

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
3 • 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

МАРТ

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 20.02.2018.

Подписано в печать 20.03.2018.

Формат 60 × 88¹/₈.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Усл. печ. л. 8,33.

Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-medsina@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. № 3. 129–192.

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"

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 63
3 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

MARCH

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. MAVZYTTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV
(*Moscow*), D.D. MEN'SHIKOV (*Moscow*), V.I. NIGULYANU
(*Kishinev*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN
(*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. 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., Рожкова Т.А., Каминная В.И. Биологическая роль инсулина: превращение плотоядных в океане в травоядных на суше. Становление функции локомоции и кинетические параметры организма 132
- Ариповский А.В., Колесник П.О., Кулагина Т.П., Титов В.Н. Подготовка проб для газохроматографического определения жирных кислот: преимущества безэкстракционного метода с прямой переэтерификацией липидов высушенных биологических проб 141
- Сулейманов С.И., Кадыров З.А., Рамишвили В.Ш. Обоснование эффективности современных методов лабораторного контроля при проведении метафилактических мероприятий у пациентов с различными формами мочекаменной болезни 148
- Муркамилов И.Т., Айтбаев К.А., Фомин В.В., Муркамилова Ж.А., Райимжанов З.Р., Реджапова Н.А., Юсупов Ф.А., Айдаров З.А. Гендерные особенности нарушений состава липидов сыворотки крови у больных с хронической патологией почек 152
- Аверьянова И.В. Возрастная динамика характеристик метаболизма липидов и углеводов у юношей Северо-Востока России 159
- Соснин Д.Ю., Гилева О.С., Мозговая Л.А., Сивак Е.Ю., Белева Н.С., Кривцов А.В., Поздин Н.В. NT-проBNP в слюне и сыворотке крови в норме и при пародонтите 164

ЦИТОЛОГИЯ

- Савостикова М.В., Кудайбергенова А.Г., Федосеева Е.С., Фурминская Е.Ю. Парижская система интерпретации уринарной цитопатологии 169

ИММУНОЛОГИЯ

- Федулкина В.А., Кофиади И.А., Ватазин А.В., Кильдюшевский А.В., Чукурина Ю.Ю., Зулкарнаев А.Б. Разработка метода оценки уровня экспрессии генов, ответственных за активацию и ингибирование Т-клеточного ответа у реципиентов почечного трансплантата при проведении экстракорпоральной фотохимиотерапии 173
- Бекман Н.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Мультиплексный анализ наркотических средств на основе технологии иммуночипов Фосфан 178
- Личная Е.В., Климашевская С.В., Обрядина А.П., Вербов В.Н., Белопольская М.А., Эсауленко Е.В., Калинина О.В. Определение антител к белку F вируса гепатита С методом иммуноферментного анализа с использованием синтетического пептида 183

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Волков А.Н., Хабиева С.М., Смирнова Е.Ю., Ларионов А.В. Генодиагностика мутаций UGT1A1 в практике современной медицины 186

BIOCHEMISTRY

- Titov V. N., Rozhkova T. A., Kaminnaya V. A. Biological role of insulin: transformation of carnivores leaving in the ocean into herbivores living on the dry land. Development of the biological function of locomotion and kinetic parameters of the body 132
- Aripovsky A. V., Kolesnik P. O., Kulagina T. P., Titov V. N. Preparation of samples for gas-chromatographic determination of fatty acids: direct transesterification of lipids of a dry biological sample is preferred in comparison with the methods employing preliminary lipid extraction 141
- Suleymanov S. I., Kadyrov Z. A., Ramishvili V. Sh. The substantiation of efficiency of modern techniques of laboratory control under implementation of metaphylactic activities in patients with various forms of urolithiasis 148
- Murkamilov I. T., Aytabaiev K. A., Fomin V. V., Murkamilova Zh. A., Rayimjanov Z. R., Redjapova N. A., Yusupov F. A., Aydarov Z. A. The gender features of disorders of composition of lipids of blood serum in patients with chronic pathology of kidneys 152
- Averyanova I. V. The age dynamics of characteristics of metabolism of lipids and carbohydrates in male youths of the North-East of Russia 159
- Sosnin D. Yu., Gileva O. S., Mozgovaya L. A., Sivak E. Yu., Beleva N. S., Krivtsov A. V., Pozdin N. V. The NT-proBNP in saliva and blood serum in norm and under periodontitis 164

CYTOLOGY

- Savostikova M. V., Kudaybergenova A. G., Fedoseeva E. S., Furminskaya E. Yu. The Paris system of interpretation of urinary cytopathology 169

IMMUNOLOGY

- Fedulkina V. A., Kofiadi I. A., Vatazin A. V., Kildyushevsky A. V., Chuksina Yu. Yu., Zulkarnaev A. B. The development of technique of evaluation of genes' expression level responsible for activation and inhibition of T-cell response in recipients of renal transplant under application of extra-corporal photochemotherapy 173
- Bekman N. I., Pomelova V. G., Osin N. S. The multiplex analysis of drug medications on the basis of technology of immunochips Phosphan 178
- Lichnaia E. V., Klimashevskaya S. V., Obryadina A. P., Verbov V. N., Belopolskaya M. A., Esaulenko E. V., Kalinina O. V. The detection of antibodies to HCV F protein with immune enzyme analysis using synthetic peptide 183

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Volkov A. N., Khabieva S. M., Smirnova E. Yu., Larionov A. V. The genetic diagnostics of mutations UGT1A1 in practice of modern medicine 186

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.018.2:577.175.722

Титов В.Н., Рожкова Т.А., Каминная В.И.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ИНСУЛИНА: ПРЕВРАЩЕНИЕ ПЛОТОЯДНЫХ В ОКЕАНЕ В ТРАВояДНЫХ НА СУШЕ. СТАНОВЛЕНИЕ ФУНКЦИИ ЛОКОМОЦИИ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ОРГАНИЗМА

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

Филогенетическая теория общей патологии концентрирует внимание исследователей на следующих аспектах биологического действия инсулина. 1. На ступенях филогенеза инсулин предназначен *in vivo* в первую очередь для регуляции метаболизма жирных кислот (ЖК) и во вторую – для метаболизма глюкозы; клетки начали регулировать метаболизм ЖК на миллионы лет раньше, чем глюкозы. Поздний в филогенезе инсулин блокирует липолиз только в поздних инсулинозависимых подкожных адипоцитах, но не в ранних в филогенезе висцеральных жировых клетках сальника. 2. Биологическая роль инсулина – формирование *in vivo* биологической функции локомоции, движения за счет сокращения поперечно-полосатых миоцитов и обеспечения их субстратами (ЖК и глюкоза) для наработки энергии в форме макроэргического аденозинтрифосфата. 3. Биологическое предназначение позднего в филогенезе инсулина – превращение плотоядных (рыбоядных) животных в океане в травоядных на суше; синтез *in vivo* эндогенных ЖК из принятой с пищей глюкозы. 4. Инсулин сформировал *in vivo* высокоэффективный олеиновый вариант метаболизма ЖК взамен более раннего в филогенезе, менее эффективного пальмитинового. 5. Биологически инсулин предназначен для обеспечения клеток энергией, для совершенствования физической активности и кинетических параметров организма. Согласно филогенетической теории общей патологии, основам эндокринологии, в клинике мы имеем дело с: 1) редкими случаями структурно обусловленного, инсулинодефицитного сахарного диабета 1-го типа; 2) столь же редкими случаями структурно обусловленного (патология рецептора), но гиперинсулинемического диабета 2-го типа и 3) большим числом пациентов с функциональными нарушениями действия гормона, с синдромом ИР, в частности у пациентов с метаболическим синдромом и пациентов с ожирением. Оптимально пища травоядных, мы полагаем, может содержать такое количество пальмитиновой НЖК, которое гепатоциты могут этерифицировать в состав олеиновых ЛПОНП, а клетки поглотить в олеиновых, лигандных ЛПОНП путём апоЕ/В-100 эндоцитоза без образования ЛПНП.

Ключевые слова: инсулин; неэтерифицированные жирные кислоты; филогенез; резистентность к инсулину.

Для цитирования: Титов В.Н., Рожкова Т.А., Каминная В.И. Биологическая роль инсулина: превращение плотоядных в океане в травоядных на суше. Становление функции локомоции и кинетические параметры организма. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(3): 132-141. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-132-141>

V. N. Titov, T. A. Rozhkova, V. A. Kaminnaya

BIOLOGICAL ROLE OF INSULIN: TRANSFORMATION OF CARNIVORES LEAVING IN THE OCEAN INTO HERBIVORES LIVING ON THE DRY LAND. DEVELOPMENT OF THE BIOLOGICAL FUNCTION OF LOCOMOTION AND KINETIC PARAMETERS OF THE BODY

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

Phylogenetic theory of general pathology draws researchers' attention to the following aspects of the biological effects of insulin. 1. Phylogenetically, in vivo insulin is primarily involved in the metabolism of fatty acids (FA) and only in the second turn in glucose metabolism; regulation of FA metabolism in cells started millions of years earlier than that of glucose metabolism. Phylogenetically late insulin blocks lipolysis only in phylogenetically late insulin-dependent subcutaneous adipocytes but not in phylogenetically early visceral fat cells of the omentum. 2. Biological role of insulin consists in the formation of the biological function of locomotion, i.e., movement arising from contraction of striated myocytes provided with substrates (FA and glucose) for energy production as macroergic ATP. 3. Biological destiny of phylogenetically late insulin is transformation of carnivorous (fish-eating) animals living in the ocean into herbivores living on the dry land. 4. Insulin has formed in vivo highly efficient oleic variant of FA metabolism instead of phylogenetically early less efficient palmitic variant. 5. Biologically, insulin is destined for providing cells with energy and perfection of physical activity and kinetic parameters of the organism. According to phylogenetic theory of general pathology and basic principles of endocrinology, clinical cases should be regarded as: 1. rare structurally-related insulin-deficient type I diabetes mellitus, 2. rare structurally-related (receptor pathology) hyperinsulinemic type II diabetes mellitus, and 3. a great number of patients with functional disorders in the hormone activity, insulin resistance syndrome, metabolic syndrome and obesity. We believe that the food of herbivores should contain palmitic acid in the amounts that hepatocytes can esterify into oleic very low density lipoproteins and cells can internalize as ligand oleic by apoE/B-100 endocytosis without formation of low density lipoproteins.

Key words: insulin, unesterified fatty acids, phylogenesis, insulin resistance.

Для корреспонденции: Титов Владимир Николаевич, д-р мед. наук, проф., рук. лаборатории клин. биохимии липопротеинов Института клинической кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ; e-mail: vn_titov@mail.ru

For correspondence: Titov Vladimir Nikolaevich, doctor of medical sciences, professor; e-mail: vn_titov@mail.ru

For citation: Titov V.N., Rozhkova T.A., V.A. Kaminnaya, I.B. Biological role of insulin: transformation of carnivores leaving in the ocean into herbivores living on the dry land. Development of the biological function of locomotion and kinetic parameters of the body. *Kinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63(3): 132-141. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-132-141>

Acknowledgment. This study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interests.

Received 25.08.2017

Accepted 30.08.2017

В 2012 г., через 160 лет после Р. Вирхова и его клеточной теории общей патологии, мы опубликовали иную филогенетическую теорию общей патологии [1]. В её свете на ступенях филогенеза (общего анамнеза всего живого) и в онтогенезе (анамнезе особи) биологическое предназначение инсулина и его роль в регуляции метаболизма, в обеспечении клеток энергией протупает более рельефно. Филогенетическая теория общей патологии концентрирует внимание исследователей на следующих аспектах биологического действия инсулина.

1. На ступенях филогенеза инсулин предназначен *in vivo* в первую очередь для регуляции метаболизма жирных кислот (ЖК) и во вторую – для метаболизма глюкозы; клетки начали регулировать метаболизм ЖК на миллионы лет раньше, чем глюкозы. Поздний в филогенезе инсулин блокирует липолиз только в поздних инсулинозависимых подкожных адипоцитах (ИПА), но не в ранних в филогенезе висцеральных жировых клетках (ВЖК) сальника.

2. Биологическая роль инсулина – формирование *in vivo* биологической функции локомоции, движения за счёт сокращения поперечнополосатых миоцитов и обеспечения их субстратами (ЖК и глюкоза) для наработки энергии в форме макроэргического аденозинтрифосфата (АТФ).

3. Биологическое предназначение позднего в филогенезе инсулина – превращение плотоядных (рыбоядных) животных из океана в травоядные на суше; синтез *in vivo* эндогенных ЖК из принятой с пищей глюкозы.

4. Инсулин сформировал *in vivo* высокоэффективный олеиновый вариант метаболизма ЖК взамен более раннего в филогенезе, менее эффективного пальмитинового.

5. Биологически инсулин предназначен для обеспечения клеток энергией, для совершенствования кинетических, физических параметров организма.

Становление на ступенях филогенеза биологической функции инсулина. Если в течение 9 нед беременности у собак в динамике методами иммуноморфологии проследить сроки формирования в островках Лангерганса поджелудочной железы α - и β -клеток на основании эндокринной функции можно отметить, что α -клетки начинают функционировать на 2 нед раньше, чем β -клетки. Используем постулат общей биологии Э. Геккеля, согласно которому онтогенез повторяет основные этапы филогенеза: если экстраполировать временные различия в онтогенезе на продолжительность филогенеза (≈ 4 млрд лет), можно полагать, что секрецию глюкагона α -клетки начали на миллионы лет ранее секреции β -клетками инсулина [2].

Первыми живыми организмами на земле были анаэробные гетеротрофы археи; потребности в энергии одноклеточные удовлетворяли за счёт β -окисления в митохондриях активированной уксусной кислоты, ацетил-КоА и образования макроэргических АТФ [3]. Все химические реакции в то время протекали в анаэробной среде, в отсутствие O_2 ; согласно биогеохимической теории В.И. Вернадского; первые глубоководные гетеротрофы окисляли С4 КТ и миллионы лет глюкозу не синтезировали вообще [4]. Для наработки АТФ археи использовали только ацетил-КоА, которые образуют митохондрии при окислении КТ и С6-С10 короткоцепочечных ЖК в анаэробном, биохимическом цикле трикарбоновых кислот и в физико-химических реакциях дыхательной цепи.

Через сотни миллионов лет, когда в океане накопилось достаточное количество биологического субстрата (белков) для формирования новых клеток, в тёплых и солнечных акваториях океана произошло зарождение и становление иных одноклеточных. Они развивались как автотрофы и стали синтезировать глюкозу *in situ de novo* из CO_2 и H_2O . Химическая реализация идеи потребовала создания исполнительных механизмов – формирования хлорофилла в пластидах цитоплазмы и сложных механизмов сочетанной регуляции физико-химических и биохимических процессов, прообраза будущих нейронных цепей.

Общее уравнение реакции синтеза глюкозы, протекающей в присутствии хлорофилла: $6CO_2 + 6H_2O + h\nu$ (квант света) $\rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2$. Глюкозу – основной продукт фотосинтеза образуют клетки в цикле Кальвина; для получения энергии автотрофы стали использовать химический потенциал глюкозы и её полимера; глюкоза для автотрофов – универсальный субстрат для наработки энергии в реакциях метаболизма. Пути химической утилизации глюкозы, вероятно, были многообразны, начиная от анаэробного гликолиза и кончая более выгодным (на порядок) аэробным окислением. В них и происходит последний этап превращения энергии излучения солнца в химическую энергию макроэргического АТФ. В «темновой» части схемы расщепление макроэргических связей АТФ позволяет осуществить гидролиз воды до электро-нейтрального O_2 , протона и электрона.

Молекулярный O_2 освобождается в окружающую среду, в которой возрастает его концентрация. И протоны H^+ и энергию АТФ используют клетки для синтеза глюкозы в пентозофосфатном цикле Кальвина: итогом становится конденсация 2 С3 метаболитов углеводов с образованием глюкозы – универсального С6-субстрата. Из неё автотрофы образуют фруктозу, сахарозу, многоатомные спирты-полиолы (этиленгликоль, глицерин, ксилит, сорбит) и С4 КТ [5]. Из глюкозы же, переводя её в ацетил-КоА, они синтезируют и ЖК: одноклеточные автотрофы депонируют ЖК в цитоплазме в форме гидрофобных эфиров – ТГ.

Митохондрий у автотрофов нет: для наработки энергии автотрофы задействовали пируватдегидрогеназный (ПДГ) комплекс; в цитоплазме он осуществляет декарбоксилирование пирувата с образованием ацетил-КоА. Каскад биохимических реакций восстановительного синтеза глюкозы из исходных окисленных фрагментов, из CO_2 и H_2O автотрофы совершенствовали в течение миллионов лет. Можно полагать, что создание столь сложной последовательности гармонически сопряжённых физико-химических и биохимических процессов, потребовало от автотрофов создания иных систем регуляции метаболизма, первоначальных нейронных сетей. Они-то, можно полагать, и стали прародителями нейронов, всех клеток и функций нервной системы в целом. Реакции декарбоксилирования пировиноградной кислоты (пирувата), переноса ацетильной группы к коэнзиму А (КоА) и её связывания коферментом осуществлены с участием трех ферментов и коферментов. Предшественниками четырех являются витамины: тиамин, рибофлавин, никотинамид и пантотеновая кислота. При высокой концентрации пирувата в реакционной среде количественное превращение лактата в пировиноградную кислоту останавливается.

Со временем в мировом океане стали доминировать автотрофы; они синтезировали и отладили метаболизм глюкозы: а) из пирувата синтезировали ацетил-КоА и ЖК, усовершенствовали плазматическую мембрану, которая состоит из разных по структуре фосфолипидов, более гидрофобных доменов – рафтов, однослойной (двухслойной) мембраны клеточных органелл. Автотрофы стали запасать глюкозу в форме полимера гликогена в цитоплазме и депонировать ЖК в форме ТГ в каплях липидов. Стараниями автотрофов стало возможно реализовать аэробные биохимические процессы; эпоха анаэробных архей заканчивалась.

Драматичная ситуация в биологии разрешилась путём симбиотического слияния, биологической реакции экзозитоза: автотрофные одноклеточные фактически поглотили архей, симбиотически «приватизировали» все их субклеточные органеллы, включая митохондрии вместе с геномом и пероксисомы. Симбионты при этом остались анаэробными автотрофами; митохондрии их сохранили способность осуществлять уже аэробные реакции. Это касается, в частности, образование ацетил-КоА из пирувата в ПДГ комплексе цитоплазмы, превращение его в биохимическом цикле Кребса, в физико-химических реакциях «дыхательной цепи» и синтез АТФ. Со временем, часть генов митохондрий переместилась в геном симбионтов; в то же время за экспрессию протеинов дыхательной цепи, а также синтез специфичных ФЛ внутренней мембраны митохондрий – кардиолипидов, продолжают сами митохондрии [6]. Со временем установились тесные субстратные связи ПДГ комплекса автотрофов в цитоплазме с матриксом митохондрий.

Биохимические последствия симбиотического слияния следующие: митохондрии как и прежде нарабатывают АТФ, осуществляют метаболизм энергоемких субстратов (ЖК и глюкозу) после превращения и ЖК и глюкозы в ацетил-КоА. В цитоплазме клетки могут гидролизовать глюкозу в отсутствие O_2 в ходе реакции гликолиза: анаэробные биохимические реакции гликолиза останавливаются на пути гликоген → глюкоза → лактат. Ни скелетные миоциты, ни кардиомиоциты метаболизировать молочную кислоту (лактат) не могут. Превращение лактата в пируват и биохимические реакции восстановления в глюкозу, осуществляют только гепатоциты в цикле Кори. Количество АТФ, которое продуцируют митохондрии при окислении глюкозы, оказывается много больше, когда последовательно клетки реализуют функцию ПДГ комплекса и митохондрии [7].

Гидролиз глюкозы в цитоплазме клеток с образованием двух молекул пирувата является гликолизом (от греч. *γλυκός* — сладкий и *ὑσσις* — расщепление), путём Эмбдена-Мейергофа. Гликолиз включает десять последовательных реакций и сопровождается образованием двух молекул АТФ. Гликолиз является филогенетически ранним, наиболее востребованным путём утилизации клетками глюкозы в отсутствии кислорода в анаэробных условиях. В аэробных условиях происходит много более эффективное декарбоксилирование пирувата в ПДГ комплексе, образование ацетил-КоА и метаболическое превращение его в цикле Кребса и дыхательной цепи митохондрий с образованием много большего числа АТФ.

Становление аэробного варианта метаболизма глюкозы имеет большое значение в эволюции симбионтов. Если энергетика бескислородного (анаэробного) метаболизма глюкозы (гликолиза) составляет всего 200 кДж/моль, то в ходе O_2 - процесса освобождается 2600 кДж/моль, т. е. в 13 раз больше. Анаэробный гликолиз в цитоплазме приводит к образованию двух мол. АТФ, ав аэробных условиях (сочетание функций ПДГ комплекса и митохондрии) АТФ образуется в 18 раз больше. В ходе аэробного окисления глюкозы в клетке более 90% преобразуется в энергию макроэргических связей АТФ. Вне сомнения, АТФ является эффективным переносчиком энергии в биохимических процессах. Однако АТФ запасает эту энергию лишь кратковременно, превращаясь при этом в

аденозиндифосфат (АДФ). Поэтому клетки лишены возможности запастись энергией в форме АТФ; запасают они энергию в цитоплазме только в форме высокоэнергетических субстратов химической природы. Субстратами являются насыщенные ЖК (НЖК), моновенасыщенные ЖК (МЖК) в форме гидрофобных ТГ и глюкоза в форме гидрофильного гликогена.

Это в полной мере относится и к функции цикла Кребса в митохондриях. В них реализован аллостерический (по механизму обратной связи) тип регуляции, при котором активность ключевого фермента реакции аллостерически тормозит накопление конечных продуктов реакции. В это же время произошло становление регуляции, которую именуют циклом Рендла, когда на аутокринном уровне клетки одновременно используют лишь один из субстратов окисления (ЖК или глюкоза). Клетки эффективно переключают процесс окисления ЖК на окисление глюкозы (и наоборот) в зависимости от доступности и реальной концентрации субстратов в цитоплазме. Происходит это только на уровне клетки, только на первом уровне относительного биологического совершенства.

Взаимоотношение ЖК → глюкоза → ЖК на аутокринном уровне регуляции метаболизма. *In vivo* формируются два пула молекул ацетил-КоА (химически они, естественно, неразличимы): в одном случае ацетил-КоА образован при окислении КТ и ЖК, в другом – сформирован по схеме реакций в составе ПДГ комплекса первоначально из глюкозы. Мы полагаем, что все соматические клетки, прародителями которых были археи до слияния с автотрофами, синтезируют в митохондриях АТФ преимущественно из ацетил-КоА. Одновременно все нервные клетки, прародителями которых явились автотрофы до слияния с археями, синтезируют в митохондриях АТФ из глюкозы, из пирувата, из ацетил-КоА. На этом основании все клетки нервной системы, центральной нервной системы (ЦНС) синтезируют в митохондриях АТФ только при метаболизме глюкозы и заменить его кетонными телами возможности не представляется.

При гипогликемии в спинномозговой жидкости компенсаторное увеличение содержания КТ не приводит к активации синтеза АТФ; формируется состояние кетоацидоза с развитием далее гипогликемической мозговой комы при отсутствии АТФ в цитоплазме нейронов, при дефиците энергии. Для наработки АТФ митохондриями нейронов и астроцитов в качестве субстрата необходима только глюкоза, но никак не КТ. КТ – единственная форма С4 ЖК, которую способна переносить выражено гидрофильная спинномозговая жидкость. Не гематоэнцефалический барьер препятствует поступлению в клетки ЦНС средне- и длинноцепочечных ЖК – высокая гидрофильность спинномозговой жидкости. По физико-химическим параметрам спинномозговая жидкость сходна с первичной мочой в канальцах нефрона.

Миллионы лет, с ранних ступеней филогенеза, археи окисляли КТ, ЖК и не окисляли глюкозу; глюкозу археи просто не синтезировали. И в настоящее время, когда содержание КТ и неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в ассоциации с альбумином в межклеточной среде становится сниженным, только тогда митохондрии соматических клеток переключаются на окисление ацетил-КоА, который образован из глюкозы. Циклической конкуренции между субстратами «ЖК ↔ глюкоза» не происходит; клетки начинают поглощать глюкозу только тогда, когда содержание КТ и ЖК в межклеточной среде и плазме крови снижено. Пока для клеток есть возможность поглощать из межклеточной среды КТ и ЖК, поглощать глюкозу они не начнут.

Сколько бы высокую и длительную гипергликемию мы не моделировали *in vivo* путём внутривенных инфузий глюкозы, поглощение клетками НЭЖК из ассоциатов с альбумином никак не уменьшится. Это противоречит мнению о том, что цикл Рендла (цикл ЖК ↔ глюкоза) функционирует на всех 3 уровнях относительного биологического совершенства: а) в клетках; б)

на уровне ПС клеток, органов и систем органов и в) на уровне организма, *in vivo*. На всех ступенях филогенеза, начиная со времени архей, поглощение клетками НЭЖК доминирует над поглощением глюкозы. Пока есть возможность поглощать ЖК (в форме КТ и НЭЖК) из плазмы крови, из межклеточной среды, клетки поглощать глюкозу не начнут. Эта же филогенетическая, биологическая зависимость положена и в основу действия инсулина. Инсулин понижает содержание ЖК (во всех химических формах) в межклеточной среде и в плазме крови с целью усилить поглощение клетками глюкозы [8].

Поглощение ЖК и глюкозы на аутокринном уровне. Градиент концентраций НЭЖК межклеточная среда : цитоплазма всегда высока: цитоплазма содержит только следовые количества НЭЖК. Одновременно физиологичное содержание НЭЖК в плазме крови составляет 0,5–0,8 мМ, возрастая до 1,5 мМ в постпрандиальном периоде, после еды. Если освобождение полярных НЭЖК в плазму крови оказывается чрезмерным, когда альбумин уже не может эффективно связывать НЭЖК, избыток полярных НЭЖК формирует в плазме крови фракцию свободных ЖК, а избыток НЭЖК при физико-химической ассоциации – сферические мицеллы, которые продолжают циркулировать в крови.

Активированное (не активное) поглощение полярных НЭЖК клетками реализует ранняя в филогенезе *CD36*-транслоказа ЖК с характерной высокой константой скорости реакции. Белки цитоплазмы, связывающие ЖК, быстро доставляют поглощённые клетками полярные НЭЖК к митохондриям (для окисления) или к каналам эндоплазматической сети для депонирования ЖК в форме капель неполярных ТГ. Митохондрии из цитоплазмы быстро поглощают КТ, С6–С10 короткоцепочечные ЖК и ω -9 С18 : 1 олеиновую МЖК. Пальмитиновую же С16 : 0 НЭЖК митохондрии поглощают много медленнее. Происходит это, несмотря на специфичный транспортёр – карнитинпальмитоил ацилтрансферазу; локализован он во внутренней мембране митохондрий. В процессе позднего в филогенезе, активного поглощения клетками ЖК путём рецепторного эндоцитоза, задействованы уже неполярные ТГ в составе хиломикронов (ХМ), ЛП очень низкой и низкой плотности (ЛПОНП и ЛПНП) [9]. Иными словами, на разных ступенях филогенеза произошло становление разных форм эндоцитоза с участием липидпереносящих молекул белка – аполипопротеинов (апо), включая апоА-I, апоЕ, апоВ-48 и апоВ-100.

Градиент же концентрации глюкозы на границе цитоплазма : межклеточная среда физиологично незначителен, 0,2–0,3 мМ. Наличие интегральных белков-транспортёров ГЛЮТ3 на плазматической мембране инсулиннезависимых клеток и ГЛЮТ4 на мембране зависимых от инсулина клеток усиливают пассивное (активированное) поглощение клетками глюкозы. Механизм активного поглощения глюкозы клетки так и не сформировали. Причина – высокая гидрофильность глюкозы и возможность одновременно неконтролируемого трансмембранного переноса моносахаридов, воды и Na^+ , как это происходит при всасывании глюкозы в энтероцитах тонкого кишечника.

Инсулиннезависимые ГЛЮТ3 и гормонозависимые ГЛЮТ4 активируют пассивное (по градиенту концентрации) поглощение клетками глюкозы. При этом транспортер-осциллятор ГЛЮТ4 проводит глюкозу через мембрану в обоих направлениях: как в клетку, так и из неё. Чтобы этого не происходило, введённую глюкозу клетка сразу подвергает фосфорилированию при действии гексокиназы (глюкокиназы). Образованный D-глюкозо-6-фосфат покинуть клетку не может. Для того чтобы поглощенную клеткой глюкозу смогли окислить митохондрии, надо: а) в цитоплазме осуществить 10 последовательных ферментативных реакций гликолиза и образования лактат; б) молочную кислоту превратить в пириновградную и в) в ПДГ комплексе в цитоплазме из пирувата сформировать ацетил-КоА. И лишь тогда осуществить превра-

щение ацетил-КоА в митохондриях с образованием АТФ [10]. Всё это и определяет условия того, что клетки не начинают поглощать глюкозу из межклеточной среды, пока есть возможность поглощать НЭЖК.

Для активации поглощения клетками глюкозы из межклеточной среды инсулин: а) блокирует липолиз (гидролиз ТГ) в ИПА; б) понижает секрецию, содержание в крови НЭЖК в ассоциации с альбумином и в) вынуждает клетки для наработки энергии (АТФ) поглощать глюкозу. И пока содержание в плазме крови НЭЖК не станет физиологично сниженным, клетки поглощать глюкозу не начнут. Это, мы полагаем, и есть этиологический фактор сочетанного поглощения ЖК и глюкозы клетками, отработанный на ранних ступенях филогенеза. Это не цикл ЖК $\leftrightarrow$ глюкоза, а реакция Рендла ЖК $\rightarrow$ глюкоза $\rightarrow$ ЖК. Это и есть филогенетическая основа формирования синдрома резистентности к инсулину, синдрома ИР.

Биологическая роль инсулина: формирование биологической функции локомоции. Биологическая функция локомоции – это движения за счёт сокращения новых функциональных клеток – поперечнополосатых миоцитов. Инсулин призван обеспечить субстратами для наработки энергии все клетки, которые реализуют биологическую функцию локомоции. Для этого он экспрессировал формирование *in vivo* системы инсулина. Гормон инициировал образование *in vivo* новых, функционально разных клеток, это: а) пул поперечнополосатых скелетных миоцитов; б) синцитий кардиомиоцитов; в) перипортальные гепатоциты; г) ИПА; д) оседлые макрофаги в печени – клетки Купфера. Все они формируют и выставляют на плазматическую мембрану: а) рецепторы к инсулину; б) ферментную систему передачи сигнала от рецептора на плазматической мембране к исполнительным органеллам цитоплазмы и в) инсулинозависимые, более производительные глюкозные транспортеры ГЛЮТ4. Более ранний на ступенях филогенеза, чем гуморальный медиатор инсулин, пул висцеральных жировых клеток сальника (ВЖК) остался к действию инсулина нечувствительным. ВЖК сальника активных рецепторов к инсулину не имеют; не имеют они не клеточной мембране и ГЛЮТ4.

Прямого отношения к регуляции *in vivo* метаболизма глюкозы, ранней в филогенезе функции гомеостаза, к регуляции эугликемии инсулин не имеет. Миллионы лет до синтеза инсулина активацию поглощения клетками глюкозы инициировала гипергликемия межклеточной среды как фактор регуляции. Состояние же гипогликемии купировала биологическая функция адаптации. Реакция адаптации – секреция глюкагона α -клетками островков и активация гидролиза гликогена (гликогенолиза) в перипортальных гепатоцитах; сформированы эти процессы за миллион лет до синтеза и действия инсулина. Освобождение в кровь глюкозы при компенсации гипогликемии осуществляют более ранние в филогенезе гепатоциты за счёт накопленного ими гликогена, но никак не поздние в филогенезе скелетные миоциты и не кардиомиоциты.

При действии инсулина завершено формирование замкнутой системы кровообращения и проксимального отдела артериального русла, артерий эластического типа. Сформировать биологическую функцию локомоции без замкнутой системы кровообращения, без сердца как центрального насоса в проксимальном отделе артериального русла невозможно. Невозможно сделать это и без миллионов ранних в филогенезе артериол мышечного типа (локальных перистальтических насосов) в дистальном отделе артериального русла в каждом из паракринно регулируемых сообществ (ПС) клеток.

Инсулин и централизованное обеспечение миоцитов, кардиомиоцитов субстратами для наработки энергии. Инсулин сформировал специфичный вариант обеспечения скелетных миоцитов и кардиомиоцитов субстратами для наработки энергии. Все инсулиннезависимые клетки *in vivo* поглощают ЖК в форме ТГ в составе ЛПНП и запасают как ТГ в цитоплазме в форме капель липидов. Далее клетки гидролизуют ТГ и окис-

ляют освобождённые НЭЖК в митохондриях. По сути, ранние в филогенезе клетки самостоятельно запасают и обеспечивают себя субстратами и энергией. Инсулин же инициировал «централизованное» обеспечение субстратами для наработки энергии поперечнополосатые миоциты и кардиомиоциты. Ни скелетные миоциты, ни кардиомиоциты не поглощают МЖК + НЖК в форме ТГ в составе ЛПОНП и ЛПНП и не депонируют в форме капель липидов. Обычно цитоплазма миоцитов содержит много глыбок гликогена размером 20–30 нм, а вот капель липидов – депонированных ТГ физиологично в цитоплазме нет.

