ДНК, полученных от мужчин с азооспермией и олигоспермией тяжелой степени, было подтверждено наличие мутаций в 27(82%) образцах из 33. Согласно многочисленным исследованиям, у 10–20% мужчин с делециями в локусе AZF наиболее часто микроделения выявляются в субрегионе AZFc [23–25]. Это подтверждается и полученными нами данными: микроделения в субрегионе AZFc встречались в 17(63%) из 27 образцов ДНК. В 4(15%) образцах ДНК с выявленными делециями была подтверждена микроделения в субрегионе AZFa, что встречается существенно реже – у 1–5% мужчин с делециями в локусе AZF [26]. Сочетанные микроделения субрегионов AZFb, AZFb+c, AZFa+b+c были обнаружены в 6(22%) образцах ДНК.

Разработанная методика обладает всеми стандартными преимуществами ПЦР в режиме реального времени в сравнении с ПЦР, основанной на детекции продуктов с помощью электрофореза, главными из этих преимуществ являются время проведения анализа, меньшее количество этапов (трудоемкость) и более низкая контаминационная опасность. Предлагаемая методика, в отличие от протокола, рекомендованного EAA/EMQN [16], не предполагает исследования дополнительных мишеней, поэтому для решения диагностических задач, выходящих за рамки базового исследования распространенных микроделений субрегионов AZFa, AZFb и AZFc, может быть дополнительно (как отдельно, так и в комплексе) использован рекомендованный EAA/EMQN расширенный алгоритм исследования [16].

Заключение. Предлагаемая методика может быть использована как базовый диагностический инструмент для выявления микроделений субрегионов AZFa, AZFb и AZFc локуса AZF при проведении молекулярно-генетической диагностики мужского бесплодия.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1 – 9, 16 – 26 см. REFERENCES)

10. Черных В.Б. AZF делеции – частая генетическая причина бесплодия у мужчин: современное состояние исследований. *Проблемы репродукции*. 2009; (1): 10–5.
11. Черных В. Б. Аномалии половых хромосом при нарушениях формирования пола и репродукции человека: Дисс.... д-ра мед. наук. М.; 2015.
12. Тулеева Л.Н., Аралбаева А.Н. Роль делеций гена AZFc в развитии мужского бесплодия. *Андрология*. 2015; (7): 42–5.
13. Барков И.Ю., Сорока Н.Е., Попова А.Ю., Гамидов С.И., Беляева Н.А., Глинкина Ж.И. и др. Диагностика мужского бесплодия, ассоциированного с микроделениями в локусе AZF хромосомы Y. *Акушерство и гинекология*. 2014; (1): 59–64.
14. Черных В.Б., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Ширшова Л.С., Чухрова А.Л., Ковалевская Т.С., и др. Анализ микроделений в локусе AZF у мужчин с бесплодием: совместный опыт исследования. *Медицинская генетика*. 2003; (8): 367–79.

15. Беляева Н.А., Глинкина Ж.И., Калинина Е.А. Современные аспекты проблемы мужского бесплодия, ассоциированного с мутацией AZF локуса хромосомы Y. *Акушерство и гинекология*. 2012; 8(2): 21-7.