После относительно неселективного поглощения НЭЖК при действии CD36-транслоказы ЖК скелетными миоцитами и кардиомиоцитами, митохондрии активно поглощают олеиновую МЖК, оставляя пальмитиновую НЖК в цитоплазме. Не обладая способностью к синтезу белков из семейства перилипинов, поперечнополосатые миоциты не депонируют ЖК в форме ТГ в составе капель липидов. Следствие этого – формирование специфичного липоидоза в виде опалесценции цитоплазмы миоцитов при микроскопии и цитохимии с липофильными красителями. Сократимость миоцитов при липоидозе снижается и формируются симптомы миопатии.

При реализации функции локомоции, при действии инсулина началось централизованное депонирование ЖК – субстратов в форме ТГ в ИПА. После гидролиза ТГ, при действии гормонозависимой липазы и освобождении в кровотоке ЖК в форме НЭЖК, инсулинозависимые миоциты и кардиомиоциты поглощают только их. Если же активированное поглощение инсулинозависимыми миоцитами пальмитиновой НЖК через CD36-транслоказу ЖК превышает возможности митохондрий их поглощать, окислять, развивается диффузный липоидоз (опалесценция) цитоплазмы миоцитов без образования капель липидов, при котором сократительная способность кардиомиоцитов снижается с развитием явлений дилатационной кардиомиопатии [11].

Инсулин, биологическая функция трофологии и реакция экзотрофии

Обеспечение энергией экзотермических реакций в реализации биологической функции локомоции, биологической реакции экзотрофии на поздних ступенях филогенеза стал регулировать гуморальный медиатор инсулин. Секреция инсулина β -клетками островков Лангерганса происходит только во время реализации *in vivo* биологической реакции экзотрофии, только после еды. Более ранним в филогенезе механизмом активации секреции гуморального медиатора вместо инсулина была алиментарная, постпрандиальная гипергликемия. Действие инсулина в реализации биологической реакции экзотрофии, мы полагаем, происходит в следующей последовательности. 1. Всасывание энтероцитами экзогенного моносахарида глюкозы из пищи и активация секреции инсулина, запасаемого в гранулах β -клеток островков. 2. Связывание инсулина с рецепторами на плазматической мембране клеток, блокада инсулином липолиза в ИПА и выставление на плазматическую мембрану инсулинозависимых клеток дополнительного количества GLUT4. 3. При сниженной концентрации НЭЖК в межклеточной среде и при алиментарной гипергликемии, клетки поглощают глюкозу, а инсулинзависимые гепатоциты в сопряжённых биохимических реакциях синтезируют из неё ЖК: глюкоза $\rightarrow$ ацетил-КоА $\rightarrow$ пальмитиновая НЖК (цикл Кноппа–Линена). 4. В канальцах гепатоцитов глицерин этерифицирует в первую очередь олеиновую эндогенную МЖК в позицию sn-2 спирта глицерина; далее апоВ-100 структурирует ТГ в олеиновые ЛПОНП и секретирует в локальный внутрисосудистый пул межклеточной среды. 5. Инсулинозависимая, постгепариновая липопроотеинлипаза (ЛПЛ) в крови быстро гидролизует часть олеиновых ТГ в составе одноименных ЛПОНП, освобождая при этом олеиновую МЖК в форме НЭЖК. Все клетки активировано поглощают их при действии CD36-транслоказы

ЖК. После оптимального липолиза пальмитиновых ТГ все зависимые от инсулина клетки поглощают лигандные, олеиновые ЛПОНП путём апоЕ/В-100-эндоцитоза. Далее они осуществляют депонирование олеиновых ТГ в ВЖК сальника для реализации всех биологических функций *in vivo* и в ИПА для возможности биологической реакции локомоции. Образования олеиновых ЛПНП при действии инсулина не происходит. В кровотоке физиологично циркулируют главным образом линолевые ЛПНП и оптимальное количество линоленовых ЛПНП; их клетки поглощают путём активного апоВ-100-рецепторного эндоцитоза.

В биологической реакции экзотрофии инсулин регуляторно инициирует обеспечение энергией эндотермических реакций депонирования экзогенных субстратов. Это происходит в условиях высоких параметров гидролиза олеиновых ТГ в крови в одноименных ЛПОНП. У травоядного вида *Homo sapiens* оптимальное обеспечение энергией эндотермических реакций в биологической реакции экзотрофии проходит в условиях инициирования инсулином *in vivo* олеинового варианта метаболизма ЖК. При этом не происходит образования олеиновых ЛПНП, тем более, в отличие от плотоядных, не бывает пальмитиновых ЛПНП. Происходит это в ситуации, когда травоядный в филогенезе человек потребляет растительную пищу и поедает рыбу.

Инсулин и превращение плотоядных (рыбоядных) в океане в травоядных на суше. На ступенях филогенеза при жизни на суше инсулин исполнил основное биологическое предназначение – превращение плотоядных (рыбоядных) в океане в травоядных на суше. При плотоядном питании в океане основным экзогенным субстратом для наработки энергии были ЖК; всасывали их энтероциты. Далее в составе ХМ экзогенные ЖК в форме ТГ в лимфо- и кровотоке достигали гепатоцитов. После оптимизации экзогенных ЖК оптимизированные экзогенные ЖК + эндогенно синтезированные ЖК ко всем клеткам в форме ТГ, пальмитиновые ЛПОНП и одноименные ЛПНП переносят секретированные гепатоцитами ЛПОНП и ЛПНП; все клетки поглощают ЛПНП путём апоВ-100 эндоцитоза [12].

Когда животные (не по своей воле) оказались на суше, где было мало плотоядной пищи, но много растительной, большинство из них вымерло. Однако малая часть особей выжили, освоили растительный вариант питания и в течение миллионов лет стали травоядными со всеми присущими им анатомическими особенностями. В течение последующих миллионов лет потомки их сформировали множество видов травоядных; травоядным в филогенезе является и вид *Homo sapiens*.

Основным субстратом для наработки клетками энергии, синтеза АТФ, стали не ЖК, а углеводы, глюкоза. Однако все живые организмы, все клетки, все митохондрии миллионами лет осуществляли метаболизм, главным образом ЖК, и вполне естественно продолжить на ступенях филогенеза реализацию этих же биохимических реакций метаболизма. Оптимальным вариантом обеспечения организма энергией стало превращение всей экзогенной глюкозы в эндогенно синтезированные ЖК. Основную роль в реализации этого несомненно исполнил инсулин. Гормон активирует поглощение клетками глюкозы для синтеза из них пальмитиновой НЖК согласно реакциям Кноппа–Линена. Инсулин восстанавливает у травоядных (*Herbivores*), *status quo*, гормон, инициируя продолжение метаболизма ЖК, как это происходило миллионами лет ранее у плотоядных.

Это мы рассматриваем как основное в филогенезе биологическое предназначение инсулина одновременно с формированием биологической функции локомоции. Филогенетически ранние плотоядные (рыбоядные) животные, *Carnivores*, при жизни на суше потребности в энергии покрывают за счёт поступления ЖК с пищей; инсулинозависимые адипоциты запасают преимущественно пальмитиновую НЖК в

форме пальмитиновых ТГ. Субстратами для наработки митохондриями АТФ являются в основном олеиновая МЖК и пальмитиновая НЖК; в сумме они составляют более 80% общего количества ЖК *in vivo*, причём последнюю ЖК митохондриями окисляют значительно более эффективно [13].

Инсулин заместил in vivo пальмитиновый вариант метаболизма ЖК на более эффективный олеиновый. На суше в ходе питания животной пищей в филогенезе произошло формирование пальмитинового варианта метаболизма ЖК: при плотоядной пище пальмитиновая НЖК всегда доминирует над олеиновой НЖК. Для пальмитинового варианта метаболизма ЖК характерно следующее.

1. Митохондрии медленно поглощают пальмитиновую НЖК из цитоплазмы, с трудом проводят её сквозь внутреннюю мембрану в матрикс, где и происходит β -окисление, наработка ацетил-КоА и синтез АТФ. Сложности транспорта в матрикс митохондрий пальмитиновой НЖК инициировали на ступенях филогенеза формирование специфичного транспортера, карнитинпальмитоил ацилтрансферазы во внутренней мембране митохондрий. Поскольку гидролиз С16 : 0 пальмитиновую НЖК во внутренней мембране митохондрий на две короткоцепочечные ЖК С6 – С10 происходит с трудом и медленно, транспортёр стал переносить пальмитиновую НЖК через внутреннюю мембрану целиком и потом её гидролизовать. Однако и в матриксе митохондрий гидролиз пальмитиновой НЖК происходит медленно; пальмитиновая НЖК химически является выражено инертной.

2. Константа скорости β -окисления олеиновой кислоты во внутренней мембране митохондрий оказывается на порядок выше аналогичной величины для кислоты пальмитиновой; мы показали это в модельных экспериментах с кинетикой окисления индивидуальных ЖК при автоматическом титровании ДС озоном *in vitro* [14].

3. Гидролиз пальмитиновых ТГ после депонирования в адипоцитах при действии гормонозависимой липазы и последующее освобождение в кровотоке в форме НЭЖК происходит существенно медленнее, нежели аналогичные процессы с участием олеиновой МЖК и олеиновых ТГ.

4. Гидролиз пальмитиновых ТГ в сформированных и секретируемых гепатоцитами пальмитиновых ЛПОНП при действии постгепариновой ЛПЛ протекает медленно. Содержание ТГ в пальмитиновых ЛПОНП при этом практически не уменьшается, апоВ-100 не принимает активной конформации и не формирует апоЕ/В-100-лиганд. В результате инсулинозависимые адипоциты не могут активно поглощать пальмитиновую НЖК в форме пальмитиновых ТГ в составе одноименных ЛПОНП.

5. Безлигандные пальмитиновые ЛПОНП → ЛПНП становятся в крови эндогенными, афизиологичными флогогенами – инициаторами биологической реакции воспаления. После переноса через монослой эндотелия путём биологической реакции транскитоza в интиму артерий их утилизируют оседлые макрофаги в интиму артерий эластического типа, формируя атероматоз и деструктивное поражение артерий.

Пальмитиновый вариант метаболизма ЖК в результате низких скоростей химических реакций функционально ограничен и недостаточно эффективен. В то же время у филогенетически поздних травоядных, которые по числу особей доминируют на суше, поступление ЖК с пищей ограничено. Глюкоза, образованная растениями при фотосинтезе, стала практически единственным «энергоемким» субстратом пищи для всех клеток травоядных. Роль основного субстрата для синтеза ЖК *in vivo* глюкоза стала исполнять на сравнительно поздних ступенях филогенеза. Как и в случае с ЖК, реакции окислительного метаболизма глюкозы приводят к образованию исходных продуктов – CO_2 и H_2O : функциональный цикл окислительно-восстановительных превращений субстратов *in vivo* при этом замыкается. Предприняты ли на ступенях

филогенеза попытки конвертировать пальмитиновую кислоту в химически иной, более удобный субстрат, устранив химические её особенности, которые не позволяют митохондриям осуществить более эффективное β -окисление? Таковой, мы полагаем, стала экспрессия в гепатоцитах пальмитоил-КоА-десатуразы: фермент превращает С16 : 0 пальмитиновую НЖК в С16 : 1 ω -9 (n-7) пальмитолеиновую МЖК. При этом двойная связь (ДС) в молекулу НЖК введена в силу стереохимических особенностей процесса десатурации в положение ω -9. Образующуюся при этом n-7 (ω -9) пальмитолеиновую кислоту, в отличие от ω -9 С18 : 1 олеиновой кислоты, которая возникает при эндогенном введении ДС в положение тоже ω -9, митохондрии окисляют значительно медленнее. Единственным доступным экзогенным субстратом для получения энергии клетками *Herbivores* оказались потребляемые с пищей углеводы. Вместе с тем депонирование глюкозы в форме гликогена едва ли целесообразно для реализации биологической функции локомоции, хотя бы по причине сравнительно низкой «теплотворности» углеводов. Теплоту полного окисления жиров и углеводов *in vivo* принимают обычно равными 40 и 17 кДж/г соответственно. Эквивалентная замена гликогеном всех депонированных *in vivo* ЖК в форме ТГ увеличила бы массу тела человека на 20–25 кг.

В то же время каждая животная клетка может превращать глюкозу в ацетил-КоА, после чего *in situ*, в цикле Кноопа-Линена, синтезировать *de novo* и пальмитиновую кислоту. Можно обоснованно полагать, что почти все ЖК травоядные синтезируют из глюкозы. При формальном подходе пальмитиновую кислоту можно именовать «гидрофобной формой глюкозы»; она выгодно отличается от исходной гидрофильной формы степенью концентрации химической энергии в единице массы. Полагаем, что на ступенях филогенеза при становлении биологической функции локомоции гуморальному медиатору гормону инсулину отведена, согласно филогенетической теории общей патологии, роль фактора совершенствования кинетических параметров организма [15]. Инсулин – анаболический гормон, активирует реакции химического восстановления и синтез энергоёмких субстратов, обеспечивает оптимальные условия для последующей реализации окислительных метаболических процессов.

На ступенях филогенеза инсулин регулирует: а) активацию поглощения клетками глюкозы и последующее депонирование в форме полимера гликогена, формируя депо углеводов; б) синтез эндогенной пальмитиновой НЖК из ацетил-КоА в цикле Кноопа-Линена; в) экспрессию пальмитоил-КоА-элонгазы и конверсию эндогенной пальмитиновой НЖК в более энергоёмкую, более гидрофобную стеариновую С18 : 0 кислоту; г) экспрессию стеарил-КоА-десатуразы и синтез из стеариновой НЖК ω -9 С18 : 1 олеиновой МЖК.

Олеиновая кислота – привлекательный субстрат с точки зрения кинетики β -окисления в матриксе митохондрий. Не углубляясь в биохимические механизмы окисления ненасыщенных ЖК, важно констатировать, что биохимические превращения С16 : 0 → С18 : 0 → С18 : 1 на порядок повышает скорость окисления конечного продукта – олеиновой МЖК в митохондриях. Формирование олеинового варианта метаболизма ЖК привело к увеличению производительности β -окисления и, соответственно, к повышению количества образованных митохондриями АТФ в единицу времени [16]. Это особенно важно при острых нарушениях биологической функции адаптации, в условиях биологических реакций стресса и функции адаптации. Ведь в условиях критической ситуации *in vivo* в ходе реализации биологических функций адаптации и компенсации можно истратить лишь то количество АТФ, которое за это же время нарабатывали митохондрии: даже кратковременного депонирования энергии *in vivo* в форме АТФ не происходит.

В состоянии ли инсулин повысить производительность реакции β -окисления в митохондриях? Безусловно, с помо-

щью биохимического синтеза субстрата, который утилизируют органеллы с существенно большей константой скорости реакции. С этой целью инсулин инициирует превращение всей эндогенно синтезированной гепатоцитами пальмитиновой НЖК из экзогенной глюкозы в олеиновую МЖК: константа скорости реакции β -окисления МЖК в митохондриях значительно увеличивается. В то же время поздний в филогенезе инсулин не активирует превращение в олеиновую МЖК экзогенной пальмитиновой НЖК, которая поступает с плотоядной, мясной пищей. Инсулин активирует поглощение клетками глюкозы с целью синтеза олеиновой МЖК.

Инсулин и высокоэффективный олеиновый вариант метаболизма ЖК. Формирование и эволюционное оформление в филогенезе системы инсулина преследует цель максимально повысить производительность митохондрий и, возможно, более эффективно обеспечить физическую, локомоторную активность организма путём замены субстратов, пальмитиновой НЖК на олеиновую МЖК. Теперь стали реально востребованными и все экспрессированные инсулином функционально новые клетки – поперечнополосатые скелетные миоциты и инсулинозависимые подкожные адипоциты [17]. На плазматической мембране инсулинозависимых поперечнополосатых миоцитов и кардиомиоцитов функционируют ГЛЮТ4 и рецепторы к инсулину, но они не имеют ни более ранних в филогенезе апоВ-100 рецепторов, ни филогенетически поздних апоЕ/В-100-рецепторов. Функцией активного поглощения ЖК в форме неполярных ТГ скелетные миоциты и кардиомициты не владеют, но активировано поглощают ЖК в форме полярных НЭЖК.

На новом энергетическом уровне *in vivo* инсулин реализовал и векторный перенос олеиновой МЖК, пальмитиновой НЖК в форме ТГ, из гепатоцитов (места их синтеза) в депо, в ИПА при реализации инсулинозависимого апоЕ/В-100 эндоцитоза. Гидролиз олеиновых и пальмитиновых ТГ в адипоцитах с последующим освобождением в кровь полярных НЭЖК формирует реальную возможность эффективного поглощения их скелетными миоцитами и кардиомиоцитами [18]. Современные методы хроматографии позволяют определить спектр этерифицированных со спиртами ЖК и спектр НЭЖК [19, 20]. Согласно филогенетической теории общей патологии, мы, в зависимости от того, какая ЖК этерифицирована со вторичной спиртовой группой глицерина в позиции sn-2, разделяем ТГ на пальмитиновые, олеиновые и линолевые, выделяя одновременно и одноименные ЛПОНП.

Гидролиз ТГ, депонированных в адипоцитах, активирует гормонозависимая липаза, для которой характерна низкая субстратная специфичность; фермент гидролизует позиционные изоформы ТГ с разными константами скорости реакции [21]. Позиционные изоформы пальмитиновых ТГ как пальмитоил-пальмитоил-олеат глицерол (ППО), пальмитоил-олеил-пальмитат (ПОП) гормонозависимая липаза в ВЖК сальника и в ИПА гидролизует медленно. ТГ как пальмитоил-пальмитоил-пальмитат (ППП), постгепариновая липаза в пальмитиновых ЛПОНП в крови не гидролизует вообще. Позиционные изомеры ТГ как олеил-олеил-пальмитат глицерол (ООП), олеил-пальмитоил-олеат (ОПО) и особенно олеил-олеил-олеат (ООО) постгепариновая ЛПН гидролизует существенно быстрее. Чем выше содержание пальмитиновой ЖК в ТГ подкожных адипоцитов, тем медленнее ВЖК и ИПА освобождают ЖК в форме НЭЖК из ТГ в жировых депо и в крови в олеиновых ЛПОНП [22].

Согласно филогенетической теории общей патологии, принципу биологической субординации, более поздний, более совершенный регулятор на ступенях филогенеза не в силах отменить действие более раннего гуморального медиатора. И если гормоны с активным липолитическим действием активируют в ВЖК сальника гидролиз ТГ, увеличивая в межклеточной среде содержание НЭЖК, инсулин блокирует

это процесс не может. Ранние в филогенезе ВЖК не имеют на клеточной мембране активных рецепторов к инсулину. Инсулин выраженно блокирует липолиз в инсулинозависимых ИПА, и это (вместе с выставлением на мембрану дополнительного числа ГЛЮТ4) формирует механизм активации поглощения клетками глюкозы.

Гуморальные медиаторы, которые активируют как биохимические процессы окисления субстратов (катехоламины, глюкокортикоиды), так и процессы деполимеризации или расщепления сложных молекул до сравнительно простых фрагментов (гликогенолиз, липолиз), проявляют катаболическую, химически деструктивную, окислительную активность [23]. Инсулин же является гормоном преимущественно анаболическим; он регулирует синтез биомолекул и восстанавливает высокий уровень их химической организации. Можно полагать, что на какой-то из ступеней эволюции сформировались и механизмы регуляции синтеза инсулина.

Мы предлагаем адипоцитами именовать только филогенетически поздние инсулинозависимые клетки подкожной жировой клетчатки (ИПА); общего с регуляцией ВЖК сальника они имеют не много. Висцеральная жировая ткань в филогенезе – более ранний пул инсулинозависимых клеток; подкожные адипоциты – филогенетически поздний: регуляция метаболизма ЖК и ТГ в клетках двух пулов имеет существенные различия. С позиций филогенетической теории общей патологии, мы считаем, что метаболический синдром является локальной патологией пула ВЖК сальника со всеми присущими ей особенностями регуляции и процессами компенсации, с нарушением в афизиологичном процессе и иных биологических функций. В свою очередь, согласно филогенетической теории общей патологии, синдром ожирения можно рассматривать как патологию позднего на ступенях филогенеза пула инсулинозависимых подкожных адипоцитов.

Поздний в филогенезе инсулин не может инициировать в гепатоцитах синтез олеиновой МЖК из экзогенной, пальмитиновой НЖК, из плотоядной пищи. Возможным субстратом для инсулинозависимого синтеза олеиновой МЖК может быть только эндогенная пальмитиновая НЖК, синтезированная *in situ de novo* из экзогенной глюкозы. И если *in vivo* длительно доминирует экзогенная пальмитиновая НЖК плотоядной (мясной пищи), пропорционально её количеству будет реализован пальмитиновый вариант метаболизма ЖК, хронический дефицит энергии, макроэргического АТФ; б) состояние нормолипидемии постепенно заменит гиперлипотеинемия (ГЛП) последовательно типа IV → тип II б → тип V; в крови вместо физиологичной циркуляции только олеиновых ЛПОНП начнут накапливаться пальмитиновые ЛПОНП и одноименные ЛПНП; они-то и повысят содержание в плазме крови ХС-ЛПНП; увеличится содержание НЭЖК в ассоциации с альбумином, и сформируется синдром ИР. Далее в плазме крови компенсаторно произойдёт повышение содержания апоС-III и увеличение уровня апоВ-48 одновременно с выявлением полосы ХМ на электрофореграмме ЛП в геле агарозы.

Все это служит проявлением нарушения *in vivo* биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии. Компенсаторную реакцию организма на нарушение биологической функции питания мы именуем атеросклерозом. Со временем атеросклероз как афизиологичная, компенсаторная реакция и накопление в крови безлигандных пальмитиновых ЛПОНП → ЛПНП становится причиной нарушения иной биологической функции – «чистоты» межклеточной среды, биологической функции эндоэкологии. «Замусоривание» межклеточной среды большими эндогенными флогогенами активирует *in vivo* биологическую функцию эндоэкологии, биологическую реакцию воспаления. Последняя призвана вывести из локального внутрисосудистого пула межклеточной среды в пул сбора и утилизации все эндогенно образованные флогогены (инициаторы биологической реак-

ции воспаления) в пул сбора и утилизации биологического «мусора». Сформирован этот пул на поздних ступенях филогенеза при замыкании системы кровообращения; располагается он в интима артерий эластического и смешанного типа.

Афизиологичное исполнение биологической функции эндозкологии, биологической реакции воспаления и формирует атероматозные массы липидов. Это те массы физиологично переносимых линолевыми ЛПНП полиеновых ЖК (ЛПНЖК) в форме эфиров со спиртом ХС, которые клетки не смогли поглотить в составе лигандных ЛПНП путём апоВ-100-рецепторного эндоцитоза. Этот второй компенсаторный, но тоже афизиологично реализованный процесс, обоснованно именовать атероматозом. Удаленные из кровотока безлигандные пальмитиновые ЛПОНП → ЛПНП формируют атероматозные массы, морфологическую и структурную основу ишемической болезни сердца. Таким образом, потребление травоядными, согласно филогенетической теории общей патологии, осознанное нарушение пациентами биологической функции трофологии, злоупотребление плотоядной (мясной) пищей является причиной формирования *in vivo* компенсаторной реакции, именуемой атеросклерозом. Таким образом, поедание травоядным *Homo sapiens* избыточного количества плотоядной пищи последовательно приводит *in vivo* к нарушению биологической функции трофологии, функции адаптации и функции эндозкологии.

Синдром ИР и современное понятие диабета 2-го типа. Специалистам, которые освоили азы эндокринологии 50 годами ранее, трудно избавиться от своих взглядов. Они (и я) чётко усвоили, что диабет – это невосполнимые нарушения структуры в системе регуляторного действия инсулина. Диабет 1-го типа – это чаще приобретённые (реже наследуемые) нарушения структуры β -клеток островков Лангерганса, которые утрачивают способность синтезировать инсулин; возможны мутации и в молекуле инсулина [24, 25] это инсулинодефицитный сахарный диабет. Диабет 2-го типа – это структурные нарушения рецепторов к инсулину, врождённая блокада передачи в клетки регуляторного сигнала гормона. Диабет 2-го типа – это единственная форма структурно обусловленной резистентности к инсулину – гиперинсулинемическая форма сахарного диабета.

Одновременно инсулин не может ингибировать активность более ранних в филогенезе гормонов и предотвратить нарушения регуляции метаболизма *in vivo* при активации медиаторами липолиза в ВЖК сальника. Инсулин лишён в филогенезе возможности активировать поглощение клетками глюкозы, если в межклеточной среде увеличено содержание полярных НЭЖК + альбумин. Иницировано оно при действии более ранних в филогенезе гуморальных медиаторов, которые призваны регулировать *in vivo* иные биологические функции, в частности биологическую функцию эндозкологии, реакцию воспаления при действии первичных и вторичных гуморальных медиаторов биологической реакции воспаления [26]. Это же относится к действию более ранних в филогенезе гормонов с выраженной активацией липолиза в ВЖК сальника [27]. Равным образом активация *in vivo* биологической функции адаптации с реакциями компенсации и стресса, индивидуальные комбинации нарушения функций у пациентов облигатно являются причинами формирования *in vivo* синдрома ИР. Полагают, что нарушение функции микробиоты (пул специфичных, факультативных анаэробов толстого кишечника) имеет отношение к формированию синдрома ИР [28] и метаболическому синдрому [29].

В то же время, в подавляющем числе наблюдения в клинике, синдром ИР – это только функциональные нарушения, и во многих случаях они, при стремлении пациента к выздоровлению, могут быть устранены. Создается ощущение, что при синдроме ИР действие инсулина *in vivo* что-то мешает и, если это что-то устранить, здоровье может быть восстановлено.

Согласно филогенетической теории общей патологии, основам эндокринологии, в клинике мы имеем дело с: 1) редкими случаями структурно обусловленного, инсулинодефицитного сахарного диабета 1-го типа; 2) столь же редкими случаями структурно обусловленного, но гиперинсулинемического диабета 2-го типа и 3) большим числом пациентов не со структурными, а только с функциональными нарушениями действия гормона, с синдромом ИР, в частности у пациентов с метаболическим синдромом и пациентов с ожирением. Мы полагаем, что важной особенностью сахарного диабета является и то, что этот диагноз порождает ощущение фатальности; в то время как все функциональные расстройства синдрома ИР, пусть нелегко, с большими усилиями со стороны пациентов, но в большинстве случаев можно улучшить или устранить.

Что же в настоящее время считают диабетом 2-го типа (который выставляют сотням миллионов человек во всех странах мира [30])? Согласно комитету по классификации и диагностики критериев сахарного диабета Японии, «сахарный диабет 2-го типа – это группа заболеваний, ассоциированных с разными нарушениями метаболизма, для которых характерны хроническая гипергликемия в результате нарушенного действия инсулина» [31]. Эти нарушения имеют в основе своей как генетические факторы, так и факторы внешней среды. Длительно существующие нарушения метаболизма могут привести к специфичным осложнениям, формированию атеросклероза, атероматоза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда [32].

Нарушение действия инсулина служит центральным звеном в патогенезе метаболического синдрома и способствует формированию патологии сердечно-сосудистой системы [33]. Происходит это путём нарушения метаболизма глюкозы и ЖК при метаболической (эссенциальной) артериальной гипертензии и биологической реакции воспаления, при синдроме системного воспалительного ответа [34]. Кроме того, инсулин воздействует на эндотелийзависимую вазодилатацию, функцию дистальной части артериального русла, на функцию миокарда, почек и сетчатки глаза [35]. Диабет типа – это хроническое, прогрессирующее заболевание с разными патофизиологичными механизмами формирования синдрома ИР, повышением продукции глюкозы гепатоцитами, следствием чего становится гипергликемия [36]. Метаболический синдром рассматривают как кластер симптомов нарушенного метаболизма, включая в первую очередь РИ, гиперлипидемию, метаболическую артериальную гипертензию, ожирение и низкий уровень ХС-ЛПВП [37]. Метаболический синдром, ожирение и резистентность к инсулину сопровождает активация биологической реакции воспаления [38]; она всегда требует большого количества энергии. И только в малом числе работ изложенную патологию именуют синдромом резистентности к инсулину, имея в виду функциональную основу патологии, а не новое сформулированное понятие сахарного диабета 2-го типа [39].

Мы полагаем, что в популяциях всех развитых стран мира высока частота функционального синдрома ИР; формирование синдрома ИР в большинстве случаев функционально и вторично. В первую очередь следует понять, что вид *Homo sapiens* филогенетически травояден и переизбыток мясной пищи всегда, исходя из становления биологических функций в филогенезе, приведёт к формированию синдрома ИР. Основным условием возникновения нарушений и осложнений при синдроме ИР является хроническое, потенциальное состояние дефицита энергии, малое формирование АТФ митохондриями в единицу времени, низкая эффективность пальмитинового варианта наработки клетками энергии. Пять этологических факторов становления синдрома ИР необходимо постоянно принимать во внимание при реализации биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии, оценке количества и состава, травоядной пищи.

При поедании травоядным человеком оптимального коли-

чества (мясной) пищи среди ЖК *in vivo* продолжает преобладать олеиновая МЖК и олеиновый вариант метаболизма ЖК. Оптимально для травоядных, мы полагаем, такое количество пальмитиновой НЖК, которое гепатоциты могут этерифицировать в состав олеиновых ЛПОНП, а клетки поглотить в составе олеиновых, лигандных ЛПОНП путём апоЕ/В-100 эндоцитоза. Физиологично гепатоциты этерифицируют пальмитиновую НЖК в такие олеиновые позиционные формы ТГ как пальмитоил-олеил-пальмитат (ПОП) [40]. При этом в кровотоке циркулируют только олеиновые ЛПОНП, нет олеиновых ЛПНП и поэтому низки цифры ХС-ЛПНП. Примером максимальной упаковки пальмитиновой НЖК в олеиновых ТГ демонстрирует растительное пальмовое масло [41].

Если количество пальмитиновой НЖК в пище возрастает, этерифицировать всю её в олеиновые ТГ невозможно, гепатоциты начинают синтезировать пальмитиновые ТГ и секретировать в кровь пальмитиновые ЛПОНП. С этого и начинается повышение в плазме крови ХС в пальмитиновых ЛПОНП → ЛПНП (ХС-ЛПНП), доминирование *in vivo* пальмитинового варианта метаболизма *in vivo* ЖК и инициирование вначале атеросклероза как нарушение биологической функции трофологии (питания), биологической реакции экзотрофии, а далее нарушение биологической функции эндоэкологии, биологической реакции воспаления и формирования атероматоза. Основу профилактики атеросклероза и атероматоза составляет нормализация биологической функции питания, исходя из того, что в филогенезе вид *Homo sapiens* сформировался как травоядный, *Herbivores*.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6-11, 13, 18, 21, 26-38, 40-41 см. REFERENCES)

1. Титов В.Н. Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез метаболических пандемий. Сахарный диабет. М.: ИНФРА-М.; 2014.
2. Колычев А.П. Различия динамики интернализации рецепторов инсулина и инсулинподобного фактора роста-I (ИФР-I) в изолированных гепатоцитах крыс. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2013; 49(6): 433 – 42.
3. Мазунин И.О., Володько Н.В., Митохондрии: жизнь в клетке и её последствия. Природа. 2014; 14(3): 3 – 16.
4. Колычев А.П. Особенности распределения {125} I-инсулинподобного фактора роста (ИФР-I) при интернализации в изолированных гепатоцитах крыс. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2014; 5(1): 51 – 8.
5. Дмитриев Л.Ф., Дугин С.Ф. Механизмы развития гипергликемии и возможные способы нормализации углеводного обмена. Терапевтический архив. 2005; 10: 24 – 9.
12. Юрьева Э.А., Сухоруков В.С., Воздвиженская Е.С., Новикова Н.Н. Атеросклероз: гипотезы и теории. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2014; 3: 6 – 13.
14. Лисицын Д.М., Разумовский С.Д., Тищенко М.А., Титов В.Н. Кинетические параметры окисления озоном индивидуальных жирных кислот. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004; 138(11): 517 – 9.
15. Шноль С.Э. Физико-химические факторы биологической эволюции. М.: «Наука»; 1979.
16. Постнов Ю.В. Об энергезависимом звене патогенеза хронической гипертензии. Архив патологии. 2009; 71(4): 3 – 11.
17. Чубриева С.Ю., Глухов Н.В., Зайчик А.М. Жировая ткань как эндокринный орган. Вестник Санкт-Петербургского университета. 2008; 1: 32 – 42.
19. Ариповский А.В., Колесник П.О., Веждел М.И., Титов В.Н. Метод подготовки проб для газохроматографического определения жирных кислот без предварительной экстракции липидов. Клиническая лабораторная диагностика. 2012; 1: 3 – 8.
20. Орлова Т.И., Уколов А.И., Савельева Е.И., Радилов А.С. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием. Аналитика и контроль. 2015; 19(2): 183 – 98.
22. Титов В.Н. Метаболический синдром – переделение физиологич-

- ной пищи. Висцеральные жировые клетки, неэтерифицированные и свободные жирные кислоты. М.: ИНФРА-М.; 2017.
23. Кузьменко Д.И., Удинцев С.Н., Климентьева Т.К., Серебров В.Ю. Окислительный стресс жировой ткани как первичное звено патогенеза резистентности к инсулину. Биомедицинская химия. 2016; 62(1): 14 – 21.
 24. Прозоровский В.Н., Лохов П.Г., Маслов Д.Л., Ипатова О.М. Структурно-функциональные особенности инсулина и механизма его действия. Биомедицинская химия. 2003; 49(1) 46 – 62.
 25. Ксенофонтowa О.И. Введение мутаций в молекулу инсулина: «положительные» и «отрицательные» мутации. Биомедицинская химия. 2014; 60(4): 430 – 437.
 39. Один В.И. Клиническая риторика в высшей школе. Клиническая медицина. 2016; 94(6): 474 – 9.

REFERENCES

1. Titov V.N. Phylogenetic theory of general pathology. The pathogenesis of metabolic pandemics. Diabetes. [Filogeneticheskaya teoriya obshchey patologii. Patogenez metabolicheskikh pandemiy. Saharnyy diabet.] . Moscow: INFRA-M.; 2014. (in Russian)
2. Kolychev A.P. Differences in the dynamics of internalization of insulin receptors and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in isolated hepatocytes of rats. Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii. 2013; 49(6): 433 – 42. (in Russian)
3. Mazunin I.O., Volod'ko N.V. Mitochondria: life in a cell and its consequences. Priroda. 2014;14: 3 - 16. (in Russian)
4. Kolychev A.P. Peculiarities of the distribution of {125} I-insulin-like growth factor (IGF) when internalized in isolated rat hepatocytes. Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii. 2014; 5(1): 51 – 58. (in Russian)
5. Dmitriev L.F., Dugin S.F. Mechanisms for the development of hyperglycemia and possible ways of normalizing carbohydrate metabolism. Terapevticheskiy arkhiv. 2005; 10: 24 – 9. (in Russian)
6. Hoye A.T., Davoren J.E., Wipf P., Fink M.P., Kagan V.E. Targeting mitochondria. Acc. Chem. Res. 2008; 41(1): 87 - 97.
7. Pagel-Langenickel I., Bao J., Pang L., Sack M.N. The role of mitochondria in the pathophysiology of skeletal muscle insulin resistance. Endocr. Rev. 2010; 31(1): 25 - 51.
8. Black P.H. The inflammatory consequences of psychologic stress: relationship to insulin resistance, obesity, atherosclerosis and diabetes mellitus, type II. Med. Hypotheses. 2006; 67(4): 879 - 91.
9. Vecis J., Zeljkovic A., Jelic-Ivanovic Z., Spasojevic-Kalimanovska V. Small, dense LDL cholesterol and apolipoprotein B: relationship with serum lipids and LDL size. Atherosclerosis. 2009; 207: 496 – 501.
10. Jensen B.A., Nielsen T.S., Fritzen A.M., Holm J.B., Fjære E., Serup A.K., Borkowski K. Dietary fat drives whole-body insulin resistance and promotes intestinal inflammation independent of body weight gain. Metabolism. 2016; 65(12): 1706 - 19.
11. Lim S., Meigs J.B. Ectopic fat and cardiometabolic and vascular risk. Int. J. Cardiol. 2013; 169(3): 166 - 76.
12. Yur'eva E.A., Sukhorukov V.S., Vozdvizhenskaya Ye.S., Novikova N.N. Atherosclerosis: hypotheses and theories. Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii. 2014; 3: 6 – 13. (in Russian)
13. Fontes-Villalba M., Lindeberg S., Granfeldt Y., Knop F.K., Memon A.A., Carrera-Bastos P., Picazo O. Palaeolithic diet decreases fasting plasma leptin concentrations more than a diabetes diet in patients with type 2 diabetes: a randomised cross-over trial. Cardiovasc. Diabetol. 2016; 15: 80 - 90.
14. Lisizin D.M., Razumovskiy S.D., Tischenin M.A., Titov V.N. Kinetic parameters of individual ozone oxidation of fatty acids. Bulliten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 2004; 138(11): 517 – 9. (in Russian)
15. Shnol S.E. Physicochemical factors of biological evolution. [Fiziko-khimicheskiye faktory biologicheskoy evolyuzii]. Moscow: "Nauka"; 1979. (in Russian)
16. Postnov Yu.V. On the energy-dependent link of the pathogenesis of chronic hypotension. Arkhiv patologii. 2009; 71(4): 3 – 11. (in Russian)
17. Chubrieva S.Yu., Glukhov N.V., Zaichik A.M. Adipose tissue as an endocrine organ. Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. 2008; 1: 32 – 42. (in Russian)
18. Xu C., Xu G.H. Adipose triglyceride lipase regulates adipocyte lipolysis. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan. 2008; 39(1): 10 - 4.
19. Aripovskiy A.V., Kolesnik P.O., Vezhdel M.I., Titov V.N. Method of preparation of samples for gas chromatographic determination of fatty acids without preliminary extraction of lipids. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2012; 1: 3 – 8. (in Russian)
20. Orlova T.I., Ukolov A.I., Savel'eva E.I., Radilov A.S. Determination of free and esterified fatty acids in blood plasma by gas chromatography with mass-selective detection. Analitika i kontrol'. 2015; 19(2): 183 – 98. (in Russian)

21. Nielsen T.S., Jessen N., Jørgensen J.O., Møller N., Lund S. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J. Mol. Endocrinol.* 2014; 52(3): R199 - 222.
22. Titov V.N. *Metabolic syndrome - overeating physiological food. Visceral fat cells, and non-esterified free fatty acids. [Metabolicheskiy sindrom - pereedanie fiziologichnoy pishi. Viskeral'nye ghirovye kletki, neeterefizirovannye i svobodnye ghirovye kisloty]*. Moscow: INFRA-M; 2017. (in Russian)
23. Kuz'menko D.I., Udintsev S.N., Kliment'eva T., Serebrov V.Yu. Oxidative stress of adipose tissue as the primary link in the pathogenesis of insulin resistance. *Biomedizinskaya khimiya.* 2016; 62(1): 14 - 21. (in Russian)
24. Prozorovskiy V.N., Lokhov P.G., Maslov D.L., Ipatova O.M. Structural and functional features of insulin and the mechanism of its action. *Biomedizinskaya khimiya.* 2003; 49(1) 46 - 62. (in Russian)
25. Ksenofontova O.I. Introduction of mutations in the insulin molecule: "positive" and "negative" mutations. *Biomedizinskaya khimiya.* 2014; 60(4): 430 - 7. (in Russian)
26. Phosat C., Panprathip P., Chumprathat N., Prangthip P., Chantrattit N. Elevated C-reactive protein, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha and glycemic load associated with type 2 diabetes mellitus in rural Thais: a cross-sectional study. *BMC Endocr. Disord.* 2017; 17(1): 44 - 9.
27. Protzek A.O., Rezende L.F., Costa-Júnior J.M., Ferreira S.M., Cappelli A.P., de Paula F.M. Hyperinsulinemia caused by dexamethasone treatment is associated with reduced insulin clearance and lower hepatic activity of insulin-degrading enzyme. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2016; 155(Pt A): 1 - 8.
28. Wen L., Duffy A. Factors Influencing the gut microbiota, inflammation, and type 2 diabetes. *J. Nutr.* 2017; 147(7): 1468S - 75S.
29. de Groot P.F., Frissen M.N., de Clercq N.C., Nieuwdorp M. Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: history, present and future. *Gut. Microbes.* 2017; 8(3): 253 - 67.
30. Kahn S.E., Cooper M.E., Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet.* 2014; 383(9922): 1068 - 83.
31. Kuzuya T., Nakagawa S., Satoh J., Kanazawa Y., Iwamoto Y., Kobayashi M., Nanjo K., Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes. Res. Clin. Pract.* 2002; 55(1): 65 - 85.
32. Cometty of Japan Diabetes Society. Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *J. Diabet. Invest.* 2010; 1(5): 212 - 28.
33. Li Y., Hryby A., Bernstein A.M., Ley S.H., Wang D.D., Chiuve S.E. Saturated fats compared with unsaturated fats and sources of carbohydrates in relation to risk of coronary heart disease: a prospective cohort study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015; 66(14): 1538 - 48.
34. Rask-Madsen C., Kahn C.R. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012; 32(9): 2052 - 9.
35. Domanski M.J., Fuster V., Diaz-Mitoma F., Grundy S., Lloyd-Jones D., Mamdani M. Next Steps in Primary Prevention of Coronary Heart Disease: Rationale for and Design of the ECAD Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015; 66(16): 1828 - 36.
36. Balijepalli C., Druyts E., Siliman G., Joffres M., Thorlund K., Mills E.J. Hypoglycemia: a review of definitions used in clinical trials evaluating antihyperglycemic drugs for diabetes. *Clin. Epidemiol.* 2017; 9: 291 - 6.
37. Shin J.A., Lee J.H., Lim S.Y., Ha H.S., Kwon H.S., Park Y.M. Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *J. Diabetes. Investig.* 2013; 4(4): 334 - 43.
38. Odegaard J.I., Ricardo-Gonzales R.R., Goforth M.H., Morel C.R., Subramanian V., Mukundan L., Red Eagle A. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature.* 2007; 447(7148): 1116 - 20.
39. Odin V.I. Clinical rhetoric in high school. *Клиническая медицина.* 2016; 94(6): 474 - 9. (in Russian)
40. Yoshinaga K., Obi J., Nagai T., Iioka H., Yoshida A., Beppu F., Gotoh N. Quantification of triacylglycerol molecular species in edible fats and oils by gas chromatography-flame Ionization detector using correction factors. *J. Oleo. Sci.* 2017; 66(3): 259 - 68.
41. May C.Y., Nesaretnam K. Research advancements in palm oil nutrition. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2014; 116(10): 1301 - 15.

Поступила 25.08.17

Принята к печати 30.08.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.31:547.295]-074:543.544

Ариповский А.В.¹, Колесник П.О.², Кулагина Т.П.³, Титов В.Н.⁴

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ: ПРЕИМУЩЕСТВА БЕЗЭКСТРАКЦИОННОГО МЕТОДА С ПРЯМОЙ ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИЕЙ ЛИПИДОВ ВЫСУШЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБ

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Госсанэпиднадзора РФ, 142279, г. Оболенск Московской области, Россия;

²Ужгородский Национальный Университет, 88000, г. Ужгород Закарпатской области, Украина;

³ФГУН «Институт биофизики клетки» РАН. 142290, г. Пущино Московской области, Россия;

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии», 121552, Москва, Россия

Проведено сравнение методов подготовки проб жидких и твердых биологических материалов для последующего газохроматографического определения содержания жирных кислот. Классический метод (с предварительной экстракцией липидов из биологической матрицы методами Фолча или Хара—Рэдина) не обеспечивает каких-либо ощутимых преимуществ в сравнении с безэкстракционным методом, т. е. прямой дериватизацией высушенной биологической пробы в ходе её последовательной обработки растворами метоксида натрия и трёхфтористого бора в метаноле. Последний универсальный метод гарантирует не меньшую, а достоверно большую степень извлечения определяемых веществ, принципиально упрощает и ускоряет процедуру подготовки проб. Вариант метода сухой капли (на пористых дисках из целлюлозной или, предпочтительно, фторопластовой фильтрующей бумаги) оказывается удобным и для лабораторного анализа жидких биологических проб, позволяя исключить не только операцию их жидко-жидкостной экстракции, но и стадию вакуумной сушки. В отличие от методов Фолча и Хара—Рэдина, безэкстракционный метод не требует обязательной «гомогенизации» биологического материала, т. е. его измельчения до частиц микронного размера. Применение безэкстракционной дериватизации — даже при работе с крупными частицами биологического материала размером 0,2–1,0 мм — обеспечивает заметно большую степень извлечения определяемых веществ (по сравнению с таковой при экстракции микронных гомогенизатов в различных вариантах классического метода Фолча).

Для корреспонденции: Ариповский Александр Викторович, канд. хим. наук., вед. науч. сотр.; e-mail: aripovsky@rambler.ru

Ключевые слова: газовая хроматография; жирные кислоты; метод Фолча; «метод сухой капли»; безэкстракционная дериватизация.

Для цитирования: Ариповский А.В., Колесник П.О., Кулагина Т.П., Титов В.Н. Подготовка проб для газохроматографического определения жирных кислот: преимущества безэкстракционного метода с прямой перэтерификацией липидов высушенных биологических проб. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (3): 141-147. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-141-147>

A. V. Aripovskiy¹, P. O. Kolesnik², T. P. Kulagina³, V. N. Titov⁴

PREPARATION OF SAMPLES FOR GAS-CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF FATTY ACIDS: DIRECT TRANSESTERIFICATION OF LIPIDS OF A DRY BIOLOGICAL SAMPLE IS PREFERRED IN COMPARISON WITH THE METHODS EMPLOYING PRELIMINARY LIPID EXTRACTION.

¹State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk town, Moscow region, Russian Federation, 142279;

²Uzhgorod National University, Uzhgorod, Transcarpathia, Ukraine, 88000;

³Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Science, Pushchino town, Russian Federation, 142290;

⁴National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation, 121552

Different methods of sample preparation and derivatization were compared from the point of view of product yield, speed and convenience of the technique used.

Fatty acid determination in absolutely dry objects (biochemical preparations, food protein isolates, lyophilized microbial biomass) may be performed easily with the use of Folch method provided that 4-component system "chloroform/ methanol/water/acetic acid" was employed. Nevertheless, we could not find any real advantages of classical Folch or Hara-Radin extraction method variants when compared to simple non-extraction technique (which consists in direct trans-esterification of dried biomaterial due to sequential sample treating with sodium methoxide and boron trifluoride methanolic solutions).

The latter method, being completely universal, provides considerable increase of fatty esters yield, sample preparation is noticeably simplified and accelerated (becoming much more economical). It's "dry blood spot" variant (using cellulose or, preferably, fluoroplast filter paper disks) seems to be extremely convenient for laboratory routine analysis of liquid biological samples, allowing to exclude not only their liquid-liquid extraction but also the stage of vacuum drying.

Unlike the methods of Folch and Hara-Radin, the non-extraction method does not necessarily require the homogenization of the biological material, that is, it's grinding to fragments of micron size. Direct derivatization method provides noticeably better parameters of fatty acids yield even for relatively large particles - 0.2-1.0 mm - of the test material (in comparison with those parameters observed upon extraction of micron size homogenizates by the Folch method in its most advanced modifications).

Key words: gas chromatography, fatty acids, Folch's method, "dry drop method", non-extractive derivatization.

For correspondence: Aripovskiy Alexandr Viktorovich, PhD. Chem. Sciences.; e-mail: aripovskiy@rambler.ru

For citation: A.V. Aripovskiy, P. O. Kolesnik, T. P. Kulagina, V. N. Titov. Preparation of samples for gas-chromatographic determination of fatty acids: direct transesterification of lipids of dry biological sample is preferred in comparison with the methods employing preliminary lipid extraction. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63(3): 141-147 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-141-147>

Acknowledgment. This study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interests.

Received 14.11.2017
Accepted 01.12.2017

Применение капиллярной газовой хроматографии сильно расширило возможности структурно-химического исследования липидов, позволяя быстро и надёжно разделять не только гомологичные или функционально различающиеся жирные кислоты (ЖК), но также их геометрические изомеры и изомеры положения. В последнее время количественное газохроматографическое определение индивидуальных ЖК в биологических объектах является одним из наиболее востребованных методов аналитической и клинической биохимии: оно широко используется при оценке пищевой ценности продуктов питания, для экономического и судебно-медицинского установления природы биологических образцов, в качестве источника информативных биомедицинских критериев в диагностике заболеваний разной этиологии [1–3].

Газохроматографическое определение спектра индивидуальных ЖК в биологическом образце требует, однако, обязательной предварительной химической дериватизации компонентов пробы – превращения жирнокислотных фрагментов глицеридов, фосфолипидов, эфиров холестерина, восков в летучие и термически устойчивые алкиловые эфиры ЖК (как правило, метиловые). Методы перевода липидов в метиловые эфиры ЖК подробнейшим образом изложены во многих обзорах – например, в [4, 5].

Весьма существенным с точки зрения химика является

тот факт, что процессы перевода глицеридов в метиловые эфиры ЖК являются реакциями нуклеофильного замещения у атома углерода карбоксильной группы ЖК и чувствительны к присутствию даже следовых количеств воды в образце. Только при хроматографическом анализе жиров и масел, которые практически не содержат влаги, навеска анализируемого вещества может быть непосредственно подвергнута действию метилирующего реагента. Для большинства биологических препаратов – тканей животных и растений, биомассы одноклеточных, препаратов крови и плазмы, биологических жидкостей – характерно высокое (20–98%) содержание воды: в этих случаях получение приемлемых выходов целевого продукта в ходе химической дериватизации липидов требует эффективного удаления воды (представляющей собой нуклеофильный агент существенно более мощный, нежели метиловый спирт). Для этой цели в лабораторной практике, как правило, используется экстракция биологических образцов бинарными смесями растворителей с высоким содержанием спирта [6–8]; при этом нелипидные спирторастворимые соединения (аминокислоты, углеводы, пигменты, витамины), способные сильно осложнить хроматографирование ЖК, удаляются в ходе последующего промывания экстрактов водными растворами солей.

Считается, что наилучшие результаты извлечения липи-

дов обеспечивают классический [6] метод Фолча (*Folch*) – МФ – и его различные модификации [8, 9]. Метод предполагает гомогенизацию образца в 20-кратном объеме смеси хлороформа с метанолом, взятых в соотношении 2:1 (иногда – с добавкой 5–20% воды или разбавленной уксусной кислоты), и отделение остатков матричного материала путём фильтрования или центрифугирования. Далее экстракт промывают 0,85% водным раствором *NaCl* (20% от объёма экстракта) для удаления метанола и спирторастворимых примесей. Растворитель удаляют в вакууме, липидный же остаток подвергают химической дериватизации.

В существенно менее популярном методе Хара – Рэдина [9] (МХР) пробы гомогенизируют в смеси гептана с изопропанолом, 3:2, используя 18-кратный объём данного экстрагента; для отмывания полярных компонентов применяется 0,5 М раствор сульфата натрия (40% от объёма органического экстракта).

Иные экстрагенты (смеси на основе этанола, этилацетата, метил-трет-бутилового и диэтилового эфиров) применяют сравнительно редко и лишь в особых случаях. Можно достаточно уверенно утверждать, что у большинства аналитиков и рутинный анализ, и научно-исследовательская экспериментальная работа в области жирнокислотного анализа биологических образцов прочно ассоциируются с понятием “экстракция по Фолчу”.

В то же время многие исследователи не без оснований считают порочным сам принцип предварительного экстракционного извлечения липидов из биологического образца. Значительная трудоёмкость и материалоемкость экстракционных методов, низкие выходы экстрагируемых липидов, существенные потери полярных липидов (прежде всего кислых), гликолипидов и липопротеинов в ходе отмывания экстракта водными растворами солей – все эти недостатки могут быть устранены в ходе прямой обработки исследуемого материала дериватирующим реактивом; воду же связывают большим избытком «водоотнимающего» реагента (хлористый ацетил, 2,2-диметоксипропан, метоксид натрия [5, 10–12]) или удаляют в ходе эффективного предварительного высушивания образца [13–15].

Подобный приём, судя по утверждениям авторов, позволяет существенно упростить процедуру анализа, сводя её к вакуумной или азеотропной сушке биологической пробы и кратковременной обработке сухого остатка дериватирующим реактивом; здесь представляется уместным отметить, что приготовление всего лишь одной пробы по МФ или МХР требует использования трёх отдельных лабораторных сосудов и последовательного выполнения семи препаративных операций. Безэкстракционный метод дериватизации (БМД) устраняет как неизбежные потери полярных и высокомолекулярных липидных конъюгатов (вообще не экстрагирующихся органическими жидкостями), так и потери водорастворимых кислых липидов в ходе отмывания экстрактов солевыми растворами. Более того, авторы [10, 12, 13, 15] обычно указывают на существенное – до 25% в сравнении с МФ – увеличение выхода метиловых эфиров ЖК при использовании БМД.

Однако критическое рассмотрение результатов работ по применению различных схем БМД с целью определения жирнокислотного состава образцов заставляет усомниться в исчерпывающем характере выводов, сделанных их авторами.

Во-первых, все подобные работы выполнялись с использованием высокодисперсных объектов – препаратов одноклеточных (микроорганизмы, эритроциты) или бесклеточных (плазма крови и её фракции, липопротеины и продукты их фракционирования). Представлялось весьма вероятным, что эффективность извлечения липидов из тканей многоклеточных должна сильно зависеть от степени измельчения исследуемых твердых образцов, однако литература не даёт

никаких указаний относительно максимально допустимых размеров частиц животной или растительной ткани, дериватируемой в БМД.

Во-вторых, авторы подобных работ обычно сравнивали результаты БМД с результатами использования “канонического” варианта МФ [6], т. е. экстракции образца простейшей смесью хлороформ – метанол, что в ряде случаев может оказаться не вполне корректным. Действительно, для многих объектов (лиофилизированные белки, липопротеины, высушенные микроорганизмы) первоначальный вариант МФ явно непригоден, поскольку фосфолипиды из полярной биологической матрицы можно извлечь только тройной смесью хлороформ – метанол – вода (5–15% воды); бинарная же смесь Фолча эффективно извлечь их не может. При экстракции липидов из таких объектов целесообразно [4] использовать систему метанол – хлороформ, содержащую около 5% воды по объёму, а для уменьшения потерь кислых липидов в ходе промывания экстракта следует вводить в смесь Фолча 0,5–2,0% уксусной кислоты.

Вызывает сомнение и вывод о кардинальном улучшении выхода ЖК при переходе к БМД. Ведь классический МФ [6] (с 20-кратным избытком экстрагента по отношению к экстрагируемому материалу) вообще-то и не претендовал на количественное извлечение липидов: их выход в указанных условиях составлял 85–95% (данная величина установлена основоположником метода путём многократных последовательных экстракций гомогенизированного материала). Существенное увеличение избытка экстрагента (затруднительное при крупномасштабных препаративных извлечениях, но вполне реальное в условиях аналитического эксперимента) могло бы полностью или частично устранить этот нежелательный эффект.

Таким образом, представляло определенный интерес квалифицированное сравнение результатов жирнокислотного анализа биологических образцов различной природы (ткани растений и животных, сухая биомасса микроорганизмов, бесклеточные препараты плазмы крови, концентраты и изоляты пищевых белков) с использованием БМД, с одной стороны, и наиболее современных и совершенных вариантов экстракционных МФ и МХР – с другой.

Практически важным казалось также исследование зависимости степени извлечения липидов (при БМД образца) от глубины предварительного измельчения материала. Общеизвестно, что эффективная гомогенизация большого числа образцов животных и растительных тканей представляет собой чрезвычайно трудоёмкий и утомительный процесс, сопровождается сильным разбавлением (а часто и загрязнением) проб. Измельчение образца каким-либо иным, менее изощрённым, способом могло бы ощутимо облегчить труд аналитика.

Материал и методы. Помимо образцов коммерческих пищевых продуктов, а также препаратов эритроцитов и плазмы крови, в работе использованы изолят соевого белка DB-909 (“*Pingdingshan Tianjing plant albumen Co.*”, КНР), изолят белка подсолнечника “Протемил” (“БиоТехнологии”, РФ) и сухой яичный белок (“Роскар”, РФ). Образцы лиофилизированной биомассы бактерий, дрожжей и грибов любезно предоставлены В.А. Самойленко (канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН).

Для получения твёрдых образцов с контролируемой степенью измельчения использован набор хроматографических сит из бронзовой проволоки с ячейками размером 0,2, 0,5, 0,7, 1,0, 1,4 и 2,0 мм. Образец, грубо измельчённый в ступке или на тёрке (с отверстиями диаметром 2,0–3,0 мм), последовательно просеивали или протирали сквозь указанные сита: собирали фракции с соответствующим максимальным размером частиц («менее 2,0 мм», «менее 1,4 мм», ..., «менее 0,2 мм»).

Использованные в работе растворители производства

Таблица 1

Экспериментальные величины суммарного содержания ЖК С14 – С24, определённые методом ГЖХ с использованием разных способов подготовки пробы

Объект Исследования	Среднее значение содержания суммы ЖК, мкг/г (найдено по методу Фолча, $n = 5$)	Относительное содержание суммы ЖК С14–С24 в пробе (за 100 единиц принято среднее значение, полученное по методу Фолча)		
		Метод Фолча ($n = 5$)	Метод Хара-Рэдина ($n = 5$)	Безэкстракционный метод ($n = 5$)
Субклеточные препараты				
Жидкий желток куриного яйца	317 000 А**	100 ± 6* А**	95 ± 8* В**	98 ± 5* Е**
Сухой белок куриного яйца	700 Б	100 ± 10 Б	89 ± 9 Г	97 ± 9 Е
Плазма крови человека жидкая	2210 А	100 ± 3 А	99 ± 1 В	99 ± 2 Е
Плазма крови, метод «сухой капли»	2160 Ж, Б	100 ± 5 Ж, Б	96 ± 6 Ж, Г	100 ± 2 Ж, Е
Изолят соевого белка DB-909	16900 Б	100 ± 5 Б	21 ± 2 В	104 ± 3 Е
	6400 А	38 ± 2 А		
Изолят белка подсолнечного шрота «Протемил»	19100 Б	100 ± 3 Б	54 ± 4 Г	105 ± 3 Д
	13300 А	70 ± 2 А	32 ± 3 В	109 ± 3 Е
Молоко сухое обезжиренное	5900 Б	100 ± 5 Б	95 ± 6 Г	99 ± 5 Е
Молоко жидкое 3,2%	22300 А	100 ± 3 А	97 ± 2 В	100 ± 2 Е
Препараты одноклеточных				
Биомасса дрожжей <i>Saccaromyces cerevisiae</i> (лио-филизат)	33200 Б	100 ± 4 Б	64 ± 3 Г	116 ± 5 Е
	10600 А	32 ± 2 А	30 ± 2 В	
Биомасса бактерий <i>Pseudomonas aureofaciens</i> (лио-филизат)	31700 Б	100 ± 2 Б	64 ± 6 Г	103 ± 2 Е
				104 ± 2 Д
Биомасса бактерий <i>Bacillus subtilis</i> (лиофилизат)	12500 Б	100 ± 6 Б	74 ± 11 Г	118 ± 7 Д
				117 ± 4 Е
Биомасса гриба <i>Trichoderma harzianum</i> (лиофили-зат)	45500 Б	100 ± 2 Б	74 ± 3 Г	108 ± 3 Д
				108 ± 3 Е
Жидкий препарат эритроцитов	320 А	100 ± 6 А	73 ± 8 В	103 ± 6 Д
				104 ± 7 Е
Жидкий препарат эритроцитов, “метод сухой капли”	300 Ж, Б	100 ± 5 Ж, Б	–	111 ± 6 Ж, Е
Препараты тканей многоклеточных				
Спинная мышца трески	3810 А	100 ± 6 А	103 ± 8 В	112 ± 7 Е
Грудная мышца бройлера	9410 А	100 ± 7 А	92 ± 7 В	131 ± 6 Е
Печень говяжья	20770 А	100 ± 9 А	83 ± 10 В	114 ± 5 Е
Рисовое зерно	5670 Б	100 ± 3 Б	81 ± 3 Г	117 ± 4 Е
Перец черный	6390 А	100 ± 5 А	94 ± 8 В	109 ± 4 Е
Бобы чечевицы	16550 А	100 ± 3 А	86 ± 5 В	105 ± 2 Е
Корень имбиря	970 А	100 ± 3 А	81 ± 3 В	117 ± 4 Е
Кофе «Арабика», бобы	128 000 А	100 ± 2 А	101 ± 2 В	100 ± 2 Е
Корица молотая	37400 Б	100 ± 4 Б	100 ± 5 Г	107 ± 3 Е
Мякоть тыквы	560 А	100 ± 16 А	80 ± 3 В	99 ± 6 Е
Соцветия цветной капусты	1460 А	100 ± 3 А	84 ± 7 В	98 ± 4 Е
Шампиньон, мякоть шляпки	3400 А	100 ± 9 А	82 ± 7 В	99 ± 7 Е

Примечание. * – среднее значение и его доверительный интервал для надежности $p \geq 0,95$; ** – вариант метода подготовки пробы (см. раздел Методы предварительной подготовки пробы).

фирмы «МЕРК» (ФРГ) – н-гептан, толуол, метанол, изопропанол – перед применением перегоняли. Для химической дериватизации применяли метоксид натрия и 15%-ный метанольный раствор трёхфтористого бора того же производителя (квалификация «для синтеза»). В качестве внутренних стандартных образцов использовали тримаргароилглицерин и маргариновую кислоту («Сигма», США, около 99% основного вещества).

Инертные пористые диски высокой влагоёмкости для определения состава ЖК в липидах плазмы по «методу сухой капли» готовили [16] из фторопластовой фильтровальной бумаги МФФК-Г («Технофильтр», РФ).

Хроматографическое определение индивидуальных средне- и длинноцепочечных ЖК в форме метиловых эфиров выполнено с использованием аналитического газового хроматографа фирмы «Вариан», США, модель 3900, и квар-

цевой капиллярной колонки «Супелковакс-10» («Супелко», Швейцария) размером 15 м х 0,25 мм х 0,25 мкм. Стандартная аналитическая процедура включала программирование температуры колонки от 100 до 245°C (задержка 0,5 мин) со скоростью 10°C/мин (разделение требует 14–17 мин) и пламенно-ионизационное детектирование пиков разделённых веществ. Регистрация хроматографических пиков проведена с помощью компьютерной программы «Мультихром-1,5х» («Амперсэнд», РФ), количественное определение содержания ЖК в пробах выполнено методом внутреннего стандартного образца, статистическая обработка – с использованием программы Microsoft Excel.

Методы предварительной подготовки проб. А. Классический вариант метода экстракции по Фолчу (МФ). Навеску 20–60 мг исследуемого материала и раствор 40–250 мкг тримаргароилглицерина в 50 мкл толуола помещали в патрон

стеклянного пестикового гомогенизатора, прибавляли 5,0 мл смеси хлороформа с метанолом (взятых в соотношении 2:1) и гомогенизировали до состояния однородной слабо опалесцирующей жидкости. Соотношение объёмов экстрагента и экстрагируемой пробы в данном случае близко к 100 (в классическом варианте МФ – 20). Гомогенизат центрифугировали, осторожно декантировали прозрачный супернатант в мерную пробирку и промывали при интенсивном встряхивании изотоническим раствором хлорида натрия (20% от объёма экстракта). Эмульсию вновь центрифугировали, часть хлороформного слоя пипеткой переносили в пробирку для дериватизации (с завинчивающейся крышкой и самоуплотняющейся тефлон-силиконовой прокладкой); упаривали экстракты досуха в вакууме ротационной сушилки (вакуумной центрифуги) модели «Савант».

Б. Модифицированный вариант метода экстракции по Фолчу. Процедура отличается от описанной в варианте А тем, что гомогенизацию биологического образца проводили в 5,0 мл хлороформ-метанольной смеси, содержащей 5 объёмных процентов 8%-ного водного раствора уксусной кислоты. В качестве внутреннего стандартного образца могут быть использованы как тримаргароилглицерин, так и свободная маргариновая кислота.

В. Классический вариант МХР. Процедура отличается от изложенной в варианте А тем, что гомогенизация проводилась в смеси н-гептана и изопропанола (3:2). Для промывания экстракта использовали раствор сульфата натрия (1 г безводной соли в 15 мл воды), взятый в объёме 40% от объёма экстракта.

Г. Модифицированный вариант МХР. Процедура отличается от изложенной в варианте В тем, что гомогенизацию проводят в спирт-гептановой смеси, содержащей 5 объёмных процентов 8%-ного водного раствора уксусной кислоты. В качестве внутреннего стандартного образца при этом можно использовать как свободную маргариновую ЖК, так и тримаргароилглицерин.

Д. Безэкстракционный метод с гомогенизацией биоматериала. Навеску исследуемого материала – 20–60 мг биологической жидкости или ткани многоклеточных, 5–20 мг порошкообразного безводного биологического материала – гомогенизировали с 50 мкл толуольного раствора 40–250 мкг маргариновой кислоты (или тримаргароилглицерина) и 3 мл 0,5% раствора уксусной кислоты в смеси хлороформа с метанолом (взятых в соотношении 5:1). Гомогенизат количественно переносили в пробирку для дериватизации, удаляли растворители в вакууме ротационной сушилки «Савант».

Е. БМД без гомогенизации биоматериала. Навеску исследуемого материала – 20–60 мг биологической жидкости или одной из фракций измельчённой ткани многоклеточных ($\leq 2,0$ мм, $\leq 1,4$ мм, ... $\leq 0,2$ мм), 5–20 мг порошкообразной биомассы одноклеточных или иного безводного биологического материала – отбирали в пробирку для дериватизации, добавляли раствор 40–250 мкг маргариновой кислоты или тримаргароилглицерина в 50 мкл толуола и сушили смесь в вакууме в течение 15–20 мин. Сухой остаток подвергали непосредственной химической дериватизации.