REFERENCES

1. Katherine L., O'Brien K.L., Varghese A.C., Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertil. Steril.* 2010; 93(1): 1-12.
2. Stouffs K., Seneca S., Lissens W. Genetic causes of male infertility. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 2014; 75(2): 109-11.
- Massart A., Lissens W., Tournaye H., Stouffs K. Genetic causes of spermatogenic failure. *Asian J. Androl.* 2012; 14(1): 40-8.
3. Ghorbel M., Gargouri Baklouti S., Ben Abdallah F., Zribi N., Cherif M., Keskes R. et al. Chromosomal defects in infertile men with poor semen quality. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2012; 29(5): 451-56.
4. Foresta C., Moro E., Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 2001; 22 (2): 226-39.
5. Liu X.G., Hu H.Y., Guo Y.H., Sun Y.P. Correlation between Y chromosome microdeletion and male infertility. *Genet. Mol. Res.* 2016; 15 (2).
6. Tiepolo L., Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome. *Hum. Genet.* 1976; 34(2): 119-24.
7. Navarro-Costa P., Plancha C.E., Goncalves J. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 936569.
8. Yu X.W., Wei Z.T., Jiang Y.T., Zhang S.L. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(9): 14634-46.
9. Chernykh V.B. AZF deletions - a frequent genetic cause of infertility in men: the current state of research. *Problemy reproduktivnoy meditsiny*. 2009; (1): 10-5. (in Russian)
10. Chernykh V.B. *Anomalies of sex chromosomes in disorders of sex formation and human reproduction*. Diss. Moscow; 2015. (in Russian)
11. Tuleeva L.N., Aralbaeva A.N. The role of deletions of the AZFc gene in the development of male infertility. *Andrologiya*. 2015; (7): 42-5. (in Russian)
12. Barkov I.Yu., Soroka N.E., Popova A.Yu., Gamidov S.I., Belyaeva N.A., Glinkina Zh.I. et al. Diagnosis of male infertility associated with microdeletions in the AZF locus of Y chromosome. *Akusherstvo i Ginekologiya*. 2014; (1): 59-64. (in Russian)
13. Chernykh V.B., Kurilo L.F., Shileyko L.V., Shirshova L.S., Chukhrova A.L., Kovalevskaya T.S. et al. Analysis of microdeletions in the AZF locus in men with infertility: joint research studies. *Meditsinskaya genetika*. 2003; (8): 367-79. (in Russian)
14. Belyaeva N.A., Glinkina Zh.I., Kalinina E.A. Modern aspects of the problem of male infertility associated with the AZF mutation of the chromosome Y locus. *Akusherstvo i Ginekologiya*. 2012; 8(2): 21-7. (in Russian)
15. Krausz C., Hoefsloot L., Simoni M., Tüttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*. 2014; 2(1): 5-19.
16. Suganthi R., Vijesh V., Jayachandran S., Fathima Benazir J.A. Multiplex PCR based screening for microdeletions in azoospermia factor region of Y chromosome in azoospermic and severe oligozoospermic south Indian men. *Iran. J. Reprod. Med.* 2013; 11(3): 219-26.
17. Wettasinghe T.K., Jayasekara R.W., Dissanayake V.H. Y chromosome microdeletions are not associated with spontaneous recurrent pregnancy loss in a Sinhalese population in Sri Lanka. *Hum. Reprod.* 2010; 25(12): 3152-6.
18. Shimizu A., Ichikawa T., Suzuki N., Yamazaki T., Imamoto T., Kojima S. et al. Microdeletions in the Y chromosome of patients with idiopathic azoospermia. *Asian. J. Androl.* 2002; 4(2): 111-5.
19. Zaimy M.A., Kalantar S.M., Sheikhha M.H., Jahaninejad T., Pashaiefar H., Ghasemzadeh J. et al. The frequency of Yq microdeletion in azoospermic and oligospermic Iranian infertile men. *Iran. J. Reprod. Med.* 2013; 11(6): 453-8.
20. Peng D., Zhang Y.S., Zhang X.Y., Hu C., Liu M.H., Liu R.Z. An infertile 45, X male with a SRY-bearing chromosome 13: a clinical case report and literature review. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2015; 32(1): 107-9.
21. Renwick P.J., Trussler J., Ostad-Saffari E., Fassihi H., Black C., Braude P. et al. Proof of principle and first cases using preimplantation genetic haplotyping-a paradigm shift for embryo diagnosis. *Reprod. Biomed. Online*. 2006; 13(1): 110-9.
22. Poongothai J., Gopenath T.S., Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med. J.* 2009; 50(4): 336-47.
23. Navarro-Costa P., Goncalves J., Plancha C.E. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Hum. Reprod. Update*. 2010; 16(5): 525-42.
24. Yu X.W., Wei Z.T., Jiang Y.T., Zhang S.L. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(9): 14634-46.
25. Hopps C.V., Mielnik A., Goldstein M., Palermo G.D., Rosenwaks Z., Schlegel P.N. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum. Reprod.* 2003; 18(8): 1660-5.