Ж. «Метод сухой капли» в применении к произвольным жидким образцам [16]. «Диск» (т. е. круглый или прямоугольный фрагмент фторопластовой бумаги МФФК-Г массой 15–20 мг, отмытый в аппарате Сокслета смесью хлороформа с 20% метанола) помещали на поверхность чистой тефлонной пластинки, автоматической пипеткой наносили 50–100 мкл жидкости (например, плазмы крови) и сушили при комнатной температуре в течение 1 ч. Раствор внутреннего стандарта (40–100 мкг тримаргарина в 50 мкл толуола) добавляли в реакционный сосуд перед дериватизацией пробы.

В качестве «диска» в принципе может быть использован и фрагмент целлюлозной – фильтровальной или хроматографической – бумаги той же массы, однако в этом случае нагрузка «диска» жидкой пробой должна быть уменьшена до 10–20 мкл вследствие относительно низкой влагоёмкости целлюлозной бумаги (по этому параметру, как и по параметрам химической инертности, целлюлозная бумага всех сортов значительно уступает рекомендуемому фторопластовому материалу).

Химическая дериватизация образцов. Для получения метиловых эфиров ЖК использована слегка модифицированная методика двустадийной дериватизации [12, 15]. Объект исследования (сухой экстракт липидов пробы, высушенная в вакууме навеска биомассы, диск из фторопластовой бумаги с сухой пробой биологической жидкости) обрабатывали смесью 200 мкл сухого толуола с 250 мкл 0,6 N метанольного раствора метоксида натрия при 68–70°C в течение 20 мин, после чего к пробе прибавляли 350 мкл 15%-ного раствора трёхфтористого бора в метаноле и вновь нагревали 20 мин при той же температуре. Охлаждали пробу, добавляли 1,0 мл н-гептана и 600 мкл воды, встряхиванием экстрагировали метиловые эфиры ЖК в органический слой. В большинстве случаев эффективное спонтанное расслоение водно-спиртовой и углеводородной фаз происходило уже через 30–60 с.

В некоторых случаях, при высоком содержании белка в пробе, разделение компонентов эмульсий требовало крат-

Таблица 2

Влияние степени измельчения биологического образца на эффективность извлечения ЖК при безэкстракционном методе дериватизации

Объект исследования	Суммарное содержание ЖК С14–С24, БМД гомогенизата (частицы 1,5–3,5 мкм), мкг/г Метод Д*, n = 5	Относительное суммарное содержание ЖК С14–С24 как функция размера частиц исследуемого материала при БМД: за 100 единиц принято значение, найденное по методу Фолча (метод Б, см. табл.1)						
		Гомогенизат (фракция 1,5–3,5 мкм) Метод Д*, n = 5	Фракция $\leq 0,2$ мм Метод Е*, n = 5	Фракция $\leq 0,5$ мм Метод Е*, n = 5	Фракция $\leq 0,7$ мм Метод Е*, n = 5	Фракция $\leq 1,0$ мм Метод Е*, n = 5	Фракция $\leq 1,4$ мм Метод Е*, n = 5	Фракция $\leq 2,0$ мм Метод Е*, n = 5
Спинная мышца трески	4 260**	112 ± 7**	108 ± 3**	108 ± 4**	104 ± 4**	103 ± 5**	102 ± 5**	92 ± 6**
Грудная мышца бройлера	12 290	131 ± 6	111 ± 6	116 ± 4	111 ± 4	103 ± 6	96 ± 7	91 ± 6
Печень бычья	23 600	114 ± 5	114 ± 8	108 ± 4	116 ± 7	102 ± 6	104 ± 5	97 ± 5
Перец черный	6 980	109 ± 4	111 ± 5	109 ± 5	114 ± 5	103 ± 5	89 ± 4	67 ± 5
Бобы чечевицы	17 310	105 ± 2	103 ± 1	104 ± 3	99 ± 2	100 ± 2	98 ± 3	98 ± 2
Соцветия цветной капусты	1 430	98 ± 4	96 ± 5	101 ± 4	98 ± 4	103 ± 6	75 ± 7	68 ± 6
Мякоть шляпки шампиньона	300	99 ± 7	100 ± 7	106 ± 7	108 ± 6	94 ± 9	90 ± 7	85 ± 4

Примечание. * – вариант метода подготовки пробы (см. Методы предварительной подготовки пробы); ** – среднее значение и его доверительный интервал для надежности $p \geq 0,95$.

ковременного (30–60 с) центрифугирования пробы в низ-кооборотной (300–600 об/мин) центрифуге ротационной су-шилки «Савант» (иногда – с добавлением 50 мкл этилового спирта к верхней фазе).

Чрезвычайно эффективный альтернативный метод раз-рушения эмульсии состоит в её фильтровании сквозь слой гранулированного безводного сульфата натрия (200–300 мг гранулированной соли помещают на небольшом ватном там-поне в полипропиленовый наконечник для автоматической пипетки и предварительно промывают небольшими порция-ми чистого гептана).

Результаты и обсуждение. Данные об эффективности из-влечения ЖК из образцов различных биологических материа-лов с использованием МФ, МХР и БМД приведены в табл. 1.

Легко видеть, что в некоторых случаях использование модифицированных (Б, Г) вариантов экстракционных ме-тодов позволяет резко увеличить выход метиловых эфиров в сравнении с классическими вариантами МФ и МХР (А, В). Действительно, применение большого избытка кислого четырёхкомпонентного экстрагента Фолча (хлороформ – ме-танол – вода – уксусная кислота, метод Б) даёт возможность эффективно извлекать липиды и из совершенно сухих объ-ектов – изолятов растительных белков и биомассы высушен-ных микроорганизмов, – для которых классический вариант МФ (А) оказывается неприменимым.

Одновременно не вызывает сомнения и то, что БМД (в варианте Д) отличается универсальностью, простотой и ско-ростью исполнения, обеспечивая по меньшей мере не худ-шие – а иногда и значительно лучшие – показатели эффек-тивности извлечения ЖК в виде их эфиров.

Практически интересной представляется возможность существенного упрощения определений ЖК в биологиче-ских жидкостях за счёт использования бумаги МФФК-Г – отечественного фторопластового фильтрующего материала высокой влагоёмкости (до 85% воды от массы влажного об-разца) – в качестве носителя в “методе сухой капли” (вариант Ж). Этот материал, весьма удобный для длительного кон-сервирования образцов крови и плазмы в условиях полевых работ [16], может быть с успехом использован и как носитель пробы в рутинном жирнокислотном анализе произвольных жидких проб: в этом случае подготовка хроматографируемой пробы уже не требует ни специального оборудования, ни ва-куумной техники, ни серьезных трудозатрат.

В ходе изучения зависимости между эффективностью извлечения липидов и размерами частиц исследуемого мате-риала возникает понятный интерес к вопросу о действи-тельной глубине разрушения биологических структур в процессе измельчения тканей различными способами. Так, с использованием оптического микроскопа *Leica DM-1000* мы оценили размер частиц окрашенных растительных мате-риалов (корица, бобы кофе, черный перец) после их квали-фицированного перетирания в пестиковом гомогенизаторе с хорошо пришлифованными стеклянными рабочими поверх-ностями. Основная масса полученных микрочастиц характе-ризовалась диаметрами 1,5–3,5 мкм; существенно меньшей была доля более мелких частиц, а крупные (более 5 мкм) встречались весьма редко.

Таким образом, измельчение биологического материа-ла в стандартном “микробиологическом” пестиковом го-могенизаторе действительно обеспечивает диспергиро-вание до фрагментов субклеточного размера. Приходится констатировать, что разрушение довольно крупных клеток эритроцитов, дрожжей и микроскопических грибов в ходе гомогенизации соответствующих препаратов никак не сказывается на выходе метиловых эфиров в варианте БМД (см. данные крайней правой столбца таблицы 1 о сравнительной эффективности методов Д и Е): наличие неповреждённой клеточной мембраны очевидным обра-

зом не препятствует эффективному извлечению липидов из клетки в ходе БМД.

Результаты, приведенные в табл. 2, позволяют с опреде-лённым оптимизмом оценить перспективы использования БМД в ходе серийного жирнокислотного анализа твердых биологических образцов. Хотя выход метиловых эфиров ЖК в БМД ощутимо снижается с увеличением размеров частиц исследуемого препарата, но даже при весьма грубом измель-чении подобного материала (для частиц с размером до 1,0 мм) данный метод позволяет добиться лучших результатов, нежели наиболее совершенные варианты МФ.

Измельчение твердого и хрупкого биологического сырья (с целью получения частиц размера 0,1–1,0 мм) не вызы-вает затруднений и может быть выполнено его перетирани-ем в ступке или дроблением в шаровой мельнице с последу-ющим просеиванием сквозь соответствующее сито. Задача несколько усложняется при переходе к нехрупким объектам (мясо, рыба, растительные ткани с высоким содержанием влаги), поскольку их протирание сквозь сита с мелкими ячейками (0,1–0,2 мм) уже требует значительных физиче-ских усилий и не обеспечивает достаточно высокого выхода измельчённого материала; в то же время использование сит из тонкой металлической проволоки (латунь или нержавею-щая сталь) с размером ячеек от 0,4 до 0,7 мм позволяет выполнять эту операцию быстро и эффективно. Кроме того, данное затруднение несложно устранить предварительным тонким дроблением замороженного материала (или исполь-зованием портативных измельчающих устройств экстрази-онного, куттерного или волчкового типов).

В качестве дополнительного преимущества двустадий-ного метода дериватизации образца, изложенного в разделе «Химическая дериватизация образцов», следует упомянуть его нечувствительность к присутствию довольно значи-тельных количеств остаточной влаги в анализируемом материале (до 10–20% от его массы). Эта особенность ме-тода определяется, разумеется, способностью алкоголята натрия к мгновенному связыванию эквимолярного количе-ства воды: образующийся в ходе гидролиза едкий натр в спиртовом растворе является практически столь же эффек-тивным сапонифицирующим и метилирующим агентом, как и исходный метоксид натрия. Данное преимущество, отмеченное и ранее [12] в ходе исследования частично вы-сушенной биомассы водорослей, позволяет вообще опу-стить стадию вакуумной или азеотропной сушки образца в случае исследования состава ЖК зерновых, бобовых и других биоматериалов с невысокой естественной влажно-стью. Весьма мягкие режимы сушки (обезвоживание «до визуально сухого состояния», что соответствует нескольким весовым процентам остаточной влажности образца) могут быть применены и для подготовки образцов материалов с высоким содержанием влаги – мяса, рыбы, молока, компо-нентов крови и иных биомедицинских объектов. Действи-тельно, выполненная нами экспериментальная проверка показывает, что непосредственная дериватизация липидов в «сырых» (без предварительного удаления 3–12% остаточ-ной влаги) образцах рисовой муки, измельчённого чёрного перца, кофейных зёрен предлагаемым двустадийным мето-дом приводит в точности к тем же результатам, что и в ходе обработки образцов, высушенных в вакууме масляного насоса до постоянной массы.

Выводы. Подробное сравнительное исследование не по-зволило нам обнаружить у классических экстракционных ме-тодов (метод Фолча, метод Хара–Рэдина) ни одного сколько-нибудь ощутимого преимущества в сравнении с безэкстрак-ционным методом подготовки биологической пробы для последующего количественного определения ЖК методом ГЖХ. Безэкстракционный метод обеспечивает не меньшие, а во многих случаях и ощутимо более высокие степени

извлечения целевых веществ, позволяет принципиальным образом упростить, облегчить и ускорить процедуру подготовки хроматографируемой пробы, резко снизить как расход материалов, так и риск загрязнения или окисления образца. Данный подход оказывается весьма эффективным и в применении к исследованию произвольных жидких материалов биологической природы: вариант «метода сухой капли» на пористых дисках из целлюлозной или (предпочтительно) фторопластовой фильтрующей бумаги позволяет легко выполнять одновременную подготовку большого количества экспериментальных проб вообще без использования вакуумного оборудования.

Достаточно неожиданным и практически важным представляется тот факт, что безэкстракционный метод (в отличие от методов Фолча, Хара–Рэдина) не требует эффективной гомогенизации исследуемого материала, т. е. его измельчения до фрагментов микронного размера. Даже для довольно крупных (0,2–1,0 мм) частиц исследуемого биологического материала безэкстракционная дериватизация обеспечивает лучшие показатели эффективности извлечения биологических ЖК, нежели наиболее совершенные варианты метода Фолча – для гомогенизированных (то есть измельченных до частиц микронных размеров) образцов того же материала.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-14 см. REFERENCES)

15. Ариповский А.В., Колесник О.П., Веждел М.И., Титов В.Н. Метод подготовки проб для хроматографического определения жирных кислот без предварительной экстракции липидов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 1: 3 - 6.
16. Ариповский А.В., Астахова Е.А., Колесник П.О., Кулагина Т.П., Шушман И.В., Титов В.Н. Перспективный фторопластовый пористый носитель для консервирования и пересылки проб плазмы крови: применение «метода сухой капли» с целью последующего определения индивидуальных жирных кислот. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(9): 517 – 26.

REFERENCES

1. Harris W.S., von Schacky C. The Omega-3 Index: a New Risk Factor from Coronary Heart Disease. *Prev. Med.* 2004; 39(1): 212.
2. Young G., Conquer J. Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. *Reprod. Nutr. Dev.* 2005; 45(1): 1.

3. Kabagambe E.K., Ezeamama A.E., Guwatudde D., Campos H., Fawzi W.W. Plasma n-6 fatty acid levels are associated with CD4 cell counts, hospitalization, and mortality in HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2016; 73(5): 598.
4. Cristie W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Advances in Lipid Methodology –Two*. Dundee: Ed. W.W.Cristie, Oily Press, 1993. P. 69. <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=40374> (16.10.2017г.)
5. AOCS Lipid Library. Literary Survey. Combined Extraction-Esterification of Fatty Acids. <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=39377> (16.10.2017г.)
6. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A Simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226(1): 497.
7. Reis A., Rudnitskaya A., Blackburn G.J., Fauzi N.M., Pitt A.R., Spickett C.M. A Comparison of five lipid extraction systems for lipiodic studies of human LDL. *J. Lipid Res.* 2013; 54(7): 1812.
8. CYBERLIPID CENTER. Lipid Extraction General Methodologies. www.cyberlipid.org/extract/extr0002.htm# (16.10.2017г.)
9. Hara A., Radin N.S. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 1978; 90(1): 420.
10. Lepage G., Roy C.C. Improved recovery of fatty acids through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res.* 1984; 25(12): 1392.
11. Glaser C., Demmelmaier H., Koletzko B. High-throughput analysis of total plasma fatty acid composition with direct in situ transesterification. *PLoS*. 2010; 5(8): e12045.
12. Griffiths M.J., van Hille R.P., Harrison S.T. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae. *Lipids*. 2010; 45(11): 1053.
13. Sattler W., Puhl H., Hayn N. Determination of fatty acids in the main lipoprotein classes by capillary GC: BF₃/methanol transesterification of lyophilized samples Instead of Folch extraction gives higher yields. *Anal. Biochem.* 1991; 198(1): 181.
14. Lakshmy R., Gupta R., Prabhakaran D., Snehi U., Reddy K.S. Utility of dried blood spots for measurement of cholesterol and triglycerides in a surveillance study. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2010; 4(2): 258.
15. Aripovskiy A.V., Kolesnik O.P., Vezhdel M.I., Titov V.N. Method of preparing samples for the chromatographic determination of the fatty acids without preliminary extraction of lipids. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 1: 3 - 6. (in Russian)
16. Aripovskiy A.V., Astakhova E.A., Kolesnik P.O., Kulagina T.P., Shushman I.V., Titov V.N. Promising media for preservation, transfer of serum samples by means of “dry drop” method for the determination of individual fatty acids. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(9): 517 – 26. (in Russian)

Поступила 14.11.17

Принята к печати 01.12.17

ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МЕТАФИЛАКТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» 117198, Москва

Проведена оценка результатов лечения и последующего 5-летнего наблюдения за 316 пациентами, страдающими уролитиазом, которым после комплекса исследований, включающего хромато-масс-спектрометрическое определение содержания в моче литогенных веществ, определение активности гидролитических ферментов, установление типа нарушения обмена, индивидуально рекомендован комплекс лечебно-профилактических мероприятий с повторным ежегодным динамическим контролем. Использование хроматографических тестов в оценке эффективности проводимого профилактического лечения с определением временных колебаний исследуемых параметров у больных с различными типами камнеобразования позволило снизить частоту рецидивов камнеобразования в обследуемой группе до 16,5% по сравнению с результатами, полученными в контрольной группе больных (32,5%). С учетом данных хроматографических показателей представляется оправданным использование их в оценке эффективности проводимого профилактического лечения с определением временных колебаний исследуемых параметров у больных с различными типами камнеобразования.

Ключевые слова: мочекаменная болезнь; активаторы камнеобразования; хромато-масс-спектрометрия; литогенные вещества; рецидивный уролитиаз; метафилактика.

Для цитирования: Сулейманов С. И., Кадыров З.А., Рамишвили В.Ш. Обоснование эффективности современных методов лабораторного контроля при проведении метафилактических мероприятий у пациентов с различными формами мочекаменной болезни. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (3): 148-152. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-148-152>

Suleymanov S.I., Kadyrov Z.A., Ramishvili V.Sh.

THE SUBSTANTIATION OF EFFICIENCY OF MODERN TECHNIQUES OF LABORATORY CONTROL UNDER IMPLEMENTATION OF METAPHYLACTIC ACTIVITIES IN PATIENTS WITH VARIOUS FORMS OF UROLITHIASIS

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

The article presents the results of evaluation of treatment and subsequent five-years observation of 316 patients with urolithiasis that were individually recommended a complex of curative preventive activities with repeated annual dynamic control after a complex of analyses including chromatographic mass-spectrometric detection of content of lithogenic substances, of activity of hydrolytic enzymes, establishment of type of metabolism disorders. The application of chromatographic tests for evaluation of efficiency of implemented preventive treatment with detection of temporarily variations of analyzed parameters in patients with various types of lithogenesis permitted to decrease rate of relapses of lithogenesis in examined group up to 16.5% as compared with the results in control group of patients (32.5%). It is reasonable, considering data of chromatographic indices, to apply them in evaluation of efficiency of applying preventive treatment with detection of temporarily variations of analyzed parameters in patients with various types of lithogenesis.

Key words: urolithiasis; activators of lithogenesis; chromatographic mass-spectrometry; lithogenic substances; relapsing urolithiasis; metaphylaxis

For citation: Suleymanov S.I., Kadyrov Z.A., Ramishvili V.Sh. The substantiation of efficiency of modern techniques of laboratory control under implementation of metaphylactic activities in patients with various forms of urolithiasis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(3): 148-152. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-148-152>

For correspondence: Suleymanov S.I., candidate of medical sciences, associate professor of the chair of endoscopic urology of the Faculty of Post-Graduate training of medical personnel of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "The Peoples' Friendship University of Russia", e-mail:

Information about authors:

Suleymanov S.I., <http://orcid.org/0000-0002-0461-9885>

Kadyrov Z.A., <http://orcid.org/0000-0002-1108-8138>

Ramishvili V.Sh., <http://orcid.org/0000-0001-9431-3478>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 23 .01.2018
Accepted 29 .01.2018

Мочекаменная болезнь (МКБ) является одним из распространённых урологических заболеваний, нередко склонных к тяжёлому течению и рецидивам [1, 2].

В распознавании МКБ имеет значение не только факт установления наличия, локализации, размеров и конфигурации конкрементов, но и выявление причины камнеобразования, а также предрасполагающих к нему и рецидивам условий [3–5].

В большинстве трудов, посвящённых проблеме лечения и профилактики рецидивов МКБ, не обращается должное внимание на современные диагностические возможности. Обследование больных носит непоследовательный характер. При выборе диагностического метода не учитывается его информативность [6–9].

Необходимость улучшения методов диагностики, позволяющих в полной мере оценить тяжесть течения МКБ, а также риск возникновения рецидива камнеобразования определили цель данного исследования.

Целью настоящей работы явилась диагностическая оценка эффективности современных методов лабораторного контроля при проведении лечебно-профилактических мероприятий у пациентов с различными формами МКБ.

Материал и методы. В рамках настоящего исследования проведена оценка результатов лечения и последующего 5-летнего наблюдения за 316 пациентами, страдающими МКБ, которым после комплекса исследований, включающего хромато-масс-спектрометрическое определение содержания в моче литогенных веществ, определение активности гидролитических ферментов и типа нарушения обмена, индивидуально рекомендован комплекс лечебно-профилактических мероприятий с повторным ежегодным динамическим контролем.

С целью клинко-лабораторной оценки тяжести течения МКБ и эффективности лечебно-профилактических мероприятий все пациенты были объединены в следующие группы:

- в I группу включены 167 пациентов из общего числа обследуемых больных, госпитализированных в стационар с диагнозом МКБ, впервые возникший приступ почечной колики. Пациентам этой группы после самостоятельного отхождения камня или в послеоперационном периоде проводились специализированные клинко-биохимические тесты, позволяющие оценить риск развития рецидива заболевания;

- во II группу вошли 98 пациентов со сложными формами МКБ (коралловидные или односторонние множественные камни, камни единственной почки, рецидивные камни, а также двусторонние камни), латентным течением хронического пиелонефрита, которые были подвергнуты комплексному хроматографическому обследованию, позволяющему не только оценить степень активности процессов камнеобразования, но и прогнозировать частоту развития рецидивного уrolитиаза;

- в III группу включён 51 пациент, длительное время страдавший уrolитиазом и госпитализированный с камнями различной локализации в мочевыводящих путях в активной фазе пиелонефрита, сопровождающейся лихорадкой и выраженными изменениями лабораторных показателей (осложнённое течение МКБ). Предложенные нами диагностические тесты позволили не только оценить тяжесть течения основного заболевания, но и детально рассмотреть факторы, осложняющие течение уrolитиаза.

Методику хромато-масс-спектрометрического анали-

за использовали для определения литогенных веществ - щавелевой, мочевой и фосфорной кислот, а также органических кислот и соединений.

Определение летучих жирных кислот (пропионовая, масляная, валериановая, капроновая и другие), фенолов и крезолов в моче выполняли по методике В.М. Mitruka в модификации Л.Л. Шимкевича и В.Г. Истратова с экстракцией диэтиловым эфиром летучих компонентов и прямым вводом в испаритель газового хроматографа.

Для хромато-масс-спектрометрических исследований использовали газовую хромато-масс-спектрометрическую систему Hewlett-Packard с газовым хроматографом HP-6890 и масс-селективным детектором MSD-5973.

Идентификацию соединений проводили с помощью химической станции GS/MSD – Chemt/Station, работающей в режиме Microsoft Windows. Химическая станция обеспечивает полный автоматизированный контроль всех рабочих параметров системы газового хроматографа серии HP 6890, включая электронный контроль потоков (EPC).

Вместе с этим на основании анализа данных историй болезни проведена ретроспективная оценка результатов лечения 40 пациентов контрольной IV группы, страдающих различными формами МКБ, которые получали стационарное лечение, включая хирургическое, и соответствующие рекомендации лишь на основании общеклинического обследования.

С этой целью составлены анкеты, включающие характер жалоб при поступлении пациента в стационар, данные анамнеза, результаты ультразвукового и комплексного рентгенологического обследования, общеклинические данные: общего анализа крови, определения содержания в сыворотке крови мочевины, креатинина, билирубина, глюкозы, печёночных ферментов, электролитов, общего анализа и исследования мочи по Нечипоренко. При этом обращали внимание на характер солей в мочевом осадке, степень бактериурии.

Современные лабораторные методы исследования применяли на базе клинко-биохимической лаборатории клинко-диагностического отдела ФГБУ «Институт хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России.

Результаты. Прежде чем рассматривать метафилактику по конкретным типам МКБ, мы обращали внимание на некоторые общие принципы антилитогенной и противорецидивной терапии, включающие:

- установление этиологических факторов и определение патогенеза болезни с учётом типа камнеобразования перед проведением консервативного лечения;

- оценку физического состояния мочи по содержанию в ней литогенных веществ с учётом типа камнеобразования (кальция, фосфатов, оксалатов, мочевой кислоты, магния), вида кристаллурии, pH, инфекции и других параметров;

- сведения о химическом составе удалённых или самостоятельно отошедших мочевых камней;

- ограничение поступления с пищей и питьевой жидкостью литогенных веществ по конкретному типу камнеобразования, т. е. лечебную диету и соответствующий водный режим;

- включение в диету полезных пищевых компонентов, противостоящих конкретному типу камнеобразования;

- воздействие на обменные процессы с помощью диеты, медикаментов и других лечебно-профилактических

средств, снижающих концентрацию литогенных веществ в сыворотке крови и моче;

- воздействие на транспорт литогенных веществ на уровне канальцев почек с учётом выведения их с мочой;

- ограничение процессов кристаллизации литогенных веществ в моче за счёт изменения ее физико-химических параметров (рН, концентрации солей, уростаза);

- индивидуальный динамический контроль за эффективностью лечения с оценкой положительных и отрицательных его результатов.

Перечень препаратов, используемых при всех формах уrolитиаза:

- ангиопротекторы и антиагреганты;
- мочегонные (в том числе антиазотемические), противовоспалительные, камнеизгоняющие средства и препараты растительного происхождения;
- антибактериальные средства (индивидуальный приём);
- анальгетики;
- спазмолитики.

Проводя хроматографический анализ эффективности лечебно-профилактических мероприятий в I группе больных с неосложнённым течением уrolитиаза, мы отметили тенденцию к снижению уровня литогенных веществ в период диспансерного наблюдения практически при всех видах нарушения обмена (табл. 1).

Следует отметить, что у больных с кальций-оксалатной формой МКБ уровень щавелевой кислоты в среднем снижался с 3,42 до 2,12 ммоль/сут ($p < 0,05$). У пациентов с фосфатным уrolитиазом динамика колебания уровня фосфорной кислоты по итогам анализируемого периода варьировала от 6,12 до 5,07 ммоль/сут ($p < 0,05$). Суммарное снижение уровня мочевой кислоты в группе больных с уратным типом камнеобразования за весь период наблюдения составило 1,06 ммоль/сут и колебалось в диапазоне 3,98 – 2,92 ммоль/сут ($p < 0,05$).

Существенным показателем, позволяющим оценить результат проводимого комплекса лечебно-профилактических мероприятий, явился анализ динамики колебаний уровня пептидогидролаз, не только участвующих в процессе формирования органической матрицы камня, но и определяющих функциональное состояние паренхимы почки.

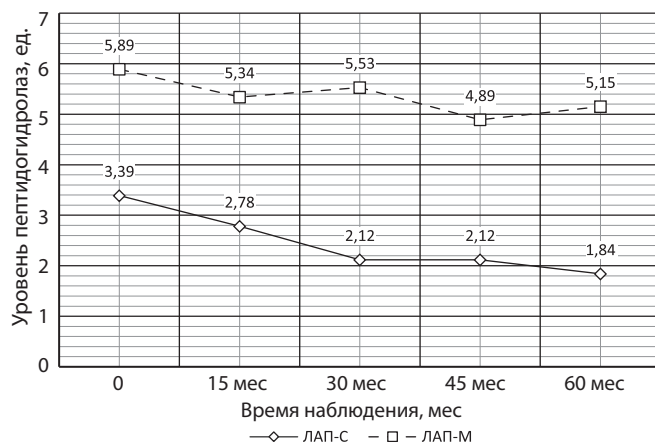


Рис. 1. Динамика колебаний уровня гидролитических ферментов у больных МКБ ($n = 98$).

Таблица 1

Динамика колебаний активаторов камнеобразования в I группе больных за исследуемый период

Активаторы камнеобразования, ммоль/сут*	Время наблюдения, мес				
	0	15	30	45	60
ЛЖК	0,219	0,162	0,094	0,067	0,018
Фенолы	0,56	0,56	0,43	0,39	0,34
Крезолы	2,28	2,26	2,19	2,18	2,185
Мочевая кислота	3,98	3,72	3,46	3,12	2,92
Фосфорная кислота	6,12	6,06	5,47	5,44	5,07
Щавелевая кислота	3,42	3,12	2,88	2,36	2,12

Примечание. * – при ежегодном анализе полученных результатов оценивали уровни литогенных веществ в 3 порциях мочи.

Таблица 2

Динамика колебаний активаторов камнеобразования в III группе больных за исследуемый период

Активаторы камнеобразования, ммоль/сут	Время наблюдения, мес				
	0	15	30	45	60
ЛЖК	0,278	0,263	0,268	0,253	0,217
Фенолы	0,72	0,69	0,63	0,69	0,54
Крезолы	3,12	3,12	2,93	2,68	2,68
Мочевая кислота	6,26	6,2	5,97	5,54	4,96
Фосфорная кислота	8,11	7,6	8,02	7,22	6,98
Щавелевая кислота	7,59	6,12	6,98	6,23	5,89

Наши исследования показали достоверное снижение уровня лейцинаминопептидазы цитозольной (ЛАП-С) у пациентов с кальций-оксалатной и мочевиной формами МКБ по итогам анализируемого периода с 2,98 до 1,12 ед. При этом уровень лейцинаминопептидазы микросомальной (ЛАП-М) снизился с 4,21 до 2,75 ед., что безусловно позволило улучшить итоговые результаты лечения в группе больных с впервые возникшим приступом почечной колики.

Несмотря на строгое соблюдение комплекса лечебно-профилактических мероприятий в течение всего периода диспансерного наблюдения, повторное обращение в стационар зарегистрировано в 9,6% случаев, что составило 16 пациентов от общего числа больных I группы.

Не менее многочисленную группу 98 (31%) составили больные со сложными формами МКБ. В процессе проведения метафилактики у этой группы больных наиболее рациональным является раннее удаление камней. Аналогичная тенденция в динамике хроматографических показателей отмечена нами во II группе.

За анализируемый период времени суммарный уровень щавелевой кислоты снизился на $2,04 \pm 0,03$ ммоль/сут и колебался в диапазоне 4,82 – 2,78 ммоль/сут ($p < 0,05$), а мочевой кислоты – на $2,58 \pm 0,06$ ммоль/сут ($5,7 - 3,12$ ммоль/сут ($p < 0,05$) соответственно). Уровень фосфорной кислоты за период динамического наблюдения колебался в пределах 7,72 – 5,58 ммоль/сут. При этом в первые 6 мес наблюдения исследуемый показатель не имел тенденции к снижению. Наряду с этим нами не было обнаружено достоверно значимых изменений в динамике колебаний показателей летучих жирных кислот (ЛЖК), фенолов и крезолов.

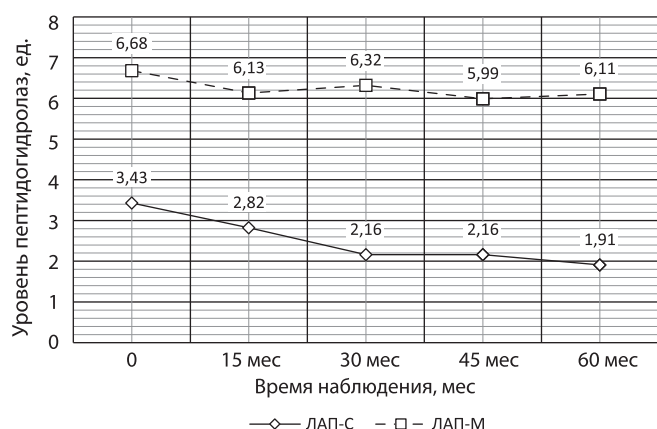


Рис. 2. Динамика колебаний уровня гидролитических ферментов у больных МКБ ($n = 51$).

Уровень активности гидролитических ферментов во II группе больных за исследуемый период времени в ответ на комплекс проводимых мероприятий имел тенденцию к значительному снижению ЛАП-С с 3,39 до 1,84 ед. при достоверно неизменных показателях ЛАП-М. Динамика наблюдений представлена на рис. 1.

Минимальный характер колебаний ЛАП-М в группе больных со сложными формами уролитиаза явился лабораторно обоснованным фактором, свидетельствующим о наличии сопутствующего воспалительного процесса в отсутствие клинических проявлений пиелонефрита.

Оценивая результаты лечения во II группе больных следует отметить, что проводимый комплекс метафилактических мероприятий наряду с трудностями, связанными с лечением этиопатогенетически значимых неврологических заболеваний (остеопатии, патология желудочно-кишечного тракта, эндокринопатии), явился у 19 (19,4%) пациентов причиной рецидива заболевания в ближайшие 1,5 года. При этом частота рецидивов в последние 3,5 года прогрессивно снижалась.

Наши исследования показали низкую эффективность метафилактических мероприятий в группе больных с осложненным течением уролитиаза. Вместе с выраженными клиническими проявлениями патологического процесса у пациентов III группы отмечен крайне высокий уровень в моче литогенных веществ (табл. 2) и высокий уровень активности гидролитических ферментов (рис. 2).

Уровень фосфорной кислоты за период динамического наблюдения колебался в пределах 8,11 – 6,98 ммоль/сут, щавелевой кислоты – 7,59 – 5,89 ммоль/сут, мочевой – 6,26 – 4,96 ммоль/сут. При этом уровень ЛАП-С снизился с 3,43 до 1,91 ед. при достоверно неизменных показателях ЛАП-М.

Несмотря на строгое соблюдение комплекса лечебно-профилактических мероприятий в течение всего периода диспансерного наблюдения, нами не обнаружено достоверно значимых различий между исходным и конечным уровнем литогенных веществ, ЛЖК, фенолов и крезолов, а также между уровнями пептидогидролаз. Повторное обращение в стационар зарегистрировано в 33,3% случаев, что составило 17 пациентов от общего числа больных с осложненным течением уролитиаза.

Нами проведен хромато-масс-спектрометрический анализ уровня литогенных веществ у больных контрольной

группы через 5 лет с момента выписки из стационара.

У 8 (20%) больных, несмотря на комплекс проводимых мероприятий, нами обнаружено высокое содержание в моче щавелевой кислоты – $4,94 \pm 0,59$ ммоль/сут, pH мочи – от 4,49 до 6,06.

У 11 (27,5%) пациентов обнаружены повышенные концентрации в моче фосфорной кислоты – $7,78 \pm 0,94$ ммоль/сут, pH мочи – от 7,71 до 8,02.

17,5% составили пациенты с высоким уровнем содержания мочевой кислоты – $5,80 \pm 0,6$ ммоль/сут, pH мочи – от 4,31 до 4,96. При этом у наибольшего количества больных – 14 (35%) – было зарегистрировано одновременное увеличение концентраций щавелевой – $5,79 \pm 0,68$ ммоль/сут, мочевой – $5,76 \pm 0,57$ ммоль/сут и фосфорной – $7,11 \pm 0,76$ ммоль/сут кислот. Это были пациенты, страдающие рецидивным уролитиазом с клинико-лабораторными проявлениями пиелонефрита на фоне смешанного типа камнеобразования.

Обсуждение. В нашей работе проведен сравнительный анализ эффективности лечебно-профилактических мероприятий, направленных на предупреждение рецидивов камнеобразования среди обследуемых пациентов с различными типами нарушения обмена, на основании результатов комплексного хромато-масс-спектрометрического и общеклинического обследования.

Оценивая полученные данные в ходе комплексного клинико-лабораторного обследования 316 больных МКБ, включающего хроматографическое определение содержания в моче основных литогенных веществ – фосфорной, щавелевой и мочевой кислот, ЛЖК и токсических метаболитов группы фенолов и крезолов, определение уровня пептидогидролаз, участвующих в процессе формирования матрицы камня и определяющих функциональное состояние паренхимы почки, мы отметили, что 52 (16,46%) пациента за истекший период повторно обращались в стационар по поводу рецидива камня с возобновившимися приступами почечной колики.

При этом в ходе заключительного анализа данных, полученных в результате статистического опроса и хромато-масс-спектрометрического анализа группы контроля ($n = 40$), было установлено, что 13 (32,5%) пациентов за истекший период повторно обращались в стационар по поводу рецидива заболевания. Это были больные преимущественно с кальций-фосфатным и смешанными типами камнеобразования.

Заключение. Следует отметить, что использование полученных данных для обоснования выбора метода лечения и комплекса профилактических мероприятий позволило улучшить результаты лечения пациентов с МКБ, существенно снизив частоту рецидивов по сравнению с соответствующей категорией больных и сроками наблюдения за ними в контрольной группе.

Таким образом, полученные результаты дают основание заключить, что с учетом хроматографических показателей представляется оправданным использование их в оценке эффективности проводимого профилактического лечения с определением временных колебаний исследуемых параметров у больных с различными типами камнеобразования.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «Институт хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава РФ и лично д-ру мед. наук Валерию Григо-

рьевичу Истратову за помощь при проведении хромотографических исследований.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 5 см. REFERENCES)

1. Коцарь А.Г., Стародубцева Л.В., Долженков С.Д., Криковцов С.И. Диагностика клинических форм мочекаменной болезни с помощью нечеткой логики принятия решений. *Системный анализ и управление в биомедицинских системах*. 2012; 11(4): 210-15.
3. Нусратуллоев И.Н., Алчинбаев М.К., Истратов В.Г., Кадыров З.А., Сулейманов С.И. Современные методы диагностики форм мочекаменной болезни. *Здравоохранение Таджикистана*. 2009; 3: 23-7.
4. Зоркин С.Н., Аюбян А.В. Уролитиаз у детей. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2011; 7(S2): 41-4.
6. Кадыров З.А., Нусратуллоев И., Саакян А.А., Кондакова В.В., Пирназаров М., Низомов Д.С. Оценка эффективности современных методов лабораторной диагностики мочекаменной болезни. *Вестник Авиценны*. 2008; 2(35): 56-63.
7. Черепанова Е.В., Дзеранов Н.К. Метафилактика мочекаменной болезни в амбулаторных условиях. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2010; 3: 33-9.
8. Сулейманов С.И., Кадыров З.А., Истратов В.Г., Рамишвили В.Ш. Оценка эффективности современных методов лабораторной диагностики мочекаменной болезни. *Лечебное дело*. 2012; 2: 99-103.
9. Пронкин Е.А. Профилактика рецидивов мочекаменной болезни. *Фарматека*. 2012; 7: 114-9.

REFERENCES

1. Kotsar' A.G., Starodubtseva L.V., Dolzhenkov S.D., Krikovtsov S.I. Diagnostics of clinical forms of urolithiasis by using fuzzy logic. *Sistemnyy analiz i upravleniye v biomeditsinskikh sistemakh*. 2012; 11(4): 210-15. (in Russian)
2. Noori N, Honarkar E, Goldfarb DS, Kalantar-Zadeh K, Taheri M, Shakhssalim N, Parvin M, Basiri A Urinary lithogenic risk profile in recurrent stone formers with hyperoxaluria: a randomized controlled trial comparing DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension)-style and low-oxalate diets. *Am. J. Kidney Dis*. 2014; 63(3): 456-63.
3. Nusratulloev I.N., Alchibaev M.K., Istratov V.G., Kadyrov Z.A., Suleymanov S.I. Modern methods of diagnostics of different forms of urolithic disease. *Zdravookhraneniye Tadzhikistana*. 2009; 3: 23-7. (in Russian)
4. Zorkin S.N., Akopyan A.V. Urolithiasis in children. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2011; 7(S2): 41-4. (in Russian)
5. Zeynep Gul, Manoj Monga. Medical and Dietary Therapy for Kidney Stone Prevention. *Korean J. Urol*. 2014; 55(12): 775-9.
6. Kadyrov Z.A., Nusratulloev I, Saakyan A.A., Kondakova V.V., Pirnazarov M., Nizomov D.S. The estimation of effectivity of modern methods of laboratory diagnostics of urolithiasis. *Vestnik Avitsenniy*. 2008; 2(35): 56-63. (in Russian)
7. Cherepanova E.V., Dzeranov N.K. Metaphylaxis of urolithiasis in outpatient settings. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya urologiya*. 2010; 3: 33-9.
8. Suleymanov S.I., Kadyrov Z.A., Istratov V.G., Ramishvili V.Sh. Evaluation of the effectiveness of modern methods of laboratory diagnostics of urolithiasis. *Lechebnoye delo*. 2012; 2: 99-103. (in Russian)
9. Pronkin E.A. Prevention of relapse of urolithiasis. *Pharmateca*. 2012; 7: 114-9. (in Russian)

Поступила 23.01.18

Принята к печати 29.01.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.61-036.12-07:616.153.915]-055

Муркамилов И.Т.^{1,2}, Айтбаев К.А.³, Фомин В.В.⁴, Муркамилова Ж.А.⁵, Райимжанов З.Р.^{6,1}, Реджапова Н.А.⁷, Юсупов Ф.А.⁷, Айдаров З.А.¹

ГЕНДЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЙ СОСТАВА ЛИПИДОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ПОЧЕК

¹Кыргызская государственная медицинская академия им. И.К. Ахунбаева, 720020, г. Бишкек, Кыргызстан;

²ГОУ ВПО «Кыргызско-Российский Славянский университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина», 720000, г. Бишкек, Кыргызстан;

³Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и медицины, 720040, г. Бишкек, Кыргызстан;

⁴ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Москва, Россия;

⁵Центр семейной медицины № 7, 720040, г. Бишкек, Кыргызстан;

⁶ГВКГ «Главный военный клинический госпиталь им. акад. Н.Н. Бурденко» Минобороны РФ, 105229, Москва, Россия;

⁷Ошский государственный университет, 714000, г. Ош, Кыргызстан

Целью исследования явилось определение гендерных особенностей нарушений липидного состава сыворотки крови и их взаимосвязи с клинико-функциональными проявлениями у больных с хронической патологией почек (ХПП).

В исследование включены пациенты с ХПП на преддиализной стадии заболевания в возрасте 17–71 года (средний возраст $37,3 \pm 13,0$ года). Всем пациентам проведено комплексное клинико-лабораторное обследование. В зависимости от пола исследуемую выборку ($n = 417$) разделили на 2 группы: 1-я группа – мужчины ($n = 277$) и 2-я группа – женщины ($n = 140$). Взятие крови проводили путём венопункции из локтевой вены после 12–14-часового голодания утром, натощак. Определение липидов в сыворотке крови выполняли на автоанализаторе модели Resposn 920 (Германия), включая определение общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), холестерина липо-

Для корреспонденции: Муркамилов Илхом Торобекович – врач-нефролог I квал. кат., канд. мед. наук, ассистент каф. факультетской терапии Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева; e-mail: murkamilov.i@mail.ru

протеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) и триглицеридов (ТГ). Индекс атерогенности (ИА) вычисляли по формуле: $ИА = (ОХС - ХС ЛПВП) / ХС ЛПВП$. При анализе результатов липидограммы за повышенные уровни ОХС (гиперхолестеринемия), ХС ЛПНП (гипер-бета-холестеринемия) и ТГ (гипертриглицеридемия) принимали их значения, равные или более 5,0 ммоль/л, равные или более 3,0 ммоль/л и более 1,7 ммоль/л соответственно, а сниженным уровнем ХС ЛПВП (гипо-альфа-холестеринемия) считали его концентрацию, равную или менее 1,0 ммоль/л для мужчин и 1,2 ммоль/л – для женщин. В группе мужчин гипо-альфа-холестеринемия выявлена у 135 (48,7%) пациентов, гипертриглицеридемия – у 162 (58,4%), а среднее значение индекса атерогенности было достоверно выше – 3,49 (2,43–5,08) по сравнению с показателем у больных женского пола – 3,12 (2,12–3,74) ($p = 0,000$). Лабораторные признаки анемии существенно чаще отмечали в когорте женщин – 53 (37,8%), чем у мужчин – 63 (22,7%); $p = 0,001$. В группе лиц мужского пола средние значения ХС ЛПВП и общего белка сыворотки крови были достоверно ниже ($1,07 \pm 0,44$ ммоль/л и $53,3 \pm 14,6$ г/л), чем у женщин ($1,23 \pm 0,42$; $p = 0,000$ и $57,4 \pm 11,9$ г/л; $p = 0,007$, соответственно), а уровни ТГ – 1,92 (1,23–2,74) ммоль/л у мужчин и 1,85 (1,04–2,37) ммоль/л у женщин ($p = 0,034$), натрия (соответственно $140,3 \pm 6,20$ ммоль/л и $138,30 \pm 6,01$ ммоль/л; $p = 0,010$) и мочевины (0,38 $\pm$ 0,09 ммоль/л и 0,34 $\pm$ 0,01 ммоль/л; $p = 0,003$), напротив, были существенно выше по сравнению с показателями женщин. Во 2-й группе (женщины) отмечено ощутимое замедление скорости клубочковой фильтрации (СКФ) – 68,4 (43,6–98,1) мл/мин по сравнению с 1-й группой (мужчины) – 87,6 (55,0–117,6) мл/мин ($p = 0,001$). Среди пациентов мужского пола обнаружена достоверно значимая положительная связь содержания ОХС с индексом массы тела (ИМТ), уровнем диастолического артериального давления (АД) и протеинурией; уровня ХС ЛПНП – с протеинурией; концентрации ТГ – с ИМТ, уровнем диастолического АД и величиной протеинурии. В то же время каких-либо корреляций между концентрацией ХС ЛПВП и указанными выше лабораторными маркерами ХПП получено не было. В отличие от мужчин, в группе женщин содержание ОХС демонстрировало обратную взаимосвязь с концентрацией Нб, величиной СКФ и протеинурией, а уровень ХС ЛПВП – с показателями ИМТ, тромбоцитов и мочевины сыворотки крови. В группе лиц женского пола регистрировалась положительная взаимосвязь содержания ХС ЛПНП с уровнем диастолического АД, СКФ и суточной экскрецией белка с мочой, а концентрации ТГ сыворотки крови – с объемом суточной протеинурии и ИМТ. В общей группе достоверная положительная взаимосвязь содержания ОХС выявлялась с ИМТ и протеинурией, уровня ХС ЛПНП – с протеинурией, а концентрации ТГ – с ИМТ, уровнем диастолического АД, содержанием натрия и протеинурией. В то же время имела место и отрицательная связь концентрации ХС ЛПВП с ИМТ и мочевиной плазмы, а уровня ТГ – с концентрацией Нб. У пациентов мужского пола с ХПП на преддиализной стадии заболевания отмечено снижение ХС ЛПВП, повышенная концентрация ТГ и увеличение ИА. Содержание ТГ сыворотки крови тесно связано с ИМТ, уровнем диастолического АД и протеинурией. У лиц женского пола замедление скорости клубочковой фильтрации сопровождается развитием анемии и атерогенной дислипидемии.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек; половые различия; липидный профиль.

Для цитирования: Муркамилов И.Т., Айтбаев К.А., Фомин В.В., Муркамилова Ж.А., Райимжанов З.Р., Реджапова Н.А., Юсупов Ф.А., Айдаров З.А. Гендерные особенности нарушений состава липидов сыворотки крови у больных с хронической патологией почек. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (3): 152-158. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-152-158>

Murkamilov I.T.^{1,2}, Aytabaev K.A.³, Fomin V.V.⁴, Murkamilova Zh.A.⁵, Rayimjanov Z.R.^{1,6}, Redjapova N.A.⁷, Yusupov F.A.⁷, Aydarov Z.A.¹

THE GENDER FEATURES OF DISORDERS OF COMPOSITION OF LIPIDS OF BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH CHRONIC PATHOLOGY OF KIDNEYS

¹The I.K. Akhunbaiev Kirghiz State Medical Academy, 720020, Bishkek, Kyrgyzstan

²The first President of Russia B.N. Yeltsyn Kirghiz Russian Slavic university, 720000, Bishkek, Kyrgyzstan

³The Research Institute of Molecular Biology and Medicine, 720040, Bishkek, Kyrgyzstan

⁴The Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "The I.M. Sechenov First Moscow State Medical University" of Minzdrav of Russia, 119991, Moscow, Russia

⁵The Center of Family Medicine №7, 720040, Bishkek, Kyrgyzstan

⁶The Federal State Official Institution "The academician N.N. Burdenko Main Military Clinical Hospital" of Minoborona of Russia, 105229, Moscow, Russia

⁷The Osh State University, 714000, Osh, Kyrgyzstan

The purpose of the study was to investigate gender features of abnormalities of blood serum lipid composition and their relationship with clinical and functional manifestations in patients with chronic kidney disease (CKD). The study covered patients with CKD at pre-dialysis stage of disease, aged 17 - 71 years (average age 37.3 $\pm$ 13.0 years). All patients underwent complex clinical and laboratory examination. Depending on gender, the sample ($n = 417$) was divided into 2 groups: group I - males ($n = 277$) and group II - females ($n = 140$). Blood sampling was implemented using venipuncture of ulnar vein after 12-14 hours of fasting in morning time. The lipid analysis of blood serum was performed using the auto-analyzer "Respons 920" (Germany), including detection of total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and triglycerides (TG). The atherogenic index (AI) was calculated according formula: $AI = (TC - HDL-C) / HDL-C$. At analysis of the results of lipidogram, the levels of TC (hypercholesterolemia), LDL-C (hyper-beta-cholesterolemia) and TG (hypertriglyceridemia) were considered as increased when their values were ≥ 5.0 mmol/L, ≥ 3.0 mmol/L and > 1.7 mmol/L respectively. The level of HDL cholesterol (hypo-alpha-cholesterolemia) was considered as decreased when its concentration was ≤ 1.0 mmol/L in males and ≤ 1.2 mmol/L in females. In the group of male patients, hypo-alpha-cholesterolemia was detected in 135 patients (48.7%), hypertriglyceridemia - in 162 (58.4%), and average value of atherogenic index was significantly higher - 3.49 (2.43-5.08) as compared with 3.12 (2.12-3.74) in female patients ($p=0.001$). The laboratory signs of anemia were significantly more frequent in group of females - 53 (37.8%) as compared with 63 (22.7%) than in males ($p = 0.001$). In males, average values of HDL cholesterol and total serum protein were significantly lower (1.07 ± 0.44 mmol/L vs. 1.23 ± 0.42 , $p = 0.000$ and 53.3 ± 14.6 g/L vs. 57.4 ± 11.9 g/L, $p = 0.007$, respectively). The levels of TG - 1.92 (1.23-2.74) mmol/L vs. 1.85 (1.04-2.37); $p = 0.034$, sodium (140.3 ± 6.20 mmol/L vs. 138.3 ± 6.01 mmol/L, $p = 0.010$) and uric acid in blood serum were significantly higher (0.38 ± 0.09 mmol/L vs. 0.34 ± 0.01 mmol/L, $p = 0.003$) as compared with females. In the group II (females), a noticeable slowing of the glomerular filtration rate (GFR) - 68.4 (43.6-98.1) ml/min vs. 87.6 (55.0 - 117.6) ml/min; ($p = 0.001$) was detected as compared

with group I (males). Among male patients, a reliably significant positive relationship was established between TC and BMI, level of diastolic blood pressure and proteinuria; LDL cholesterol level and proteinuria; concentration of TG - and BMI, level of diastolic blood pressure and level of proteinuria. No correlation was established between the concentration of HDL-cholesterol and aforementioned laboratory markers of CKD. In contrast with males, in females, TC demonstrated an inverse relationship with the concentration of Hb, values of GFR and proteinuria, and level of HDL cholesterol - with indices of BMI, thrombocytes and uric acid of blood serum. In females a positive relationship was established between LDL cholesterol and level of diastolic blood pressure, GFR and daily proteinuria, and also between concentration of serum TG and volume of daily proteinuria and BMI. In general group, a reliable positive relationship was detected between TC and BMI and proteinuria, between LDL-C level and proteinuria, and between TG concentration and BMI, level of diastolic blood pressure, sodium content and proteinuria. The negative relationship was established between concentration of HDL cholesterol and BMI and uric acid in blood plasma, and TG level with Hb concentration.

In male patients with CKD at pre-dialysis stage of disease, decreasing of level of HDL cholesterol was established as an increased concentration of TG and increasing atherogenic index. The content of triglyceride of blood serum is closely related to body mass index, level of diastolic blood pressure and proteinuria. In females, slowing of glomerular filtration rate is accompanied by development of anemia and atherogenic dyslipidemia.

Key words: chronic kidney disease; gender differences; lipid profile.

For citation: Murkamilov I.T., Aytabaiev K.A., Fomin V.V., Murkamilova Zh.A., Rayimjanov Z.R., Redjapova N.A., Yusupov F.A., Aydarov Z.A. The gender features of disorders of composition of lipids of blood serum in patients with chronic pathology of kidneys. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(3): 152-158. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-152-158>

For correspondence: Murkamilov I.T., nephrologist of first qualification category, candidate of medical sciences, assistant of the Chair of Faculty Therapy of the I.K. Akhunbaiev Kirghiz State Medical Academy, e-mail: murkamilov.i@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 12.10.2017
Accepted 24.11.2017

Введение. Отмечаемый в последние годы значительный рост заболеваемости и высокий сердечно-сосудистый риск выводят проблему хронической болезни почек (ХБП) в разряд наиболее актуальных [1–3]. Среди немимунных факторов, способствующих прогрессированию ХБП и развитию сердечно-сосудистых осложнений (ССО), ведущая роль принадлежит изменениям метаболизма липидов [4–6]. Общеизвестно, что уровни липидов и липопротеинов в сыворотке крови не только отражают активность патологического процесса в почках (особенно при первичных нефропатиях), но и предрасполагают к развитию атеросклероза у лиц как молодого, так и старшего возраста [7]. Важно отметить, что в популяции людей, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ), дислипидемия как фактор риска имеет свои гендерные особенности [8].

Хотя влияние параметров липидного профиля на скорость прогрессирования почечной дисфункции в преддиализной стадии ХБП исследуется довольно активно [4], тем не менее очень мало работ, в которых изучались бы половые особенности метаболизма липидов при данной патологии. Цель настоящего исследования – изучить половые особенности нарушений липидного состава сыворотки крови и их взаимосвязь с клинико-функциональными проявлениями у больных ХБП на преддиализной стадии заболевания.

Материал и методы. Объектом исследования стали пациенты с ХБП на преддиализной стадии заболевания. Всего обследовано 417 пациентов в возрасте 17–71 года (средний возраст $37,3 \pm 13$ лет). Критериями наличия ХБП служили стойкая микроальбуминурия/протеинурия или, при их отсутствии, снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) ниже $60 \text{ мл/мин/1,73 м}^2$ в течение последних 3 мес (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) [9]. ХБП классифицировали по критериям NKF/KDOQI (National Kidney Foundation/Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) 2002 г. [10].

Критерием включения в исследование стало наличие

ХБП первичной этиологии. В исследование не включали лиц с ХБП диабетической этиологии, находящихся на этаппочечной заместительной терапии, с эссенциальной артериальной гипертензией и другими болезнями органов кровообращения, сопровождающимися изменениями метаболизма липидов. Исходно все обследованные лица с ХБП не находились на липидмодифицирующей терапии. Дизайн исследования: одномоментное (кросс-секционное). Для достижения поставленной цели всех обследованных пациентов разделили на две группы: 1-я группа – лица мужского пола ($n = 277$), 2-я группа – лица женского пола ($n = 140$). У всех пациентов проводили сбор анамнеза, измерение артериального давления (АД), роста и массы тела с расчётом индекса массы тела (ИМТ) по общепринятой формуле, подсчёт числа сердечных сокращений (ЧСС). Лабораторное обследование включало в себя оценку показателей периферической крови (определение уровня гемоглобина и гематокрита, количества эритроцитов, тромбоцитов) и её биохимический анализ. Забор крови на липидное исследование осуществляли путём венопункции из локтевой вены после 12–14-часового голодания утром, натощак. Липидный анализ сыворотки крови выполняли опытные сертифицированные специалисты на автоанализаторе ResponS 920 (Германия), он включал определение общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) и триглицеридов (ТГ). Индекс атерогенности (ИА) вычисляли по формуле: $ИА = (ОХС - ХС ЛПВП) / ХС ЛПВП$ [11]. Кроме того, у всех пациентов дополнительно исследовали содержание фибриногена, С-реактивного и общего белка, электролитов и креатинина сыворотки крови. Оценку содержания липидов и липопротеинов сыворотки крови проводили в соответствии с критериями Европейского общества кардиологов и Европейского общества атеросклероза по диагностике и лечению дислипидемий [12], согласно которым их повышенными уровнями считаются: содер-

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов, включённых в исследование

Показатель	Число пациентов, n (%)		p
	1-я группа, мужчины (n = 277)	2-я группа, женщины (n = 140)	
Стадия хронической болезни почек (NKF KDOQI, 2002 г.)			
1	131 (47,2)	42 (30,0)	0,000
2	66 (24,0)	44 (31,4)	0,126
3А	22 (8,0)	19 (13,6)	0,103
3Б	23 (8,3)	16 (11,4)	0,054
4	24 (8,6)	14 (10,0)	0,493
5	11 (3,9)	5 (3,6)	0,549
Степень АГ			
1-я	71 (25,6)	30 (21,4)	0,261
2-я	38 (13,7)	23 (16,4)	0,586
3-я	32 (11,5)	12 (8,5)	0,335
Избыточная масса тела	87 (31,4)	43 (30,7)	0,834
Ожирение			
I степень	41 (14,8)	16 (11,4)	0,262
II степень	12 (4,3)	11 (7,8)	0,087
III степень	3 (1,0)	5 (3,5)	0,133
Анемия	63 (22,7)	53 (37,8)	0,001
Гиперхолестеринемия	167 (60,2)	88 (62,8)	0,693
Гипо-альфа-холестеринемия	135 (48,7)	74 (52,8)	0,440
Гипертриглицеридемия	162 (58,4)	81 (57,8)	0,100
Гиперурикемия	69 (24,9)	36 (25,7)	0,824

Примечание. NKF KDOQI – National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative; АГ – артериальная гипертензия.

жение ОХС (гиперхолестеринемия), равное или более 5,0 ммоль/л, ХС ЛПНП (гипер-бета-холестеринемия), равное или более 3,0 ммоль/л, и ТГ (гипертриглицеридемия) – более 1,7 ммоль/л, а сниженными значениями – содержание ХС ЛПВП (гипо-альфа-холестеринемия), равное или менее 1,0 ммоль/л для мужчин и 1,2 ммоль/л – для женщин. С учётом общепринятых рекомендаций диагностировали также ожирение [13], артериальную гипертензию [14], анемию [9] и гиперурикемию [15].

При статистическом анализе использовали стандартный пакет программ Statistica 6.0, предусматривающий возможность параметрического и непараметрического анализа. Значимость различий между группами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента (для переменных с нормальным распределением) и теста Манна–Уитни (для переменных с непараметрическим распределением) [16]. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение для переменных с нормальным распределением или как медиана (25–75%) – для переменных с непараметрическим распределением. Уровнем статистической достоверности считалось значение $p < 0,05$. Для определения связи между изучаемыми признаками использовали коэффициенты корреляции Пирсона.

Результаты. Полученные данные показывают (табл. 1), что доля пациентов с начальной стадией почечной

дисфункции в 1-й группе (мужчины) оказалась достоверно выше (131, или 47,2%), чем во 2-й группе, то есть у женщин (42, или 30,0%; $p = 0,000$). Ощутимой разницы по остальным стадиям ХБП не отмечено. Соотношение лиц по степеням повышения АД и массы тела в обеих группах было схожим (см. табл. 1). Однако лица с ХБП и анемией достоверно чаще встречались в группе женщин (53, или 37,8%) по сравнению с группой мужчин (63, или 22,7%; $p = 0,001$). Стоит отметить, что доли пациентов с избыточной массой тела, ожирением, гиперлипидемией, гипо-альфа-холестеринемией, гипертриглицеридемией и гиперурикемией были сопоставимы в обеих группах (см. табл. 1).

Пациенты сравниваемых групп по возрасту, длительности заболевания, ИМТ, ЧСС, уровню систолического и диастолического АД достоверно не различались (табл. 2). Индексы периферической крови, такие как концентрация гемоглобина (Hb), показатели гематокрита (Ht), количества эритроцитов, тромбоцитов и содержания железа сыворотки крови были существенно ниже в группе лиц женского пола (см. табл. 2). Статистически значимое снижение уровня ХС ЛПВП и повышенное содержание ТГ сыворотки крови отмечалось в группе мужчин. Средние значения индекса атерогенности оказались достоверно выше у мужчин – 3,49 (2,43–5,08), по сравнению с женщинами – 3,12 (2,12–3,74); $p = 0,000$.

В обеих группах пациентов показатели электролитов сыворотки крови, за исключением содержания натрия, были одинаковыми (см. табл. 2). Более высокие уровни натрия, мочевой кислоты и, напротив, сниженный показатель общего белка сыворотки крови были свойственны лицам мужского пола, тогда как в группе женщин регистрировали достоверное замедление СКФ – 68,4 (43,6–98,1) мл/мин, по сравнению с этим показателем у мужчин – 87,6 (55,0–117,6) мл/мин ($p = 0,001$). Примечательно, что разница в показателях суточной экскреции белка между пациентами сравниваемых групп не достигала статистически значимого порога (см. табл. 2).

Для оценки степени влияния показателей липидного профиля на лабораторные параметры, ассоциированные с прогрессированием ХБП, нами был проведён корреляционный анализ как внутри каждой группы, так и в общей когорте обследованных пациентов. В группе мужчин обнаружена статистически значимая положительная взаимосвязь содержания ОХС с ИМТ, уровнем диастолического АД и протеинурией (табл. 3); уровня ХС ЛПНП – с протеинурией, концентрации ТГ – с ИМТ, уровнем диастолического АД и протеинурией. В то же время каких-либо связей между концентрацией ХС ЛПВП и указанными выше лабораторными маркерами ХБП не выявлено.

В отличие от мужчин, в группе женщин содержание ОХС обнаруживало обратную взаимосвязь с концентрацией Hb, величиной СКФ и протеинурией, а уровень ХС ЛПВП – с показателями ИМТ, тромбоцитов и мочевой кислоты сыворотки крови (см. табл. 3). Также в группе лиц женского пола регистрировалась положительная взаимосвязь содержания ХС ЛПНП с уровнем диастолического АД, СКФ и суточной экскрецией белка с мочой, а концентрации ТГ сыворотки крови – с объёмом суточной протеинурии и ИМТ.

Как отмечалось выше, нами также был проведён корреляционный анализ в общей когорте пациентов, его результаты отражены в табл. 4. Эти данные показали, что прямую взаимосвязь содержания ОХС обнаружи-

Таблица 2

Клинико-лабораторные параметры у обследованных пациентов с хронической болезнью почек

Показатели	1-я группа, мужчины (n = 277)	2-я группа, женщины (n = 140)	p
Возраст, годы	36,5 ± 13,3	38,5 ± 12,2	0,128
Длительность заболевания, годы	4 (1–8)	5 (2–11)	0,099
ИМТ, кг/м ²	25,90 ± 6,61	26,40 ± 5,98	0,498
ЧСС, уд/мин	77 ± 10	77 ± 9	0,581
САД, мм рт. ст.	138 ± 25	135 ± 26	0,250
ДАД, мм рт. ст.	85 ± 15	86 ± 15	0,111
Гемоглобин, г/л	144,0 ± 21,0	124,6 ± 20,6	0,000
Эритроциты, × 10 ¹² /л	4,63 ± 0,47	4,23 ± 0,46	0,000
Гематокрит, %	48,0 ± 7,02	41,50 ± 6,88	0,000
Тромбоциты, × 10 ⁹ /л	250,8 ± 28,7	238,5 ± 23,9	0,000
Железо, мкмоль/л	17,80 ± 7,30	15,60 ± 6,43	0,013
ОХС, ммоль/л	5,69 (4,21–7,44)	5,54 (4,43–7,19)	0,732
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,07 ± 0,44	1,23 ± 0,42	0,000
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,52 (2,55–5,23)	3,50 (2,65–4,44)	0,351
Триглицериды, ммоль/л	1,92 (1,23–2,74)	1,85 (1,04–2,37)	0,034
Индекс атерогенности	3,49 (2,43–5,08)	3,12 (2,12–3,74)	0,000
Калий, ммоль/л	4,56 ± 0,67	4,53 ± 0,64	0,755
Кальций, ммоль/л	1,42 ± 0,56	1,46 ± 0,57	0,627
Натрий, ммоль/л	140,30 ± 6,20	138,30 ± 6,01	0,010
Общий белок, г/л	53,3 ± 14,6	57,4 ± 11,9	0,007
Мочевая кислота, ммоль/л	0,38 ± 0,09	0,34 ± 0,01	0,003
СРБ, абс./(%)	57 (20,5)	24 (17,1)	0,461
Фибриноген, мг/дл	5328 (3552–7770)	5550 (4218–6660)	0,572
Креатинин сыворотки крови, мкмоль/л	105,0 (83,0–160,0)	105,0 (75,0–163,0)	0,325
рСКФ, мл/мин	87,6 (55,0–117,6)	68,4 (43,6–98,1)	0,001
Протеинурия, г/сутки	2,506 (0,761–6,488)	1,944 (0,664–4,177)	0,054

Примечание. Здесь и табл. 3,4: АГ – артериальная гипертензия; ИМТ – индекс массы тела; ЧСС – частота сердечных сокращений; САД – систолическое артериальное давление; ДАД – диастолическое артериальное давление; СРБ – С-реактивный белок; рСКФ – расчётная скорость клубочковой фильтрации.

Таблица 3

Корреляционный анализ связей между параметрами липидного профиля и лабораторными маркерами хронической болезни почек

Показатели	1-я группа, мужчины (n = 277)				2-я группа, женщины (n = 140)			
	ОХС	ЛПВП	ЛПНП	ТГ	ОХС	ЛПВП	ЛПНП	ТГ
ИМТ, кг/м ²	0,17*	0,10	0,09	0,34*	0,12	-0,25*	0,09	0,33*
САД, мм рт. ст.	0,91	0,04	0,06	0,07	0,11	0,03	0,15	0,00
ДАД, мм рт. ст.	0,12*	0,06	0,09	0,15*	0,16	0,05	0,21*	0,02
Гемоглобин, г/л	0,03	0,00	0,00	0,10	-0,20*	0,14	0,12	0,15
Тромбоциты, × 10 ⁹ /л	0,08	0,07	0,03	0,14	0,09	-0,29*	0,03	0,07
МК, ммоль/л	0,04	0,04	0,03	0,11	0,09	-0,20*	0,11	0,03
Натрий, ммоль/л	0,05	0,05	0,05	0,10	0,08	0,12	0,02	0,09
Кальций, ммоль/л	0,06	0,00	0,06	0,13	0,10	0,05	0,06	0,13
рСКФ, мл/мин	0,01	0,10	0,00	0,01	-0,20*	0,11	-0,19*	0,10
Протеинурия, г/с	0,60*	0,10	0,54*	0,40*	0,52*	0,11	0,48*	0,37*

Примечание. * – p < 0,05. Здесь и в табл. 4: ОХС – общий холестерин; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ТГ – триглицериды; ИМТ – индекс массы тела; САД – систолическое артериальное давление; ДАД – диастолическое артериальное давление; МК – мочевая кислота; СКФ – скорость клубочковой фильтрации.