Поступила 13.09.17
Принята к печати 17.11.17



Рис. 1. Среда Эндо. Посев штрихом референс-штаммов *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. mirabilis* (наличие сплошной пленки из-за «роения» *P. mirabilis*).

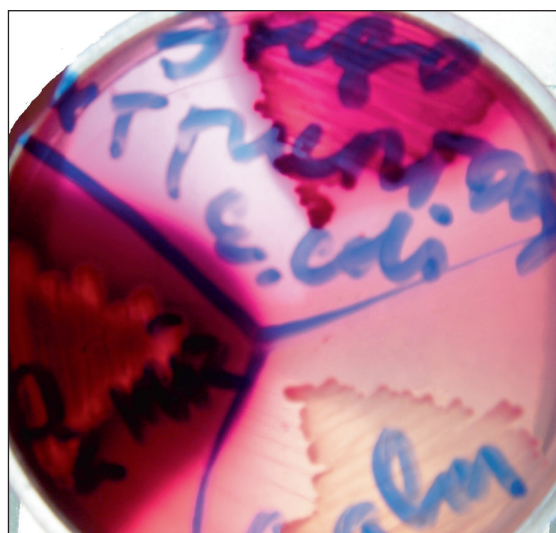


Рис. 2. Усовершенствованная среда Эндо. Посев штрихом референс-штаммов *E. coli* (красные колонии), *S. typhimurium* (бесцветные колонии), *P. mirabilis* (вишнёво-коричневые с таким же преципитатом). Здесь и на рис. 3, 5: отсутствует пленка за счёт ингибирования «роения» *P. mirabilis*.

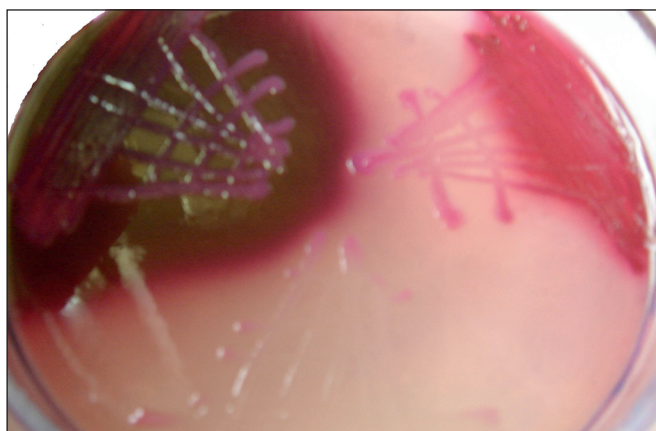


Рис. 3. Усовершенствованная среда Эндо. Посев штрихом референс-штаммов *E. coli* (красные колонии), *S. typhimurium* (бесцветные колонии), *P. mirabilis* (вишнёво-коричневые с таким же преципитатом) (открытая чашка Петри).

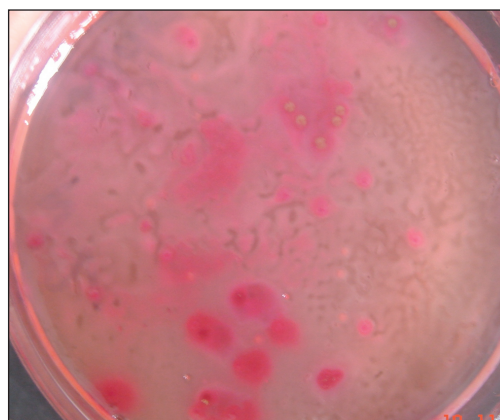


Рис. 4. Среда Эндо. Посев из разведения 10^{-6} референс-штаммов *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. mirabilis* (наличие сплошной плёнки из-за «роения» *P. mirabilis*).



Рис. 5. Усовершенствованная среда Эндо. Посев из разведения 10^{-6} референс-штаммов *E. coli* (красные колонии), *S. typhimurium* (бесцветные колонии), *P. mirabilis* (вишнёво-коричневые с таким же преципитатом).