ли с ИМТ и протеинурией, уровня ХС ЛПНП – с протеинурией, а концентрации ТГ – с ИМТ, уровнем диастолического АД, содержанием натрия и протеинурией. В то же время имела место и отрицательная корреляция концентрации ХС ЛПВП с ИМТ и мочевой кислотой плазмы, а уровня ТГ – с концентрацией Нв.

Обсуждение. ХБП и связанные с нею сердечно-сосудистые осложнения являются одними из важнейших медико-социальных проблем, что обусловлено их высокой долей в структуре заболеваемости, первичной инвалидности и смертности [17].

Исследованиями последних лет установлено, что как на додиализной, так и на диализной стадиях ХБП дислипидемия вносит дополнительный, весьма серьёзный вклад в прогрессирование ренальной дисфункции и сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [12, 18]. При этом у лиц, страдающих почечной

Таблица 4

Корреляционный анализ связей между параметрами липидного профиля и лабораторными маркерами хронической болезни почек в общей группе пациентов

Показатели	ОХС	ХС ЛПВП	ХС ЛПНП	ТГ
Индекс массы тела, кг/м ²	0,15*	-0,13*	0,09	0,33*
Систолическое АД, мм рт. ст.	0,02	0,05	0,00	0,05
Диастолическое АД, мм рт. ст.	0,04	0,07	0,00	0,10*
Гемоглобин, г/л	0,08	0,05	0,05	-0,15*
Тромбоциты, × 10 ⁹ /л	0,08	0,06	0,04	0,06
Мочевая кислота плазмы, ммоль/л	0,02	-0,11*	0,05	0,10
Натрий, ммоль/л	0,05	0,10	0,03	0,14*
Кальций, ммоль/л	0,08	0,01	0,07	0,06
Расчетная СКФ, мл/мин	0,05	0,06	0,06	0,04
Протеинурия, г/сутки	0,58*	0,08	0,53*	0,40*

Примечание. АД – артериальное давление; * – $p < 0,05$.

дисфункцией, липидный обмен зависит от тяжести и длительности заболевания. На ранних стадиях почечной дисфункции дислипидемия приводит к повреждению эпителиальных клеток проксимальных канальцев, вследствие чего стимулируются продукция цитокинов, привлечение клеток воспаления и в конечном итоге – активность интерстициальных миофибробластов, которые становятся главными медиаторами фиброза.

В рекомендациях по метаболизму липидов подчеркивается, что особенностью нефрогенной дислипидемии является повышение уровня ТГ и снижение содержания ХС ЛПВП. Этот факт нашёл отражение и в нашем исследовании, то есть в когорте лиц мужского пола наряду со снижением уровня ХС ЛПВП имело место и статистически значимое повышение уровня ТГ (см. табл. 2). Развитие гипертриглицеридемии при ХБП связывают с относительным дефицитом энзима печёночной липазы, который в норме участвует в расщеплении триглицеридов сыворотки крови до свободных жирных кислот, необходимых для обеспечения энергетических процессов в организме [19-22]. В то же время низкому уровню ХС ЛПВП способствует значительное снижение экспрессии лецитинхолестеринацилтрансферазы (ЛХАТ), которое объясняет нарушение процесса созревания ЛПВП и снижение концентрации ХС ЛПВП при ХБП [23]. По данным N.D. Vaziri и соавт. [23], к снижению уровня ХС ЛПВП могут также приводить гипопропротеинемия и хроническое системное воспаление [24]. Здесь уместно будет отметить, что уровень ХС ЛПВП ниже 1 ммоль/л у мужчин и 1,2 ммоль/л у женщин принято считать маркером повышенного сердечно-сосудистого риска, в том числе и при ХБП. В нашей работе результаты корреляционного анализа также показали, что сниженный уровень ХС ЛПВП связан с концентрацией мочевой кислоты сыворотки крови (см. табл. 3). Наличие тесной связи метаболизма липидов с уровнем диастолического АД и гиперурикемией установлено в поперечных исследованиях [25].

В ряде работ продемонстрировано, что дислипидемия может потенциально ускорить прогрессирование ХБП либо путём способствования развитию интратрениального атеросклероза, либо через прямое токсиче-

ское влияние липидов на структуры нефрона [20, 21]. Во втором случае, реабсорбция профильтрованных клетками канальцевого эпителия липидов может стимулировать тубулоинтерстициальное воспаление, формирование пенистых клеток и повреждение почечной ткани. Кроме того, скопление липопротеинов в мезангии увеличивает образование внеклеточного матрикса и способствует гломерулосклерозу [21]. Примечательно, что межполовых различий по частоте гипер- и дислипидемии у обследованных нами лиц не обнаружено (см. табл. 3), хотя среднее значение индекса атерогенности было достоверно выше в группе мужчин.

В современных рекомендациях низкий уровень ХС ЛПВП рассматривается как значимый фактор сердечно-сосудистого риска. Рядом исследований была показана обратная зависимость между концентрацией ХС ЛПВП и риском развития кардиальной патологии. Установлено, что снижение уровня ХС ЛПВП на 1% сопровождается увеличением риска развития ишемической болезни сердца на 2–3%, напротив, более высокие уровни ХС ЛПВП снижали риск ССЗ [26]. Вместе с тем комбинацию умеренно повышенного уровня ТГ и сниженной концентрации ХС ЛПВП обычно отмечают у пациентов с ранним проявлением атеросклеротического поражения.

Высокий сердечно-сосудистый риск при почечной дисфункции, кроме дислипидемии, может быть связан также с анемией и сниженным уровнем СКФ [4, 7, 17, 27]. Так, в нашем исследовании (см. табл. 1) лабораторные признаки анемии (согласно критериям KDOQI) выявляли у 37,8% женщин и 22,7% мужчин ($p = 0,001$). Следует отметить, что содержание гемоглобина в периферической крови в группе женщин имело обратную связь с уровнем ОХС (см. табл. 3), а в общей группе – с содержанием ТГ сыворотки крови (см. табл. 4). Механизмы, лежащие в основе развития поражения почек как при дислипидемии, так и при анемии, весьма похожи. Установлено, что при ХБП анемия развивается в несколько раз чаще, чем в популяции непочечных больных, вследствие снижения выработки эритропоэтина [9].

Заключение. У пациентов мужского пола с ХБП на преддиализной стадии заболевания липидный профиль сыворотки крови характеризуется сниженным уровнем ХС ЛПВП, повышенной концентрацией ТГ и ростом индекса атерогенности. Содержание триглицеридов в сыворотке крови тесно связано с ИМТ, уровнем ДАД и протеинурией. У лиц женского пола замедление скорости клубочковой фильтрации сопровождается развитием анемии и атерогенной дислипидемии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 3, 5, 6, 9, 10, 12, 20 – 26 см. REFERENCES)

1. Мухин Н.А., Милованова Л.Ю., Фомин В.В., Козловская Л.В., Таранова М.В., Андросова Т.В. и др. Оценка сердечно-сосудистого риска с использованием морфогенетического белка Klotho у больных хронической болезнью почек. *Клиническая медицина*. 2017;3:272-77.
4. Смирнов А.В., Шилов Е.М., Добронравов В.А., Каюков И.Г., Бобкова И.Н., Швецов М.Ю. и др. Национальные рекомендации. Хроническая болезнь почек: основные принципы скрининга, диагностики, профилактики и подходы к лечению. *Нефрология*. 2012;16(1):89-115.

8. Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. Гендерные различия кардиоваскулярной патологии. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2012;11:4:101-4.
11. Климов А.Н., Никольчева Н.Г. *Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения*. СПб.: Питер Ком; 1999.
12. Catapano A.L., Graham I., De Backer G., Wiklund O., Chapman J.M., Drexel H. и др. Рекомендации ЕОК/ЕОА по диагностике и лечению дислипидемий 2016. *Российский кардиологический журнал*. 2017;(5):7-77.
13. Диагностика и лечение ожирения у взрослых. Проект рекомендаций экспертного комитета Российской ассоциации эндокринологов. *Ожирение и метаболизм*. 2010;1:76-81.
14. Чазова И.Е., Ощепкова Е.В., Жернакова Ю.В. Рекомендации по диагностике и лечению артериальной гипертензии. *Кардиологический вестник*. 2015;1:3-30.
15. Елисеев М.С. Новые международные рекомендации по диагностике и лечению подагры. *Научно-практическая ревматология*. 2014;52(2):141-6.
16. Орлов А.И. *Прикладная статистика*. М.: Экзамен; 2006.
17. Моисеев В.С., Мухин Н.А., Кобалава Ж.Д., Бобкова И.Н., Виллевалде С.В., Ефремовцева М.А. и др. Сердечно-сосудистый риск и хроническая болезнь почек: стратегии кардионепропротекции. *Клиническая нефрология*. 2014;2:4-29.
19. Титов В.Н. Физико-химические, биохимические, функциональные различия пальмитиновой и олеиновой жирных кислот. Патогенез атеросклероза, биологические основы профилактики и инсулин. *Кардиологический вестник*. 2015;1:68-78.
27. Муркамилов И.Т., Айтбаев К.А., Байсымакова Ф.К., Фомин В.В., Кинванлун И.Г., Юсупов Ф.А. и др. Факторы, способствующие прогрессированию гломерулонефритов и сердечно-сосудистых нарушений. *Журнал здоровье и образование в XXI веке*. 2017;19(8):32-39.
9. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements*. 2013;3:1-150.
10. National Kidney Foundation: K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. *Am. J. Kidney Dis.* 2002;39 (Suppl. 1):1-266.
11. Klimov A.N., Nikulcheva N.G. *Exchange of lipids and lipoproteins and its violation [Obmen lipidov I lipoproteinov I ego narusheniya]*. St. Petersburg: Peter Com.; 1999. (in Russian)
12. Catapano A.L., Graham I., De Backer G., Wiklund O., Chapman J.M., Drexel H. et al. Recommendations EOK / EOA for the diagnosis and treatment of dyslipidemia 2016. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal*. 2017;(5): 7-77. (in Russian)
13. Diagnosis and treatment of obesity in adults. Draft recommendations of the expert committee of the Russian Endocrinology Association. *Ozhirenie i metabolism*. 2010;1:76-81. (in Russian)
14. Chazova I.E., Oshchepkova E.V., Zhernakova Y.V. Diagnosis and treatment of arterial hypertension. Clinical recommendations. *Kardiologicheskii vestnik*. 2015;1:3-30. (in Russian)
15. Eliseev M.S. New international recommendations for the diagnosis and treatment of gout. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2014;52(2):141-6. (in Russian)
16. Orlov A.I. *Applied statistics [Prikladnaya statistika]*. Moscow: Ekzamen; 2006. (in Russian)
17. Moiseev V.S., Mukhin N.A., Kobalava Zh.D., Bobkova I.N., Villevalde S.V., Efremovtseva M.A. et al. Cardiovascular risk and chronic kidney disease: strategies of cardio-nephroprotection. *Klinicheskaya nefrologiya*. 2014;2:4-29. (in Russian)
18. Weiner D.E., Sarnak M.J. Managing dyslipidemia in chronic kidney disease. *Journal of general internal medicine*. 2004;19:10:1045-52.
19. Titov V.N. Physico-chemical and functional differences of palmitic and oleic fatty acids. Pathogenesis of atherosclerosis, biological foundation for its prevention, and insulin. *Kardiologicheskii vestnik*. 2015;1:68-78. (in Russian)
20. Kurukulasuriya L.R., Athappan G., Saab G., Whaley Connell A., & Sowers J.R. HMG CoA-reductase inhibitors and renoprotection: the weight of evidence. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*. 2007;1(1):49-59.
21. Trevisan R., Dodesini AR., Lepore G. Lipids and renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006;17:S145-S147.
22. Klin M., Smogorzewski M., Ni Z., Zhang G., & Massry S.G. Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure: role of excess parathyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 1996;97(10):2167-73.
23. Vaziri N.D., Moradi H. Mechanisms of dyslipidemia of chronic renal failure. *Hemodial. Int.* 2006;10(1):1-7.
24. Liang K., Vaziri N.D. Upregulation of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in chronic renal failure. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002;283(4): E676-E681.
25. Li N.F., Wang H.M., Yang J., Zhou L., Yao X.G., & Hong J. Serum uric acid is associated with metabolic risk factors for cardiovascular disease in the Uygur population. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2009;34(6): 1032-9.
26. Lindstrom E.V., Boysen G., Nyboe J. Influence of total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, and triglycerides on risk of cerebrovascular disease: the Copenhagen City Heart Study. *BMJ*. 1994; 309(6946):11-5.
27. Murkamiлов И.Т., Айтбаев К.А., Байсымакова Ф.К., Фомин В.В., Кинванлун И.Г., Юсупов Ф.А. et al. Factors contributing to progression of glomerulonephritis and cardiovascular disorders. The Journal of scientific articles "Health and Education Millennium". 2017;19(8):32-39. (in Russian)

REFERENCES

Поступила 12.10.2017
Принята к печати 24.11.2017

©АВЕРЬЯНОВА И.В., 2018

УДК 612.122/.123-053.67-074(571.65)

Аверьянова И.В.

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА ХАРАКТЕРИСТИК МЕТАБОЛИЗМА ЛИПИДОВ И УГЛЕВОДОВ У ЮНОШЕЙ СЕВЕРО-ВОСТОКА РОССИИ

ФГБУН Научно-исследовательский центр «Арктика» ДВО РАН, 685000, Магадан, Россия;
ФГБОУ ВО «Северо-Восточный Государственный университет», 685000, Магадан, Россия

Цель работы – оценка возрастной динамики биохимических показателей у юношей, постоянных жителей Магаданской области. Материал и методы. Проведено исследование показателей липидов и глюкозы в крови у 174 юношей Магаданской области в возрастной период с 17 лет до 20–21 года. Определение основных показателей липидного и углеводного профиля было проведено с использованием портативного биохимического экспресс-анализатора CardioChek PA (США) путём анализа капиллярной крови, взятой в утренние часы натощак из пальца спустя 10–12 ч после последнего приёма пищи. Для составления математических моделей возрастных изменений основных показателей липидно-углеводного профиля проведён анализ, в результате которого получены регрессионные уравнения, описывающие взаимосвязи между показателями общего холестерина (ОХС), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), уровня гликемии и возрастными характеристиками обследуемых. Заключение. Характер полученных изменений большинства изучаемых показателей биохимического профиля указывает на наличие возрастных сдвигов в область их увеличения уже в юношеском периоде онтогенеза. Установлено, что значения показателей липидного профиля в изучаемых группах не выходили за границы принятых референтных значений, но приближались к нижней границе нормы. При оценке метаболизма углеводов у юношей г. Магадана выявлено, что у представителей всех возрастных групп данный показатель находился на верхней границе референтного интервала нормогликемии с увеличением в старшей возрастной группе. При этом выявлен весьма значительный процент юношей с гипергликемическими проявлениями в состоянии углеводного обмена (25–29% в общей выборке обследуемых). Полученные регрессионные модели указывают на наличие значимой возрастной обусловленности увеличения содержания ОХС, ЛПНП, концентрации глюкозы в крови. Значения ЛПВП не подвержены возрастным критериям.

Ключевые слова: юноши; возрастная динамика; углеводно-липидный обмен; регрессионный анализ.

Для цитирования: Аверьянова И.В. Сезонная динамика основных показателей липидного и углеводного обмена у студентов аборигенов и европеоидов Северо-Востока России. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(3): 159–163. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-159-163>

Averianova I.V.

THE AGE DYNAMICS OF CHARACTERISTICS OF METABOLISM OF LIPIDS AND CARBOHYDRATES IN MALE YOUTHS OF THE NORTH-EAST OF RUSSIA

The Federal State Budget Institution of Science "The research center "Arktika" of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 685000, Magadan, Russia

Federal State Budget Educational Institution of Higher Education Northeastern State University "North-Eastern State University", 685000, Magadan, Russia

The purpose of study is to evaluate age dynamics of biochemical indices in male youths permanently residing in the Magadan oblast.

Material and methods. The study was carried out concerning indices of lipids and glucose in blood of 174 male youths aged from 17 to 20–21 years in the Magadan oblast. The detection of main indices of lipid and carbohydrate profiles was implemented using portable biochemical and carbohydrate express-analyzer CardioChek PA (USA) by analyzing capillary blood sampled from finger on an empty stomach after 10–12 hours after last food intake. The mathematical models of age alterations of main indices of lipid carbohydrate profile were made on the basis of implemented analysis. It resulted in regression equations describing relationships between indices of total cholesterol, low density lipoproteins, high density lipoproteins, level of glycemia and age characteristics of the examined.

Conclusion. The character of alterations of most of analyzed indices of biochemical profile indicates availability of aged shifts to area of their increasing already in youth period of ontogenesis. It is established that values of indices of lipid profile in examined groups were within limits of accepted reference values, approaching the lower limit of the norm. The evaluation of metabolism of carbohydrates in male youths of Magadan established that in representatives of all age groups the given indicator is at the higher limit of reference range normoglycemia with increasing in the elder age group. At that, the study revealed a rather significant percentage of male youths with hyperglycemia manifestations in condition of carbohydrate metabolism (25%–29% in total sampling of the examined). The developed regression models indicate occurrence of a significant age conditionality of increasing of content of total cholesterol, low density lipoproteins, concentration of glucose in blood. The values of high density lipoproteins have no effect of age criteria.

Key words: male youths; age dynamics; carbohydrate lipid metabolism; regression analysis

For citation: Averianova I.V. The age dynamics of characteristics of metabolism of lipids and carbohydrates in male youths of the North-East of Russia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(3): 159–163. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-159-163>

For correspondence: Averianova I.V., candidate of biological sciences, researcher of the laboratory of physiology of extreme states of the Federal State Budget Institution of Science "The research center "Arktika" of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: Inessa1382@mail.ru

Для корреспонденции: Аверьянова Инесса Владиславовна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. физиологии экстремальных состояний; e-mail: Inessa1382@mail.ru

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

Acknowledgment. *The study is performed within the framework of the Presidium RAS program of fundamental research "The search fundamental scientific studies for the benefit of developing the Arctic area of the Russian Federation" (the project "Development of unified social economic and medical biological criteria of evaluating environment discomfort and condition of adaptability of residents of Circumpolar and Arctic regions"). The study was also financed at the expense of the Magadan region Governor grant "The adaptive profile of metabolic and morpho-functional characteristics of migrants, adapters and aborigines of the Magadan oblast".*

Received 01.11.2017
Accepted 11.11.2017

Введение. Известно, что проживание на территории урбанизированных северных регионов приводит к формированию нового уровня функционирования основных систем организма и сопровождается гормонально-метаболической перестройкой и вынужденной адаптацией основных физиологических функций для поддержания гомеостаза. Адаптационные перестройки проявляются формированием «северного» метаболизма, в частности, изменением углеводно-липидного обмена и гормонального статуса [1] у населения, прибывшего для проживания в условиях Северного региона [2]. Динамика биохимических показателей крови характеризует тонкие функциональные изменения состояния органов и гуморальных систем регуляции, при этом эндокринно-метаболический гомеостаз является одним из наиболее чувствительных приспособительных механизмов, отражающих адаптацию к изменениям как внутренней, так и внешней окружающей среды [3].

Студенческая молодежь – одна из представительных демографических групп населения страны, насчитывающая свыше 4 млн человек [4], что заслуживает особого внимания в данном контексте. Во-первых, студенты представляют не только потенциал трудовых ресурсов общества, но и его высококвалифицированный компонент, в значительной мере управленческий. Во-вторых, молодежь является популяционным ресурсом, плохое состояние здоровья которого отрицательно отразится и на последующих поколениях [5]. Помимо этого, данный контингент является наиболее однородной по возрасту, а также по социальным характеристикам частью молодежи, основным видом деятельности которой, определяющим все существующие черты их образа жизни, является учёба, подготовка к будущей трудовой жизни [5].

В связи с этим целесообразным считается изучение показателей биохимического статуса организма в возрастном аспекте на данной возрастной выборке как модельной группе, отражающей все изменения, происходящие под действием факторов окружающей среды, что в дальнейшем даст возможность экстраполировать полученные данные на более взрослые группы населения Северо-Востока России.

Материал и методы. В исследованиях приняли участие 174 юноши в возрасте от 17 лет до 21 года, обучающиеся в Северо-Восточном государственном университете (г. Магадан). Все полученные данные по возрастному критерию были разделены на четыре группы: 1-ю составили данные юношей 17 лет ($n = 28$), 2-ю – 18 лет ($n = 72$), 3-ю – 19 лет ($n = 42$) и 4-ю – данные юношей 20–21 года ($n = 32$). Масса тела (МТ) и индекс массы тела (ИМТ) у 17-летних юношей составили соответственно $68,0 \pm 0,4$ кг и $21,1 \pm 0,2$ кг/м², у 18-летних обследуемых – $68,9 \pm 0,5$ кг и $21,5 \pm 0,3$ кг/м², у 19-летних – $70,4 \pm 0,7$ кг и $22,1 \pm 0,2$ кг/м². Молодые люди 20–21 года характеризовались наибольшими значениями соматометрических характеристик: ИМТ – $23,1 \pm 0,3$ кг/м², МТ – $72,1 \pm 0,7$ кг. Все лица, входящие в выборку, были постоянными жителями области и на момент обследования более 6 мес являлись студентами университета с очной формой обучения и характеризовались сопоставимыми условиями жизни и рационом питания. Содержание глюкозы (в ммоль/л), общего холестерина – ОХС (в ммоль/л), триглицеридов – ТГ (в ммоль/л), холестерина липопротеидов высокой плотности – ЛПВП (в

ммоль/л) и холестерина липопротеидов низкой плотности – ЛПНП (в ммоль/л) определяли в капиллярной крови, взятой в утренние часы натощак из пальца спустя 10–12 ч после последнего приёма пищи с использованием портативного биохимического экспресс-анализатора CardioChek PA (США). Для оценки атерогенного потенциала липидного профиля были рассчитаны следующие показатели: отношение ОХС к холестерину ЛПВП: ОХС/ЛПВП и отношение холестерина ЛПНП к холестерину ЛПВП: ЛПНП/ЛПВП. Коэффициент атерогенности (КА) рассчитывали по следующей формуле: $КА = (ОХС - ЛПВП) / ЛПВП$ [6].

О нарушениях липидного профиля крови мы судили исходя из Российских рекомендаций III пересмотра Комитета экспертов Всероссийского научного общества кардиологов 2007 г., составленных с учётом Европейских рекомендаций III пересмотра 2003 г. [7] и на основе третьего доклада экспертов NCEP [8]. За гиперхолестеринемию принимался уровень ОХС $\geq 5,18$ ммоль/л, повышенный уровень ЛПНП $\geq 3,0$ ммоль/л, сниженный уровень ЛПВП $\leq 0,9$ ммоль/л. К гипертриглицеридемии относили уровень ТГ $\geq 1,77$ ммоль/л. Гипергликемию натощак диагностировали при концентрации глюкозы (ГЛ) $\geq 5,6$ ммоль/л согласно критериям Международной диабетической федерации [9].

Полученные результаты подвергнуты статистической обработке с применением пакета прикладных программ «Statistica 7.0». Проверка на нормальность распределения измеренных переменных осуществлялась на основе теста Шапиро–Уилка. Результаты параметрических методов обработки представлены в виде среднего значения (M) и ошибки средней арифметической ($\pm m$). Статистическая значимость различий определялась с помощью критерия Штеффе. Критический уровень значимости (p) в работе принимался равным 0,05, 0,01, 0,001. Оценку прогнозирования уровня показателей биохимического профиля в зависимости от возраста проводили с использованием регрессионного анализа [10].

Результаты. В табл. 1 представлены основные показатели биохимического профиля юношей г. Магадана в возрастной период с 17 лет до 21 года. Из приведённых данных видно, что юноши 17 лет характеризуются наименьшими числовыми величинами ОХС, ТГ и ЛПНП, тогда как статистически значимо более высокие значения этих биохимических характеристик были отмечены у представителей старших возрастных групп. При этом показатель ЛПВП не имеет значимой динамики в возрастной период с 17 лет до 21 года. Полученные результаты указывают на то, что у представителей старших возрастных групп отмечается значимое увеличение расчётных индексов, характеризующих степень атерогенности липидного профиля, относительно представителей младшего возраста. Значимой возрастной динамики относительно уровня глюкозы в крови зафиксировано не было.

Анализ индивидуальных отклонений липидного профиля от нормативных величин (табл. 2) выявил повышенные значения ОХС в крови у 2% 19-летних и у 4% 20–21-летних юношей, тогда как в более младших возрастных группах дислипидемии по данному показателю зафиксирована не была. Высокое (более 3,0 ммоль/л) содержание ЛПНП было выявлено у 5% в 17 лет, у 3% в 18 лет и у 2% в 19 лет. У юношей 20–21 года частота встречаемости высоких значений ЛПНП

Таблица 1

Возрастная динамика биохимических показателей у юношей г. Магадана

Исследуемые показатели	Возрастная группа, годы				Уровень значимости различий между возрастными группами					
	17 (1)	18 (2)	19 (3)	20-21 (4)	1-2	2-3	3-4	1-3	2-4	1-4
ОХС, ммоль/л	3,24±0,06	3,39±0,05	3,46±0,06	3,84±0,07	$p<0.05$	$p=0.35$	$p<0.001$	$p<0.01$	$p<0.001$	$p<0.001$
ТГ, ммоль/л	0,67±0,01	0,79±0,03	0,83±0,05	0,87±0,04	$p<0.001$	$p=0.57$	$p=0.48$	$p<0.01$	$p=0.14$	$p<0.001$
ЛПВП, ммоль/л	1,27±0,04	1,32±0,02	1,28±0,02	1,28±0,03	$p=0.23$	$p=0.09$	$p=0.65$	$p=0.72$	$p=0.27$	$p=0.82$
ЛПНП, ммоль/л	1,53±0,06	1,53±0,04	1,70±0,05	2,03±0,08	$p=0.99$	$p<0.01$	$p<0.001$	$p<0.05$	$p<0.001$	$p<0.001$
КА, усл. ед.	1,78±0,07	1,68±0,06	2,05±0,15	2,40±0,14	$p=0.34$	$p<0.05$	$p=0.09$	$p=0.10$	$p<0.001$	$p<0.001$
ОХС/ЛПВП, усл. ед.	2,78±0,07	2,68±0,06	3,05±0,15	3,40±0,14	$p=0.34$	$p<0.05$	$p=0.09$	$p=0.10$	$p<0.001$	$p<0.001$
ЛПНП/ЛПВП, усл. ед.	1,39±0,07	1,24±0,05	1,54±0,09	1,91±0,13	$p=0.08$	$p<0.001$	$p<0.01$	$p=0.19$	$p<0.001$	$p<0.001$
Глюкоза, ммоль/л	5,35±0,03	5,41±0,04	5,42±0,04	5,43±0,02	$p=0.08$	$p=0.48$	$p=0.49$	$p=0.07$	$p=0.48$	$p<0.05$

была отмечена уже у 12% обследуемых. Величины ЛПВП, выходящие за нижнюю границу нормы, варьировали от 7 до 12%. Гипертриглицеридемия была отмечена у 5% обследуемых в 18- и 19-летнем возрасте и у 4 % 20–21-летних юношей, тогда как у всех обследованных 17-летних юношей данный показатель не выходил за границы нормативного диапазона. При этом выявлена высокая частота встречаемости гипергликемии во всех возрастных группах, самой высокой она была в 17 и 19 лет (29%) со снижением доли к 20–21-летнему возрастному периоду.

Обсуждение. Анализ полученных характеристик липидного обмена, представленных в табл. 1, позволил установить наличие значимой возрастной динамики по ряду изучаемых показателей. Несмотря на статистически значимое увеличение ОХС в возрастной период с 17 лет до 20–21 года, числовые величины данной характеристики имели тенденцию приближаться к нижней границе физиологической нормы, а в случае 17–18–19-летних юношей находиться ниже её. Отметим, что снижение концентрации менее 3,64 ммоль/л в настоящее время рассматривается как проявление гипохолестеринемии и зачастую может являться следствием недостаточности и гипокалорийности рациона питания [11]. Высокие показатели ОХС, превышающие 5,2 ммоль/л, отмечались лишь в более старших возрастных группах (2% обследуемых в группе 19-летних юношей, 4% – в группе 20–21-летних).

Известно, что главным акцептором общего холестерина, который удаляется из макрофагов, в том числе и из пенных клеток атеросклеротических очагов, являются ЛПВП, концентрация которых также обеспечивает механизм антиатерогенного действия [12] и обратный транспорт ОХС [13]. Помимо этого, оптимальный уровень ЛПВП также имеет различные положительные эффекты, такие как антиоксидантный, антиагрегантный и антикоагулянтный [14, 15], всё это способствует профилактическому эффекту в отношении сердечно-сосудистых заболеваний. Эпидемиологические исследования указывают на тесную связь между низким уровнем ЛПВП и увеличением риска развития атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний [16, 17].

Наше исследование характеристик липидного профиля показало, что в возрастном периоде с 17 лет до 20–21 года показатели ЛПВП не имели статистически значимых изменений, что в большей степени согласуется с представленными в литературе результатами Л.П. Зуевой, которая указывает, что содержание ЛПВП не имеет динамики в широком возрастном диапазоне с 14 до 98 лет [18]. Отметим, что в нашей работе данный показатель в среднем у всех возрастных групп находился в пределах нормы [6], лишь у 7–10% обследуемых значения ЛПВП были ниже 0,9 ммоль/л. В целом, концентрация фракции ЛПВП у юношей г. Магадана на фоне неполноценного рациона питания по соотношению и содержа-

нию основных макронутриентов (жиров, белков, углеводов), что было отмечено в наших работах ранее [19], указывает на отсутствие взаимосвязи между питанием и содержанием ЛПВП в крови, что согласуется с представленными в литературе результатами исследований других авторов [20].

Следующая проанализированная в нашей работе фракция липидного профиля – это концентрация холестерина ЛПНП. В норме ЛПНП используются для нужд клеток сосудистой стенки, а при патологических условиях являются источником накопления его в стенке сосуда [21]. При этом известно, что концентрации ЛПНП, являющиеся транспортной формой эндогенного жира в организме, снижение доли в общем спектре свидетельствует об активном использовании жира на энергетические нужды организма [2]. В соответствии с Европейскими руководящими принципами концентрация ЛПНП должна составлять не более 3,00 ммоль/л [22], что и отмечается во всех обследованных нами возрастных группах. Однако анализ отклонений липидного профиля от нормативных величин по данному показателю выявил увеличение доли лиц с повышенным содержанием ЛПНП в старшей возрастной группе (до 12% в выборке). В иностранных работах отмечаются интересные данные: указывается, что уровень ЛПНП должен находиться в оптимальном диапазоне равным от 1,29–1,81 ммоль/л, что по данным авторов соответствует эволюционно приспособленной диете [23] и что столь низкие уровни ЛПНП даже могут являться предикатами увеличения продолжительности жизни [25, 25].

Известно, что наиболее высокоэффективными энергетическими субстратами в организме, а также универсальной формой накопления энергии являются ТГ [26]. Несмотря на то что уровень ТГ во всех обследованных возрастных группах был низким, следует отметить, что в старших возрастных группах эти показатели были статистически значимо выше по сравнению с группами младшего возраста. Выявленное

Таблица 2

Частота(в %) встречаемости нарушений липидного и углеводного обмена у юношей г. Магадана в период обучения в вузе

Возраст обследуемых, годы	Исследуемые показатели				
	ТГ выше 1,77 ммоль/л	ОХС выше 5,18 ммоль/л	ЛПВП ниже 0,9 ммоль/л	ЛПНП выше 3,0 ммоль/л	Глюкоза выше 5,6 ммоль/л
17	0	0	10	5	29
18	5	0	7	3	25
19	5	2	12	2	29
20–21	4	4	10	12	22

нами повышение уровня ТГ совпадало с увеличением доли лиц, у которых данный показатель находился выше нормативного диапазона (4–5% от общей выборки). Исходя из результатов собственных исследований, а также данных литературы, мы можем предположить активное использование ТГ в метаболических процессах организма как основного энергетического субстрата. Тогда как низкие его величины вне зависимости от возрастной группы, по всей вероятности, обусловлены сниженным содержанием жиров в рационе питания, что также согласуется с нашими результатами [19]. Ранее было высказано предположение, что низкий уровень в сыворотке крови натошак концентрации ТГ является маркёром аутоиммунных расстройств [27].

Анализ расчётных индексов, отражающих степень атерогенности, выявил наличие значимой возрастной динамики данных показателей. Так, более высокие показатели коэффициента атерогенности и расчётных соотношений различных фракций холестерина, выявленные в старших возрастных группах, могут расцениваться как неблагоприятный прогностический фактор атерогенной нагрузки на организм. При этом нужно отметить, что в иностранной литературе соотношения липопротеидов, отражающих доли атерогенных и антиатерогенных составляющих в липидном профиле, были предложены в качестве потенциальных маркёров риска развития сахарного диабета 2-го типа в будущем [28, 29], при этом соотношение ЛПНП/ЛПВП, по мнению авторов, является самым сильным предикатом развития гипергликемии [30].

При изучении основного показателя углеводного обмена – уровня глюкозы в крови – было выявлено, что у всех обследуемых групп данный показатель находился на верхней границе референтного интервала нормогликемии с увеличением значений в старшей возрастной группе. При этом у 22–29 % обследуемых содержание глюкозы натошак превышало нормативный диапазон, что, несомненно, является предикатом и риском развития гипергликемических состояний. В настоящее время необходимо констатировать тот факт, что сахарный диабет приобрел масштабы «эпидемии неинфекционного характера», при этом произошло изменение возрастной структуры заболеваемости в сторону увеличения более молодых возрастных групп, что отчасти согласуется с нашими данными. В работе указано, что в период с 2015 по 2040 г. количество заболевших во всём мире увеличится с 415 млн человек (перцентильный размах 340–536 млн) до 642 млн (перцентильный размах 521–829 млн) [31]. Показано, что повышенное содержание глюкозы в крови вызывает повреждения и дисфункции митохондрий в мышцах [32] и, таким образом, потенциально приводит к нарушению энергетического обмена веществ в тканях и утилизации субстрата. Через эти комбинированные механизмы гипергликемия может повысить и мышечный катаболизм белка, что приводит к уменьшению мышечной массы тела и силы [33, 34].

Следующий этап нашей работы был посвящен выявлению взаимосвязей между основными показателями липидного и углеводного обмена в организме и возрастом обследуемых. Для составления математической модели возрастной динамики биохимического профиля нами проведён регрессионный анализ, в результате которого получены регрессионные уравнения со значениями концентрации глюкозы, ОХС, ЛПНП, ЛПВП.

Полученные результаты регрессии указывают на то, что концентрация глюкозы в крови определяется возрастными критериями на 92%.

$y = 0,0293x + 5,3348$ $R^2 = 0,93$, $p < 0,01$ (где y – уровень гликемии, x – возраст).

Математическая зависимость увеличения концентрации ОХС от возраста описывается следующим уравнением регрессии:

$y = 0,187x + 0,023$; $R^2 = 0,92$, $p < 0,05$,
где y – ОХС и x – возраст.

Зависимость уровня ЛПНП от возраста обследуемых представлена следующим уравнением:

$y = 0,1665x + 1,278$; $R^2 = 0,93$, $p < 0,05$,
где y – ЛПНП и x – возраст.

Взаимосвязь уровня ЛПВП и возраста обследуемых имеет следующий вид:

$y = -0,0027x + 0,023$; $R^2 = 0,0164$, $p < 0,05$,
где y – ЛПВП и x – возраст).

Отмечено, что в целом проведённый регрессионный анализ и полученные модели взаимосвязей показателей уровня глюкозы, ОХС, ЛПНП и возрастом достаточно хорошо воспроизводят истинные данные (коэффициент детерминации (R^2) варьирует от 0,92 до 0,93), что сопоставимо с выявленной возрастной динамикой вышеуказанных показателей. Модель взаимосвязи ЛПВП с возрастом характеризуется низкими значениями коэффициента детерминации, что свидетельствует о статистически недостоверной взаимосвязи между переменными модели, что и сопоставимо с отсутствием возрастной динамики данного показателя.

Заключение. Таким образом, полученные результаты указывают на наличие возрастной динамики большинства изучаемых характеристик биохимического профиля организма в юношеском периоде онтогенеза. Показатели ОХС, ЛПНП, ТГ липидного профиля, находясь в пределах нормативного диапазона, но с тенденцией приближения к его нижней границе, имели чёткую возрастную обусловленность, что отражалось на увеличении их в возрастном периоде с 17 лет до 21 года. Уровень глюкозы в крови, имея статистически значимые сдвиги в возрастном диапазоне, приближался к верхней границе референтного интервала для нормогликемии. Отмеченная динамика подтверждается методом линейной регрессии и полученными в результате его моделями взаимосвязей показателей липидно-белкового обмена с возрастными характеристиками обследуемых. Полученные уравнения регрессии указывают на наличие чёткой возрастной детерминированности увеличения показателей ОХС, ЛПНП, концентрации глюкозы в крови, тогда как значения ЛПВП не определяются возрастными критериями, на фоне отсутствия возрастной динамики этого показателя.

При этом проведённый анализ основных характеристик липидного и углеводного обмена позволил выявить особенности формирования показателей в данном возрастном периоде при проживании в условиях Магаданской области. К выявленным особенностям биохимического профиля юношей г. Магадана можно отнести низкие значения липидного профиля на фоне высоких показателей гликемического уровня. При этом у весьма значительного процента юношей отмечаются гипергликемические проявления в состоянии углеводного обмена (25–29% в общей выборке обследуемых). Данный факт можно рассматривать как свидетельство тенденции, указывающей на развитие преддиабетического состояния уже в юношеском возрасте, что, несомненно, не может не отразиться на состоянии здоровья молодежи, вступающей во взрослую жизнь.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Поисковые фундаментальные научные исследования в интересах развития Арктической зоны Российской Федерации» (проект «Разработка унифицированных социально-экономических и медико-биологических критериев оценки дискомфорта окружающей среды и состояния адаптированности жителей циркумполярных и арктических регионов»). Также за счёт средств гранта губернатора Магаданской области «Адаптивный профиль метаболических и морфофункциональных характеристик у мигрантов, адаптантов и аборигенов Магаданской области».

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Догадин С.А. Особенности углеводного и липидного обменов и распространенность инсулиннезависимого сахарного диабета у населения севера Сибири. Дис. д-ра. мед. наук. Москва; 1996.
2. Панин Л.Е. Гомеостаз и проблемы приполярной медицины (методологические аспекты адаптации). *Бюллетень СО РАМН*. 2010; 3(3): 6–11.
3. Бойко Е. Р. Физиолого-биохимические основы жизнедеятельности человека на Севере. Екатеринбург: УрО РАН; 2005.
4. Зашихина В.В., Цыганок Т.В. Физиологические аспекты адаптации к стрессогенным ситуациям при обучении. *Фундаментальные исследования*. 2014; 4: 629–33.
5. Сюпова М.С., Халикова С.С. Здоровье студентов как фактор сохранения трудового потенциала региона. *Ученые заметки ТОГУ*. 2013; 4(4): 204–9.
6. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушение: руководство для врачей. СПб.: Питер Ком; 1999.
7. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации III пересмотр 2007. Разработаны экспертами Всероссийского научного общества кардиологов Секция атеросклероза Москва. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2007; 6. Приложение 3.
9. Шестакова М.В. Комментарии эндокринолога к Рекомендациям по сахарному диабету, преддиабету и сердечно-сосудистым заболеваниям ESC-EASD 2007. *Сахарный диабет*. 2008; 1: 97–9.
10. Боровиков В. П. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере: для профессионалов*. СПб.: Питер; 2003.
18. Зуева Л.П. Липидный спектр сыроворотки крови и полиморфизм генов-кандидатов дислипидемии в пожилом и старческом возрасте. Дис. канд. мед. наук. Уфа; 2009.
19. Аверьянова И.В. Максимов А.Л. Сезонная динамика основных показателей липидного и углеводного обмена у студентов абorigенов и европеоидов Северо-Востока России. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 3: 132–40.
21. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. *Клиническая оценка результатов лабораторных исследований*. М.: Медицина; 2006.
26. Бурлакова Е.Б., Архипова Г.В., Голощанов А.М. Мембранные липиды как переносчики информации. *Биоантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии*. 1982; 2: 74–83.

REFERENCES

1. Dogadin S.A. *Carbohydrate and Lipid Metabolism and Insulin-independent Diabetes Morbidity Rate in North Siberia's Population*. Diss. Moscow; 1996. (in Russian)
2. Panin L.E. Homeostasis and problems of circumpolar medicine (methodological aspects of adaptation). *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya RAMN*. 2010; 3(3): 6–11. (in Russian)
3. Boiko E. R. *Physiological and biochemical grounds for human vital activity in the North [Fiziologo-biohimicheskie osnovy zhiznedejatel'nosti cheloveka na Severe]*. Ekaterinburg: Ural'skogo otdeleniya RAN; 2005. (in Russian)
4. Zashihina V.V., Cyganok T.V. Physiological Aspects of Adaptation to Stressful Situations at Getting Education. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 4: 629–33. (in Russian)
5. Syupova M.S., Khalikova S.S. The Students' Health as a Factor of Maintenance of a Region Labor Potential. *Uchenye zametki TOGU*. 2013; 4(4): 204–9. (in Russian)
6. Klimov A.N., Nikul'cheva N.G. *Lipid and lipoprotein metabolism and its disorder: guide for physicians [Obmen lipidov i lipoproteidov i ego narushenie: rukovodstvo dlja vrachej]*. St.Peterburg: Piter Kom; 1999. (in Russian)
7. Lipid Metabolism Disorders Diagnostics and Correction for Atherosclerosis Prophylaxis and Treatment. Russian recommendations, the 3rd edition of 2007. Worked out by experts of Society of Cardiology of the Russian Federation, Atherosclerosis Section, Moscow. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika – Cardiovascular Therapy and Prophylaxis*. 2007; 6. Prilozhenie 3. (in Russian)
8. Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults/ Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001; 285: 2486–97.
9. Shestakova M.V. Endocrinologist's comments to the Recommendations on diabetes mellitus, prediabetes and cardiovascular diseases ESC-EASD 2007. *Sakharnyi diabet*. 2008; 1: 97–9. (in Russian)
10. Borovikov V. P. *Statistica. The art of analyzing data on a computer: for professionals [Statistica. Iskustvo analiza dannykh na komp'yutere: dlya professionalov]*. St.Peterburg: Piter; 2003. (in Russian)

11. Iribarren C., David R. Jacobs Jr, Martha L. Slaterry, Kiang Liu, Stephen Sidney, Brian J. Hebert, Jeffrey M. Roseman Epidemiology of Low Plasma Cholesterol Concentration among Young Adults: The CARDIA Study Original Research Article. *Preventive Medicine*; 26(4): 495–507.
12. Lewis G.F., Rader D.J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res*. 2005; 96: 1221–32.
13. Brewer H.B. Hypertriglyceridemia: changes in the plasma lipoproteins, associated with an increased with an increased risk of cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol*. 1999; (83): 3–12.
14. Kontush A., Chapman M.J. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr. Opin. Lipidol*. 2010; 21: 312–8.
15. Chung D.W., Chen J., Ling, M. et al. High density lipoprotein modulates thrombosis by preventing von Willebrand factor self-association and subsequent platelet adhesion. *Blood*. 2015; 127: 637–45.
16. Stone J., Robinson J.G., Lichtenstein A.H., Bairey Merz C.N., Blum C.B., Eckel R.H. et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2013; 25(2): 1–45.
17. Barter P., Gotto A.M., LaRosa J.C., Maroni J., Szarek M., Grundy S.M. et al., Treating to new targets, HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med*. 2007; 357(13): 1301–10.
18. Zueva L.P. *Lipid Spectrum of the Blood Serum and Polymorphism of Genes-Candidates of Dyslipidemia at Aged and Geriatric People*. Dis. Ufa; 2009. (in Russian)
19. Aver'yanova I.V. Maksimov A.L. Carbohydrate metabolism observed in Indigenous and Caucasoid students of Northeast Russia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 3: 132–40. (in Russian)
20. Khalil H., Murrin C., O'Reilly M., Viljoen K., Segurado R., O'Brien J., Somerville R., McGillicuddy F., Kelleher C.C. Total HDL cholesterol efflux capacity in healthy children – Associations with adiposity and dietary intakes of mother and child. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2017; 27 (1): 70–7.
21. Nazarenko G.I., Kishkun A.A. *Clinical Estimation of Laboratory Study Results [Klinicheskaya otsenka rezul'tatov laboratornykh issledovaniy]*. Moscow: Meditsina; 2006. (in Russian)
22. Mayor S. European society issues guidelines on cardiovascular disease. *BMJ* 2003; 327: 518.
23. O'Keefe J., Cordain L., Harris W., Moe R., Vogel R. Optimal low-density lipoprotein is 50 to 70 mg/dl: Lower is better and physiologically normal-Review Article . *Journal of the American College of Cardiology*. 2004; 43(11): 2142–6.
24. Stamler J., Daviglus M.L., Garside D.B. et al. Relationship of baseline serum cholesterol levels in three large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *JAMA*. 2000; 284: 311–8.
25. Glueck CJ, Kelley W, Gupta A, Fontaine RN, Wang P, Gartside PS. Prospective 10-year evaluation of hypobetalipoproteinemia in a cohort of 772 firefighters and cross-sectional evaluation of hypocholesterolemia in 1,479 men in the National Health and Nutrition Examination Survey. *I. Metabolism*. 1997; 46: 625–33.
26. Burlakova E.B., Arhipova G.V., Goloshchanov A.M. Membrane Lipids as Information Carriers. *Bioantioxidanteli v regulatsii metabolizma v norme i patologii*. 1982; 2: 74–83. (in Russian)
27. Iannello S., Cavaleri A., Milazzo P., Cantarella S., Belfiore F. Low fasting serum triglyceride level as a precocious marker of autoimmune disorders. *MedGenMed*. 2003; 5: 20.
28. Onat A., Can G., Cicek G., Ayhan E., Dogan Y. Predictive value of serum apolipoprotein B/LDL-cholesterol ratio in cardiometabolic risk: populationbased cohort study. *Clin. Biochem*. 2010; 43: 1381–6.
29. Hwang Y.C., Ahn H.Y., Kim W.J., Park C.Y., Park S.W. Increased apoB/A-I ratio independently associated with Type 2 diabetes mellitus: cross-sectional study in a Korean population. *Diabet. Med*. 2012; 29: 1165–70.
30. Fizelova M., Miilunpohja M., Kangas A.J., Soininen P., Kuusisto J., Ala-Korpela M. et al. Associations of multiple lipoprotein and apolipoprotein measures with worsening of glycemia and incident type 2 diabetes in 6607 non-diabetic Finnish men. *Atherosclerosis*. 2015; 240: 272–7.
31. Ogurtsova K., Fernandes J.D., Huang Y., Linnenkamp U., Makaroff L.E. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2017; 128: 40–50.
32. Elkalaf M, Andel M, Trnka J. Low glucose but not galactose enhances oxidative mitochondrial metabolism in C2C12 myoblasts and myotubes. *PLoS One*. 2013; 8(8): e70772.
33. Kalyani R.R., Metter E.J., Egan J., Golden S.H., Ferrucci L. Hyperglycemia predicts persistently lower muscle strength with aging. *Diabetes Care* 2015; 38(1): 82–90.
34. Lee C.G., Boyko E.J., Barrett-Connor E., Miljkovic I., Hoffman A.R., Everson-Rose S.A. et al. Insulin sensitizers may attenuate lean mass loss in older men with diabetes. *Diabetes Care* .2011; 34(11): 2381–6.

Поступила 01.11.17

Принята к печати 10.11.17

Соснин Д.Ю.,¹ Гилева О.С.,¹ Мозговая Л.А.,¹ Сивак Е.Ю.,¹ Белева Н.С.,¹ Кривцов А.В.,² Поздин Н.В.³

NT-PROBNP В СЛЮНЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ ПАРОДОНТИТЕ

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е. А. Вагнера» Минздрава РФ, 614990, Пермь, Россия;

²ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 614000, Пермь, Россия;

³ФГБОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет» 614990, Пермь, Россия

Изучена концентрация NT-proBNP в слюне и сыворотке крови. В исследование включены 58 человек, разделённых на две группы. Основную (1-ю) группу составили 34 пациента с диагнозом хронический генерализованный пародонтит. Контрольную (2-ю) группу, сопоставимую по возрасту и полу, составили 24 обследованных без признаков воспалительных заболеваний полости рта. Концентрацию NT-proBNP в слюне и сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-системы «NT-proBNP – ИФА – БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Концентрация NT-proBNP в слюне пациентов основной группы достоверно превысила таковую в слюне обследованных контрольной группы, медиана и интерквартильный диапазон составили соответственно: 178,5 (128–253) пг/мл в основной группе и 105 (72,5–144,5) пг/мл в контрольной ($p = 0,02$). При сравнении концентрации NT-proBNP между образцами сыворотки крови достоверных различий не обнаружено ($p = 0,27$). Оценка зависимости между содержанием NT-proBNP в слюне и сыворотке крови показала отсутствие тесной прямолинейной корреляционной зависимости между концентрацией этого соединения в сыворотке крови и слюне как в основной группе ($R=0,143$; $p=0,419$), так и в контрольной ($R=0,178$; $p = 0,405$), а также для всех обследованных ($R = 0,252$; $p = 0,056$). Более высокая концентрация NT-proBNP в слюне в сравнении с таковой в сыворотке крови может быть объяснена формированием перекрестно реагирующих в использованной системе продуктов протеолиза.

Ключевые слова: слюна; BNP; NT-proBNP; натрийуретические пептиды; пародонтит.

Для цитирования: Соснин Д.Ю., Гилева О.С., Мозговая Л.А., Сивак Е.Ю., Белева Н.С., Кривцов А.В., Поздин Н.В. NT-proBNP в слюне и сыворотке крови в норме и при пародонтите. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(3): 164–168. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-164-168>

Sosnin D.Yu.¹, Gileva O.S.¹, Mozgovaia L.A.¹, Sivak E.Yu.¹, Beleva N.S.¹, Krivtsov A.V.², Pozdin N.V.³

THE NT-PROBNP IN SALIVA AND BLOOD SERUM IN NORM AND UNDER PERIODONTITIS

¹The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "E.A.Wagner Perm State Medical University" Ministry of Health of Russia, 614990, Perm, Russia

²The Federal Budget Institution of Science "The Federal Scientific Center of Medical Preventive Technologies of Management of Population Health Risks" of Rospotrebnadzor of Russia, 614000, Perm, Russia

³The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Perm National Research Polytechnic University", 614990, Perm, Russia

The concentration of NT-proBNP in saliva and blood serum was studied. The study included 58 individuals divided in two groups. The main group (group I) included 34 patients with chronic generalized periodontitis. The control group (group II), comparable in age and gender, included 24 examined individuals without signs of inflammatory diseases of oral cavity. The concentration of NT-proBNP in saliva and blood serum was detected by technique of solid-phase enzyme immunoassay using the test-system "NT-proBNP-ELISA-BEST" (Vector-Best, Russia). The concentration of NT-proBNP in saliva of patients of main group reliably exceeded its concentration in saliva of the examined from control group. The median and interquartile range made up to correspondingly 178.5 (128–253) pg / ml in main group and 105 (72.5 – 144.5) pg, respectively / ml in control group ($p = 0.02$). The comparison of concentration of NT-proBNP in blood serum samples established no reliable differences ($p = 0.27$). The evaluation of the relationship between content of NT-proBNP in saliva and blood serum demonstrated absence of close linear correlation dependence between the concentration of this compound in blood serum and saliva both in the main group ($R = 0.143$, $p = 0.419$) and the control group ($R = 0.178$; $p = 0.405$), and for all the examined as well ($R = 0.252$, $p = 0.056$). The higher concentration of NT-proBNP in saliva in comparison with blood serum can be explained by formation of proteolysis products cross-reacting in the used system.

Key words: saliva, BNP, NT-proBNP, natriuretic peptides, periodontitis

For citation: Sosnin D.Yu., Gileva O.S., Mozgovaia L.A., Sivak E.Yu., Beleva N.S., Krivtsov A.V., Pozdin N.V. The NT-proBNP in saliva and blood serum in norm and under periodontitis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(3): 164–168. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-164-168>

For correspondence: Sosnin D.Yu., doctor of medical sciences, associate professor of the chair of clinical laboratory diagnostic of the Faculty of additional professional education of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The academician E.A. Wagner Perm State Medical University", e-mail: sosnin_dm@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support

Received 08.11.2017
Accepted 14.11.2017

Для корреспонденции: Соснин Дмитрий Юрьевич, д-р мед. наук, доц. каф. клин. лаб. диагностики факультета дополнительного профессионального образования; e-mail: sosnin_dm@mail.ru

Основные характеристики обследованных

Показатель	1-я (основная) группа (n = 34)	2-я (контрольная) группа (n = 24)	p*
Гендерное соотношение мужчины / женщины	15/19	10/14	> 0,5
Возраст, годы:			
всех обследо- ванных	42,9 ± 10,2 42 (36 – 51) 26–67	40,8 ± 10,8 38,5 (34 – 48,5) 25–72	0,348 (U=348,5)
мужчин	42,9 ± 9,5 42 (36–51) 28–57	44,7 ± 11,9 42 (38–50) 29–72	0,933 (U=73,5)
женщин	42,9 ± 10,9 42 (35–49) 26–67	38,1 ± 9,5 35,5 (32–45) 25–56	0,195 (U=97,5)
p **	0,741 (U = 133)	0,135 (U = 44,5)	

Примечание. Здесь и в табл.2: в числителе – среднее значение ± стандартное отклонение ($M \pm SD$), в знаменателе – медиана и интерквартильный диапазон (Me; 25% квартиль – 75% квартиль), под дробью – результаты мин – макс; * – различие между группами (основной, группой сравнения и контрольной группой) (Н-критерий Краскелла–Уоллиса); ** – различие между мужчинами и женщинами (U критерий Манна–Уитни).

Введение. Натрийуретические пептиды (НУП) являются небольшими белковыми молекулами, обладающими сходной третичной конфигурацией и состоящими из нескольких десятков аминокислот. Охарактеризованы следующие представители данных белков: предсердный НУП (ANP) или НУП А-типа, мозговой НУП (BNP) или НУП В-типа и НУП С-типа, а также их предшественники и продукты ограниченного протеолиза [1].

Установлено, что НУП играют важную роль в регуляции водного обмена, защищая организм от перегрузки жидкостью, а также принимают участие в регуляции артериального давления и водного баланса [1].

В практической деятельности клинко-диагностических лабораторий (КДЛ) чаще всего выполняется исследование НУП В-типа и его производных. НУП В-типа (BNP), определяемый в крови, имеет преимущественно сердечное происхождение и синтезируется в кардиомиоцитах желудочков сердца в виде белка предшественника – ргргоBNP. Основным стимулом его секреции является увеличение напряжения миокарда левого желудочка при повышении давления в желудочках сердца. В дальнейшем ргргоBNP расщепляется путём ограниченного протеолиза, продукты высвобождаются в кровь в эквимолярном соотношении в виде двух соединений: активного гормона, состоящего всего из 32 аминокислот (BNP) и неактивного N-терминального фрагмента, состоящего из 76 аминокислот (NT-proBNP).

В практике КДЛ секреция НУП мозгового типа оценивается путём определения биологически неактивного NT-proBNP и именно оценка его концентрации используется для верификации хронической сердечной недостаточности (ХСН) и стратификации её тяжести [2–7]. С аналитической точки зрения исследование NT-proBNP более надёжно отражает тяжесть сердечной недостаточности, чем активный гормон (BNP). Он имеет более длительный период полураспада (около 120 мин) в сравнении с BNP (20 мин). Более высокая стабильность NT-proBNP и меньшая биологическая вариабельность в сравнении с BNP определили выбор именно данного соединения для оценки секреции и концентрации мозгового НУП в сыворотке крови и разработки коммерческих тест-систем для его серийного определения в КДЛ [6–8].

В последние годы выполнены сравнительные исследования содержания НУП и их производных в сыворотке крови и ряде биологических жидкостей: моче [9, 10], ликворе [11, 12], экссудатах и транссудатах [13–15], внутриглазной жидкости [16, 17]. Однако в доступной нам литературе мы обнаружили лишь единичные публикации, содержащие результаты исследования мозгового НУП в секретах желёз пищеварительного тракта, в частности в слюне [18–20], а также фрагмент его предшественника [21, 22]. В большинстве публикаций приводятся результаты сравнительного исследования НУП в слюне и сыворотке крови при заболеваниях сердца, а не при заболеваниях полости рта. В связи с этим представляет интерес изучение концентрации НУП в слюне при заболеваниях полости рта, в частности при развитии воспалительных заболеваний тканей пародонта (пародонтите).

Цель исследования – изучить концентрацию NT-proBNP в образцах слюны и сыворотки крови у здоровых людей, пациентов с воспалительными заболеваниями полости рта.

Материал и методы. Выполнено одномоментное обсервационное исследование типа «случай–контроль». Исследование выполнено с соблюдением этических принципов проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов, изложенных в Хельсинкской декларации ВОЗ. На его проведение получено одобрение этического комитета ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени акад. Е. А. Вагнера» Минздрава РФ.

В исследование были включены пациенты, госпитализи-

рованные для лечения в стоматологическую клинику ФГБОУ ВО ПГМУ им. акад. Е. А. Вагнера Минздрава РФ, а также добровольцы: сотрудники и учащиеся вуза. Всего обследовано 58 человек. Средний возраст пациентов составил 42,1 ± 10,4 года (медиана 40,5 года, интерквартильный диапазон 35–49 лет). Обследуемые были разделены на две группы сопоставимые по возрасту и полу. Характеристика групп представлена в табл. 1.

Основную (1-ю) группу составили 34 пациента (15 мужчин и 19 женщин), с диагнозом хронический генерализованный пародонтит. Контрольную (2-ю) группу составили 24 обследованных без признаков воспалительной патологии полости рта.

Исследование NT-proBNP выполняли в образцах сыворотки крови и слюны, собранных в утренние часы, натощак, до применения медикаментозной терапии и курения.

Сбор смешанной не стимулированной слюны осуществляли по следующей методике [23]. Слюну собирали через 1,5–2 ч после завтрака. Обследуемого просили в положении сидя опустить голову и держать рот открытым в течение 2 мин. Секретирующаяся слюна (базальная, не стимулированная секреция) аккумулировалась на дне полости рта. Скапливающуюся слюну собирали стеклянной пипеткой (использовали глазную пипетку) и переносили в пластиковую пробирку. Процедуру повторяли несколько раз до получения объёма слюны не менее 0,5 мл.

Кровь забирали методом венепункции кубитальной вены в пробирки с активатором свертывания крови (Greiner VACUETTE®, Greiner Bio-one, Graz, Austria).

Сыворотку крови и слюну отделяли от форменных элементов путём центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 мин. Дальнейшему исследованию подвергали сыворотку крови и супернатант слюны.

Концентрацию NT-proBNP определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использова-

Таблица 2

Содержание NT-proBNP в биологических жидкостях обследованных, пг/мл

Биологическая жидкость	1-я (основная) группа (n = 34)	2-я (контрольная) группа (n = 24)	p*
Сыворотка крови	66,2 ± 39,3 57,5 (32–91) 15–210	53,4 ± 21,1 48,5 (35–64) 33 – 104	p = 0,2697 (U=338)
Слюна	193,3 ± 136,1 178,5 (128–253) 33–765	136,6 ± 105,5 105 (72,5–144,5) 30–471	p = 0,0203 (U=261)
p **	< 0,000002	0,000081	
R (коэффициент корреляции Спирмена)	R = 0,143 (p=0,419)	R = 0,178 (p=0,405)	

Примечание. * – различие между группами (U – критерий Манна – Уитни); ** – различие между сывороткой крови и слюной внутри группы (критерий Вилкоксона).

нием тест-системы «NT-proBNP – ИФА – БЕСТ» (А 9102) (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). По данным паспорта к набору реактивов чувствительность тест-системы: не менее 20 пг/мл. Оптическую плотность проб регистрировали на вертикальном фотометре StatFax 3200 (Awareness, США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA v. 7 (StatSoftInc., США). Для каждого массива данных рассчитывали параметры описательной статистики: среднюю арифметическую (M), стандартное отклонение (SD), медиану (Me) и интерквартильный диапазон (25%–75% процентиля), а также минимальное (min) и максимальное (max) значение. Массивы данных оценивали на наличие и степень выраженности выбросов. Характер распределения полученных результатов

оценивали с использованием критерия Шапиро – Уилка. Полученные результаты позволили отвергнуть нулевую гипотезу о нормальном характере их распределения. Это послужило основанием для отказа от использования параметрических критериев при выполнении дальнейшего статистического анализа. Для сравнения двух зависимых выборок использовали критерий Вилкоксона, для сравнения двух независимых – U-критерий Манна–Уитни. Количественную оценку линейной связи между двумя случайными величинами определяли с использованием коэффициента ранговой корреляции (R) Спирмена.

За максимально приемлемую вероятность ошибки первого рода (p) приняли величину уровня статистической значимости, равную или меньшую 0,05.

Результаты. Содержание NT-proBNP в слюне превышало его уровень в сыворотке крови. Медианы концентрации между биологическими жидкостями различались в 1-й (основной) группе в 3,1 раза, а во 2-й (контрольной) в 2,2 раза (рис 1).

Результаты исследований концентрации NT-proBNP представлены в табл. 2. Индивидуальные колебания концентрации изученного соединения были более выражены в слюне, чем в сыворотке крови. Содержание NT-proBNP в слюне пациентов 1-й группы достоверно превышало его содержание в слюне обследованных контрольной группы (p = 0,203). При сравнении концентрации NT-proBNP между образцами сыворотки крови достоверных различий не обнаружено (p = 0,27) (табл. 2).

Не обнаружено достоверной прямолинейной корреляционной зависимости между содержанием NT-proBNP в биологических жидкостях у пациентов основной группы (R=0,143; p=0,419), а также у пациентов контрольной группы (R = 0,178; p=0,405). Учитывая небольшое количество наблюдений, проанализировали возможность наличия корреляционной зависимости между биологическими жидкостями для всех обследованных (рис. 2). При корреляционном анализе всех полученных результатов нами не выявлено заметной

Таблица 3

Содержание натрийуретических пептидов и их метаболитов в слюне

Источник литературы	Тип образцов	Заболевание	Биомаркер; метод, прибор	Результат
[18]	Слюна, десневая жидкость и сыворотка крови	Повреждение и некроз миокарда	BNP; ИХЛА, Beckman Access®	Изменение биомаркеров в сыворотке крови находит отражение в профиле биомаркеров жидкостей полости рта. Наиболее пригодным материалом является смешанная нестимулированная слюна. Концентрация BNP в слюне была в десятки и сотни раз ниже, чем в сыворотке крови
[19]	Слюна и сыворотка крови	Острый некроз миокарда	BNP; ИХЛА, Beckman Access®	Увеличение BNP при остром инфаркте миокарда в сравнении со здоровыми людьми как в сыворотке крови (p = 0,001), так и в слюне (p = 0,035)
[20]	Слюна и сыворотка крови	ХСН	BNP; ИФА, Shanghai, China, NT-proBNP; ЭХЛА Elecsys 2010 (ROCHE)	Увеличение BNP в слюне наблюдается при формировании сердечной недостаточности как у амбулаторных больных с ХСН, так и у пациентов, госпитализированных с декомпенсацией ХСН. Между концентрацией BNP в слюне и NT-proBNP в сыворотке крови имеется корреляционная связь (коэффициент корреляции Пирсона (r = 0,459, p < 0,001)
[21]	Слюна	Периодонтит и ХСН	NT-proBNP; ЭХЛА Elecsys 2010 (ROCHE)	NT-proBNP выше у пациентов с развитием периодонтита на фоне онкологических заболеваний; NT-proBNP могут использоваться для оценки потенциальных рисков со стороны сердечно-сосудистой системы при проведении химиотерапии
[22]	Слюна и ЭДТА-плазма крови,	ХСН	NT-proBNP; ИФА AlphaLISA® Perkin Elmer®, MA, прибор EnSpireTM (Perkin ElmerH,	В слюне здоровых людей NT-proBNP не обнаружен. У пациентов с ХСН содержание NT-proBNP в слюне увеличивалось, но примерно в 200 раз было ниже, чем в плазме крови. Не обнаружено какой-либо корреляционной зависимости между содержанием NT-proBNP в слюне и плазме крови у пациентов с ХСН (n = 45) (r ² = 0,006, p = 0,66)

Примечание. ИФА – иммуноферментный анализ; ИХЛА – иммунохемилюминесцентный анализ; ЭХЛА – электрохемилюминесцентный анализ

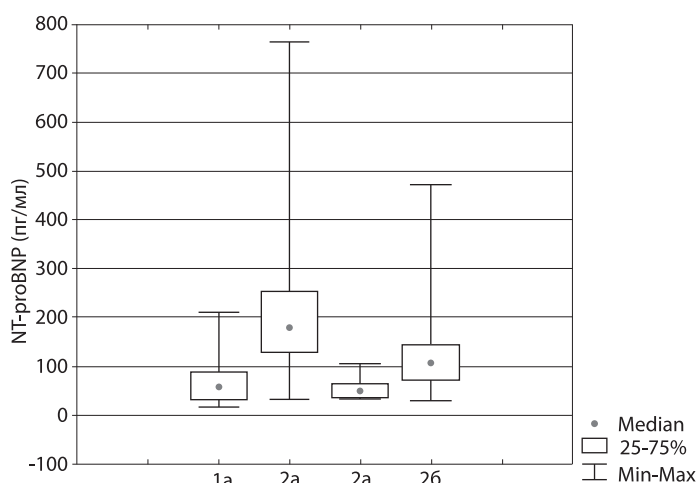


Рис. 1. Концентрация NT-proBNP (в нг/мл) в сыворотке крови и слюне обследованных.

1 – основная группа (пародонтит); 2 – контрольная группа (здоровые обследованные); а – сыворотка крови; б – слюна.

прямолинейной корреляционной связи между содержанием NT-proBNP в сыворотке крови и смешанной слюне ($R=0,252$; $p=0,056$) (рис. 2).

Обсуждение. В ряде публикаций отмечается, что слюна хорошо отражает состояние здоровья и почти 20% белков, присутствующих в сыворотке крови, обнаруживаются в слюне [18, 19, 21, 24]. При этом авторы подчеркивают, что в отличие от крови исследование слюны является не инвазивным, а простым и безопасным способом сбора проб биологических жидкостей, что открывает новые возможности для неинвазивной оценки состояния здоровья индивидуумов [18, 24, 25]. Данные о содержании НУП и их производных, приведённые в литературе, суммированы в табл. 3.

В слюне обнаружены как сами НУП, в частности BNP [18–20], так и неактивный пептид NT-proBNP [21, 22]. Сравнение содержания BNP и NT-pro-BNP в сыворотке крови и слюне показало, в последней оно ниже [18, 19, 21, 22]. Авторы указывают на более высокий уровень как BNP, так и NT-proBNP у пациентов с различной сердечно-сосудистой патологией и

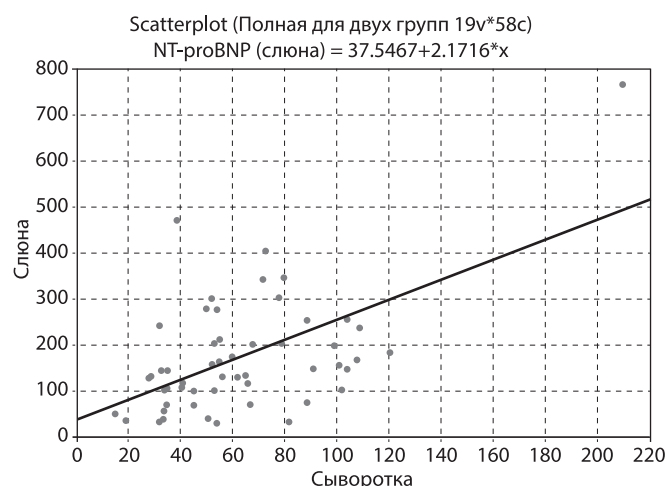


Рис. 2. Корреляционная зависимость между содержанием NT-proBNP в слюне и сыворотке крови.

формированием ХСН в сравнении со здоровыми пациентами (см. табл. 3) [20–22]. На основании полученных данных авторы делают вывод о возможности использования определения концентрации NT-proBNP в слюне для диагностики ХСН и оценки эффективности её лечения [18–22].

При оценке корреляционной зависимости в ряде исследований либо не представлены результаты исследований [18, 19], либо выявлена умеренная корреляционная зависимость [20], либо констатируется её отсутствие [22].

В нашем исследовании мы продемонстрировали отсутствие достоверной корреляции между содержанием данного соединения в слюне и сыворотке крови и выявили более высокую концентрацию NT-proBNP в слюне по сравнению с таковой в сыворотке крови.

Более высокое содержание NT-proBNP в слюне по сравнению с таковым в сыворотке крови, продемонстрированное в нашем исследовании, может иметь различные объяснения. С одной стороны, это может указывать на возможное образование НУП слюнными железами полости рта. В литературе имеются публикации о более высоком содержании в слюне белков, которые традиционно рассматриваются как белки плазмы крови. Так, в исследованиях, выполненных С. Bassim и соавт. [26], приведены результаты исследования концентрации прокальцитонина у пациентов с сахарным диабетом, осложнённым периодонтитом. Авторы указали на более высокое содержание этого соединения в слюне в сравнении с таковым в сыворотке крови и корреляцию степени его увеличения в слюне со степенью активности периодонтита [26].

Однако гипотеза о локальной продукции НУП и NT-proBNP не подтверждается результатами исследователей, обнаруживших более низкие концентрации этих соединений в слюне при сравнении с сывороткой крови [21, 22]. Более вероятным, на наш взгляд, является предположение о возможном несовершенстве использованной тест-системы для ИФА, в частности, использование при разработке тест-системы моноклональных антител с различной антигенной специфичностью. Так, в исследованиях, выполненных J. Foo, указывается, что использование при разработке тест-систем не-стандартизированных N-концевых фрагментов NT-proBNP может вести к ошибочному диагнозу сердечной недостаточности [27]. Авторы указывают на образование различных форм N- и C-терминальных фрагментов NT-proBNP при локализации ограниченного протеолиза данного соединения в различных участках исходной молекулы у пациентов с сердечной недостаточностью [27]. Для улучшения диагностики сердечной недостаточности они предлагают использовать антитела, взаимодействующие с центральными эпитопами молекулы NT-proBNP, а не с её терминальными фрагментами [27].

У пациентов с генерализованным пародонтитом происходит активация протеолиза в очаге воспаления, в том числе с участием ферментов микробного происхождения, что может привести к формированию большого количества различных пептидов и продуктов частичного протеолиза. Этим может объясняться повышение содержания NT-proBNP у пациентов с пародонтитом, установленное нами, а также продемонстрированное в исследованиях, выполненных W. Loo и соавт. [21]. Однако мы предполагаем, что обнаруженное увеличение является следствием активации протеолиза при развитии периодонтита и возникновением перекрестно реагирующих фрагментов.

Данная проблема применения тест-систем может возражать при использовании моноклональных антител, которые связываются с нечётко идентифицированными эпитопами анализируемых молекул. К сожалению, производители тест-систем в инструкциях не приводят конкретных указаний, с какими участками антигена происходит взаимодействие используемых ими моноклональных антител.

В связи с этим необходимы дополнительные исследования

концентрации NT-proBNP в одних и тех же образцах слюны с использованием тест-систем разных фирм-производителей, применяющих различные моноклональные антитела.

Выводы. 1. NT-proBNP обнаруживается в смешанной слюне здоровых людей. Его концентрация достоверно выше его содержания в сыворотке крови ($p = 0,00029$).

2. Воспалительные заболевания органов полости рта (пародонтит) сопровождаются ростом концентрации NT-proBNP в смешанной слюне.

3. Результаты исследования корреляционной связи между содержанием NT-proBNP в слюне и сыворотке крови свидетельствуют о прямолинейной корреляционной зависимости как для всех обследованных ($R = 0,252$; $p = 0,056$), так и для индивидуальных групп.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–3, 6–20, 22–25 см. REFERENCES)

4. Барабаш О.Л., Усольцева Е.Н. Лечение сердечной недостаточности под контролем концентрации натрийуретических пептидов. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний* 2014; 1: 67–74.
5. Бурнашева Г.А., Напалков Д.А. Натрийуретические пептиды: использование в современной кардиологии. *Вестник РАМН*. 2015; (5): 568–72.
23. Гилева О. С., Смирнова Е. Н., Поздняков А. А., Либик Т. В., Особенности диагностики и лечения ксеростомического синдрома при заболеваниях пародонта и слизистой оболочки полости рта у пациентов с сахарным диабетом II-типа. *Русский медицинский журнал*. 2016; 24(20): 1340–5.

REFERENCES

1. Potter L.R., Yoder A.R., Flora D.R., Antos L.K., Dickey D.M. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009; (191): 341–66.
2. Masson S., Latini R. Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptides and prognosis in chronic heart failure. *Am. J. Cardiol.* 2008; 101 (3A): 56–60.
3. Richards A.M., Troughton R.W. Use of natriuretic peptides to guide to monitor heart failure therapy. *Clin. Chem.* 2012; 58(1): 62–71.
4. Barabash O.L., Usol'tseva E.N. Treatment of heart failure under the control of the concentration of natriuretic peptides. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy*. 2014; 1: 67–74. (in Russian)
5. Burnasheva G.A., Napalkov D.A. Natriuretic peptides: use in modern cardiology. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2015; (5): 568–72. (in Russian)
6. McQuade C.N., Mizus M., Wald J.W., Goldberg L., Jessup M., Umscheid C.A. Brain-type natriuretic peptide and amino-terminal pro-brain-type natriuretic peptide discharge thresholds for acute decompensated heart failure: a systematic review. *Ann. Intern. Med.* 2017; 166(3): 180–90.
7. O'Hanlon R., O'Shea P., Ledwidge M., O'Loughlin C., Lange S., Conlon C., Phelan D., Cunningham S., McDonald K. The biologic variability of B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in stable heart failure patients. *J. Card. Fail.* 2007; Feb;13(1):50–5.
8. Vasile V.C., Jaffe A.S. Natriuretic peptides and analytical barriers. *Clin. Chem.* 2017; 63(1): 50–8.
9. Toufan M., Namdar H., Abbasnezhad M., Habibzadeh A., Esmaili H., Yaraghi S., Samani Z. Diagnostic values of plasma, fresh and frozed urine NT-pro-BNP in heart failure patients. *J. Cardiovasc. Thorac. Res.* 2014; 6(2): 111–5.
10. Schimmel A.M., Barents M., de Jongste M.J., Romer J.W., Steward

- R.N., Muskiet F.A. High intraindividual variation of N-terminal pro-B-type Natriuretic peptide in urine of patients with chronic heart failure: comparison with plasma. *Clin. Chem.* 2016; Feb; 62(2): 407–8.
11. Kirchhoff C., Stegmaier J., Bogner V., Buhmann S., Mussack T., Kreimeier U., Mutschler W., Biberthaler P. Intrathecal and systemic concentration of NT-proBNP in patients with severe traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*. 2006 Jun;23 (6): 943–9.
12. Rauchenzauner M., Haberlandt E., Rösslhuber C., Luef G., Otto M., Hammerer-Lercher A., Griesmacher A., Rostasy K. Cerebrospinal fluid and serum NT-proBNP concentrations in children with epilepsy. *Epilepsy Res.* 2009 Oct; 86(2–3): 131–7.
13. Zhou Q., Ye Z.J., Su Y., Zhang J.C., Shi H.Z. Diagnostic value of N-terminal pro-brain natriuretic peptide for pleural effusion due to heart failure: a meta-analysis. *Heart.* 2010; Aug; 96(15): 1207–11.
14. Cincin A., Abui Y., Ozben B., Tanrikulu A., Topaloglu N., Ozgul G., Karakurt S., Oktay A. Pleural fluid amino-terminal brain natriuretic peptide in patients with pleural effusions. *Respir. Care.* 2013 Feb; 58(2):313–9.
15. Han Z.J., Wu X.D., Cheng J.J., Zhao S.D., Gao M.Z., Huang H.Y., Gu B., Ma P., Chen Y., Wang J.H., Yang C.J., Yan Z.H. Diagnostic accuracy of natriuretic peptides for heart failure in patients with pleural effusion: a systematic review and updated meta-analysis. *PLoS One.* 2015 Aug 5;10(8):e0134376 .
16. Fernandez-Durango R., Trivino A., Ramirez J.M., Garcia De Lacoba M., Ramirez A., Salazar J.J. et al. Immunoreactive atrial natriuretic factor in aqueous humor: its concentration is increased with high intraocular pressure in rabbit eyes. *Vision Res.* 1990; 30 (9): 1305–10.
17. Bauman K., Ranka R., Laganovska G. Association of NT-proANP level in plasma and humor aqueous with primary open-angle glaucoma. *Curr. Eye Res.* 2017 42(2):233–6.
18. Foley J.D. 3rd., Sneed J.D., Steinhubl S.R., Kolosa J., Ebersole J.L., Lin Y. et al. Oral fluids that detect cardiovascular disease biomarkers. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 2012; 114(2):207–14.
19. Miller C.S., Foley J.D.3rd., Floriano P.N., Christodoulides N., Ebersole J.L., Campbell C.L., Bailey A.L., Rose B.G., Kinane D.F., Novak M.J., McDevitt J.T., Ding X., Kryscio R.J. Utility of salivary biomarkers for demonstrating acute myocardial infarction. *J. Dent. Res.* 2014; 93 (7 Suppl): 72–9.
20. Joharimoghadam A., Tajdini M., Bozorgi A. Salivary B-type natriuretic peptide: a new method for heart failure diagnosis and follow-up. *Kardiol. Pol.* 2017; 75(1): 71–7.
21. Loo W.Y., Yue C.B., Fan C.B., Bai L.J., Dou Y.D., Wang M., Liang H., Cheung M.N., Chow L.W., Li J.L., Tian Y., Qing L. Comparing serum levels of cardiac biomarkers in cancer patients receiving chemotherapy and subjects with chronic periodontitis. *J. Transl. Med.* 2012; 10(1): S.5.
22. Foo J.Y., Wan Y., Kostner K., Arivalagan A., Atherton J., Cooper-White J., Dimeski G., Punyadeera C. NT-proBNP levels in saliva and its clinical relevance to heart failure. *PLoS One.* 2012; 7(10): e48452.
23. Gileva O.S., Smirnova E.N., Pozdnyakova A.A., Libik T.V. Hallmarks of diagnosis and treatment of xerostomia syndrome in patients with peri-odontal and oral mucosal diseases and diabetes mellitus type 2. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2016; (24)20:1340–5. (in Russian)
24. Al Kawas S., Rahim Z.H., Ferguson D.B. Potencial uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Arch. Oral Biol.* 2012; 57(1):1–9.
25. Abdol Rehman S., Khurshid Z., Hussain Niazi F., Naseem M., Al Waddani, Sahibzada H.A., Sannam Khan R. Role of salivary biomarkers in detection of cardiovascular disease (CVD). *Proteomes*. 2017; 5(3). pii E21.)
26. Bassim C. W., Redman R.S., DeNucci D.J., Becker K.L., Nylen E.S. Salivary procalcitonin and periodontitis in diabetes. *J. Dent Res.* 2008 87(7): 630–4.
27. Foo J.Y., Wan Y., Schulz B.L., Kostner K., Atherton J., Cooper-White J., Dimeski G., Punyadeera C. Circulating fragments of N-terminal pro-B-type natriuretic peptides in plasma of heart failure patients. *Clin Chem.* 2013; 59(10):1523–31.

Поступила 08.11.17

Принята к печати 14.11.17

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.6-006.04-076.5

Савостикова М.В., Кудайбергенова А.Г., Федосеева Е.С., Фурминская Е.Ю.

ПАРИЖСКАЯ СИСТЕМА ИНТЕРПРЕТАЦИИ УРИНАРНОЙ ЦИТОПАТОЛОГИИ

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина» Минздрава РФ, 115478, Москва, Россия

В работе представлена Парижская система оценки уринарной цитопатологии, разработанная совместными усилиями цитологов, патологов и урологов в апреле 2016 г. Представлены семь принятых категорий цитологических заключений и критерии их оценки, риск озлокачествления при различной уринарной патологии и рекомендуемая тактика ведения пациентов.

Ключевые слова: онкоурология; цитология; моча; уротелиальный рак.

Для цитирования: Савостикова М.В., Кудайбергенова А.Г., Федосеева Е.С., Фурминская Е.Ю. Парижская система интерпретации уринарной цитопатологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (3): 169-173. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-169-173>

Savostikova M.V., Kudaybergenova A.G., Fedoseieva E.S., Furminskaya E.Yu.

THE PARIS SYSTEM OF INTERPRETATION OF URINARY CYTOPATHOLOGY

The Federal State Budget Scientific Institution "The N.N. Blokhin Russian Oncologic Scientific Center" of Minzdrav of Russia, 115478, Moscow, Russia

The article presents the Paris system of interpretation of urinary cytopathology developed by joint efforts of cytologists, pathologists and urologists in April 2016. The seven accepted categories of cytological opinion letters are presented, including criteria of their evaluation, risk of malignancy development under various urinary pathology and recommended tactics of management of patients.

Key words: oncurology; cytology; urine; urothelial cancer

For citation: Savostikova M.V., Kudaybergenova A.G., Fedoseieva E.S., Furminskaya E.Yu. The Paris system of interpretation of urinary cytopathology. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(3): 169-173. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-169-173>

For correspondence: Savostikova M.V., candidate of medical sciences, the head of the Laboratory of Clinical Cytology of the Department of pathological anatomy of human tumors, e-mail: savostikovamv@yandex.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 19.10.2017
Accepted 30.10.2017

По данным М.И. Давыдова и Е.М. Аксель [1], в России в 2012 г. зарегистрировано 14 212 впервые выявленных больных раком мочевого пузыря (РМП). С 2007 по 2012 г. прирост абсолютного числа заболевших составил 6,8% у мужчин и 18,2% у женщин [1]. Заболеваемость РМП увеличивается примерно на 13% в год, однако показатель смертности неуклонно снижается благодаря ранней диагностике заболевания и повышению эффективности его лечения. Более 70% карцином мочевого пузыря (МП) представлены опухолями, растущими в пределах слизистого и подслизистого слоев (pTa-T1). Такие опухоли имеют склонность к рецидивированию в 47–88,2% наблюдений, чаще являются генетически стабильными, и диагностика раннего рецидива именно по цитологическому материалу смывов и мочи представляет важную задачу для клинического ведения таких пациентов [2]. Однако из всех диагностируемых случаев этого заболевания лишь около половины обнаруживаются при цитологическом исследовании. Консолидация усилий морфологов

и клинических специалистов определила неопределимую роль цитологического исследования в выявлении уротелиальных карцином высокой степени злокачественности (HGUC), как возникающих *de novo*, так и находящихся под наблюдением. Одним из главных достоинств цитологического метода является неинвазивность процедуры получения материала, при этом в отношении HGUC чувствительность цитологической диагностики варьирует от 80 до 90%, специфичность – от 90 до 99% [3, 4].

В настоящее время специалисты-цитоморфологи признают нецелесообразность определения всех гистологических типов уротелиальных опухолей. Поэтому для адекватной интерпретации цитологических образцов мочи потребовался междисциплинарный подход. В мае 2013 г. на 18-м международном цитологическом конгрессе в Париже совместными усилиями цитологов, патологов и урологов были обсуждены возможности уринарной цитологии в скрининге и диагностике РМП [3]. Так в 2016 г. была утверждена Парижская система интерпретации патологии уринарного тракта, аналогичная системе Бетесда, которая принята для оценки цервикальной патологии или патологии щитовидной железы. Было представлено 7 категорий заключений, приведенных ниже [4].

Для корреспонденции: Савостикова Марина Владимировна, канд. мед. наук, зав. лаб. клин. цитологии отдела патологической анатомии опухолей человека; e-mail: savostikovamv@yandex.ru

Категории цитологических заключений при уринарной патологии

Недиагностический/ неадекватный материал
Цитограмма, негативная по уротелиальной карциноме высокой степени злокачественности (NHGUC)
Атипичные уротелиальные клетки (AUC)
Подозрение на наличие уротелиальной карциномы высокой степени злокачественности (SHGUC)
Уротелиальная карцинома низкой степени злокачественности (LGUC)
Уротелиальная карцинома высокой степени злокачественности (HGUC)
Другие опухоли, первичные и вторичные

Категория «Недиагностический/ неадекватный материал». Она выделена для препаратов полностью бесклеточных, а также для тех случаев, когда уротелиальные клетки затенены эритроцитами, нейтрофилами или смазкой, и для тех случаев, когда материал хранился более 4 ч и клетки подверглись лизису (рис. 1, см.обложку).

Категория «Цитограмма, негативная по уротелиальной карциноме высокой степени злокачественности (NHGUC)». Эта категория означает, что препарат состоит из доброкачественных уротелиальных клеток и полностью отсутствуют подозрения в том, что эти клетки могут отдалённо напоминать HGUC. При этом клеточный состав не исключает наличия уротелиальной карциномы низкой степени злокачественности (LGUC) (рис.2, см. обложку), так как цитоморфология клеток при LGUC сходна с морфологией реактивного уротелия. Клинические подходы к наблюдению и ведению пациентов с таким диагнозом являются предметом дальнейших исследований. **Парадокс уринарной цитологии состоит в том, что плеоморфные клетки с увеличенными гиперхромными ядрами, выраженными ядрышками могут быть доброкачественными, в то время как практически нормально выглядящие мономорфные клетки с обычными ядрами могут быть злокачественными.**

Морфологические критерии «цитогрaмм, негативных по HGUC» включают:

- доброкачественные уротелиальные и другие эпителиальные клетки;
- реактивные уротелиальные клетки (низкое ядерно-цитоплазматическое соотношение, нежный хроматин, равномерная гладкая ядерная мембрана, выраженные мелкие ядрышки, небольшие бесструктурные скопления клеток);
- цитопатический эффект полиомавируса: хроматин в виде матового стекла, очень тёмный, ядра округлые и гладкие (Десоу-клетки, или клетки-ловушки). Некоторые исследователи отмечают, что обнаружение таких клеток не исключает наличия уротелиальной карциномы – описаны единичные случаи одновременного их присутствия в препарате (рис. 3, см.обложку) [5, 6];
- доброкачественные уротелиальные тканевые фрагменты (мономорфные клетки, нежный хроматин, ядра с округлыми гладкими контурами, мелкие ядрышки) (рис. 4, см.обложку);
- посттерапевтические эффекты (изменения на фоне иммунотерапии, лучевой и химиотерапии, элементы гранулёмы, многоядерные гигантские клетки) (рис. 5, см.обложку);
- изменения, связанные с уролитоазом.

Категория «атипичные уротелиальные клетки (AUC)». Наиболее противоречивая категория для клиницистов и морфологов. В литературе нет чёткого определения атипичности – это трудно определяемая категория с высокой частотой разногласий в диапазоне 2–30% [7]. Целью выделения этой группы является идентификация пациентов с высоким риском развития HGUC. В эту категорию не входят атипичные изменения при реактивных или дегенеративных изменениях, а также при уролитоазе.

Критерии AUC определяются как:

- не поверхностные сохранные уротелиальные клетки с увеличенным ядерно-цитоплазматическим соотношением (более 0,5) – *это требуемый диагностический признак* (рис. 6, см.обложку)!

В дополнение необходим один из следующих признаков:

- гиперхромия,
- неравномерный, грубый хроматин,
- неравномерный контур ядра.

Если ядерно-цитоплазматическое соотношение более 0,7 (рис. 7, см.обложку) и присутствуют два дополнительных признака, то вместо заключения «присутствуют атипичные уротелиальные клетки» следует отметить «подозрение на уротелиальную карциному высокой степени злокачественности»!

Важно понимать, что использование этой категории цитологом означает трудности в интерпретации препарата, необходимо более тщательное клиническое наблюдение. Кроме того, у пациентов с уротелиальной карциномой высокой степени злокачественности в анамнезе и отсутствием клинических признаков опухоли возможно наличие недиагностированной опухоли в верхних отделах уринарного тракта. Для таких больных обнаружение в цитологических препаратах клеток HGUC означает высокую вероятность клинического выявления опухоли.

Цитологический диагноз AUC зачастую игнорируется урологами. При этом риск выявления high-grade уротелиальной карциномы при гистологическом исследовании биопсийного материала после цитологического заключения AUC составляет от 8,3 до 37,5% [4] и может зависеть от временного интервала между двумя исследованиями. У пациентов с цитологическим диагнозом AUC при дальнейшем обследовании выявляются самые разнообразные доброкачественные (уролитоаз, цистит, доброкачественная гипертрофия простаты, заболевания почек, сахарный диабет, облучение, внутрипузырная химиотерапия, иммунотерапия БЛЖ, недавний ТУР, катетеризация, инструментальные вмешательства, инвертированная папиллома, гиперплазия, нефрогенная аденома и т.д.) и злокачественные (LGUC, HGUC) патологические состояния. Поскольку главная задача цитологической диагностики – выявление HGUC, то заключение об «атипичности» неприемлемо в отношении таких доброкачественных состояний, как реактивные зонтичные клетки, изменения, связанные с полиомавирусом или другими вирусами, гранулёма, уролитоаз [8]. Таким образом, часть заключений об «атипичных клетках» должна перейти в категорию доброкачественных неопухолевых изменений (NHGUC); однако у небольшой части пациентов с AUC при дальнейшем обследовании выявится HGUC, что требует пересмотра клинической тактики ведения таких больных (см.таблицу).

Категория «Подозрение на наличие уротелиальной карциномы высокой степени злокачественности (SHGUC/AUC-H)». Данная категория означает, что цитопатолог видит единичные клетки с характерными для HGUC признаками, но их количество либо дегенеративные и дистрофические изменения не позволяют утвердительно высказаться о HGUC (рис.8 см.обложку).

Диагноз «подозрение на уротелиальную карциному высокой степени злокачественности» определяется в сохранных клетках уротелия (кроме зонтичных), которые имеют указанные ниже признаки.

Обязательные диагностические критерии SHGUC/AUC-H:

- увеличенное ядерно-цитоплазматическое соотношение более 0,7,
- гиперхромия.

Дополнительные диагностические критерии (по меньшей мере один или два):

- неравномерно распределённый, грубый хроматин,

- неровный контур ядерной мембраны.

На данный момент не накоплено достаточное количество данных, позволяющих определить чёткие морфологические критерии данной категории. По результатам четырёх крупнейших исследований в этой области частота встречаемости диагноза SHGUC или его аналога AUC-H варьирует от 2 до 6% (в среднем 3,2%). Риск обнаружения HGUC при последующем гистологическом исследовании оценивается в 37,8–95%, что зависит от временного интервала между двумя исследованиями. Так, если оценивать данные исследования в промежутке не более 6 мес, то прогностическая значимость цитологического исследования составляет от 37,8 до 79%, в то время как сопоставление SHGUC/AUC-H с гистологией без временных ограничений повышает риск обнаружения HGUC до 80–95% [9–12]. Цитологическое заключение SHGUC/AUC-H требует тщательного клинического наблюдения с цистоскопией и биопсией (см. таблицу).

Категория «Уротелиальная карцинома низкой степени злокачественности (LGUC)». Атипия в клетках уротелиальной карциномы низкой степени злокачественности практически отсутствует, что делает эту категорию трудной для цитологической диагностики. Этот диагноз может быть уверенно поставлен только при гистологическом исследовании, когда в биоптате обнаруживается хорошо определяемый фиброваскулярный сосочек с четкими капиллярами внутри. В цитологических препаратах из свежесобранной мочи и смывов с мочевого пузыря эта находка определяется крайне редко – менее чем в 1% наблюдений. Многими авторами предпринимались попытки определить цитологические критерии LGUC: увеличенные и эксцентрически расположенные ядра, увеличенное ядерно-цитоплазматическое соотношение, слабо базофильная цитоплазма, неровный контур ядерной мембраны, более гранулярный хроматин, относительно увеличенное ядерно-цитоплазматическое соотношение, гомогенная цитоплазма, наличие объёмных 3D-кластеров. Однако чувствительность цитологической диагностики невысока – 45–85% [13–17]. Так, по данным одного из авторов Парижской системы интерпретации уринарной цитопатологии E. Wojciesz [8], чувствительность цитологической диагностики в отношении LGUC составила всего лишь 21–53%. Возможна ли однозначная трактовка LGUC в цитологических препаратах мочи, полученной инструментальным путём? Цитоморфологические особенности LGUC и реактивного уротелия имеют явное сходство, делая точную диагностику практически невозможной. Иногда препарат может быть клеточным и состоять из мономорфных, преимущественно разрозненных клеток, без выраженных признаков атипии (рис. 9, см. обложку). В таких случаях можно высказать подозрение о наличии LGUC. При

цистоскопии эти опухоли хорошо визуализируются.

В целом результаты цитологического исследования мочи рекомендуется сравнивать с результатами цистоскопии мочевого пузыря, особенно при диагнозе «уротелиальная опухоль низкой степени злокачественности». Учитывая трудности, с которыми сталкивается цитолог в выявлении поражений с низким потенциалом злокачественности, рационально использовать дополнительные методы исследования и обработки материала (например, cellblock) [18].

Категория «Уротелиальная опухоль высокой степени злокачественности (HGUC)».

Цитологически HGUC – самая узнаваемая патология уринарного тракта. Данная категория означает, что в препарате представлены опухолевые клетки, полностью удовлетворяющие критериям, характерным для HGUC.

Цитологические критерии уротелиальной карциномы высокой степени злокачественности (HGUC) (рис. 10, см. обложку):

- высокая клеточность препарата,
- наличие скоплений атипичных клеток,
- умеренный или выраженный полиморфизм клеток,
- высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение,
- неравномерный контур мембран ядер,
- эксцентрическая локализация ядра,
- крупные, полиморфные ядра,
- выраженные ядрышки,
- также могут быть представлены признаки плоскоклеточной и железистой дифференцировки.

Позитивная предсказательная значимость и специфичность уринарной цитологии в отношении HGUC высоки. По данным разных авторов специфичность оценивается в диапазоне 78–100% (большинство исследователей докладывают о специфичности более 90%) [10, 12, 19–22]. Следует отметить, что в части работ «подозрение на злокачественность» приравнивалось к наличию злокачественного новообразования. Сопоставление результатов цитологического исследования с последующим гистологическим приводит к тому, что некоторые истинно положительные цитологические заключения переходят в разряд ложноположительных. Тем не менее хорошо известны случаи «скрытого» уротелиального рака, о которых «предупреждает» цитологическое заключение, длительное время не проявляющие себя клинически, выявляемые при более длительном и тщательном наблюдении. Поэтому, во избежание недооценки предсказательной значимости и специфичности уринарной цитологии, заключение HGUC следует расценивать как сигнал к цистоскопии с биопсией любого поражения, подозрительного в отношении интраэпителиальной карциномы, и при необходимости – к исследованию верхних

Категории цитологических заключений, риск озлокачествления опухоли, рекомендуемая тактика ведения пациентов

Категория	Риск озлокачествления, %	Рекомендуемая тактика ведения пациентов
Недиагностический/ неадекватный материал	0–10	Повторная цитология, цистоскопия через 3 мес при нарастании клинической симптоматики
Цитограмма, негативная по HGUC	0–10	Клиническое наблюдение по необходимости
Атипичные уротелиальные клетки	8–35	Клиническое наблюдение по необходимости, применение дополнительных тестов
Подозрение на HGUC	50–90	Более пристальное клиническое наблюдение, цистоскопия, биопсия
LGUC	Около 10	Биопсия для точной оценки степени злокачественности и стадирования опухоли
HGUC	Более 90	Более пристальное клиническое наблюдение, цистоскопия, биопсия, стадирование опухоли
Другие опухоли, первичные и вторичные	Более 90%	Более пристальное клиническое наблюдение, цистоскопия, биопсия, стадирование опухоли

Примечание. АД – артериальное давление; * – $p < 0,05$.

отделов мочевыводящего тракта. Подобное цитологическое заключение требует взятия биопсии для определения глубины инвазии и стадирования опухоли (см. таблицу).

Категория «Другие злокачественные опухоли, первичные и вторичные».

К первичным злокачественным новообразованиям в первую очередь относятся плоскоклеточная карцинома (ПКР), аденокарцинома (АК), мелкоклеточный рак (МКР) (рис.11, см. обложку).

Плоскоклеточный рак – вторая по частоте злокачественная опухоль уринарного тракта (2–5%), составляющая 10–20% всех мышечно-инвазивных злокачественных новообразований (ЗНО) мочевого пузыря (МП) [23]. Развитие ПКР в МП ассоциируют с шистосомозом (или шистосоматозом, возбудитель – *Shistosomahematobium*), в эндемичных регионах ассоциированный с шистосомой ПКР составляет 25–30% ЗНО МП. Высокодифференцированные и умеренно дифференцированные карциномы имеют характерную цитоморфологическую картину и хорошо диагностируются в цитологических препаратах, а вот неороговевающий ПКР требует дифференциации с HGUC, низкодифференцированной АК [23, 24].

АК МП – третья по распространенности из первичных ЗНО уринарного тракта (0,5–2,5%), является очень редким заболеванием и составляет менее 2% всех случаев рака МП [23, 25–28]. Первичная АК обнаруживается реже, чем метастатическая [29]. Первичная АК МП представлена в двух основных формах: кишечного типа, более частая, и перстневидноклеточного типа, очень редкая. Смешанная уротелиальная карцинома с железистым компонентом встречается чаще, чем первичная АК.

В МП развиваются два типа **нейроэндокринных опухолей (НЭО)** – высокодифференцированные опухоли (типа карциноида) и нейроэндокринные карциномы, оба варианта могут вовлекать почки, простату и МП, морфологически и иммуногистохимически сходны с аналогичными опухолями лёгких и желудочно-кишечного тракта. Крупноклеточный и мелкоклеточный рак (МКРМП) составляют менее 1% ЗНО этой локализации, последний встречается чаще [30].

Первичные неэпителиальные опухоли. Неуротелиальные опухоли МП составляют менее 5% всех опухолей этой локализации, цитологически выявляются редко [31, 32].

Саркома. К ЗНО неэпителиальной природы в МП относят саркоматоидный вариант уротелиальной карциномы, лейомиосаркому, ангиосаркому, рабдомиосаркому, неклассифицированную саркому. Саркомы МП отличаются очень агрессивным клиническим течением с выраженной гематурией. Цитологически в отношении сарком настораживают веретенообразные клетки, однако по образцам мочи зачастую очень сложно поставить точный морфологический диагноз, что требует проведения иммуноцитохимии, либо иммуногистохимии на более полном материале [33].

Гемобласты. Цитологически выявляют лимфому и плазмцитому (множественная миелома) [34, 35]. Их следует дифференцировать с лимфомоподобной и плазмцитойдной уротелиальной карциномой, для этого прибегают к проточной цитометрии, биопсии.

Меланома. Первичная меланома в МП встречается крайне редко, чаще это метастатическое поражение, клинически может сопровождаться меланурией, меланозом [36]. Цитологические характеристики типичные.

Метастазы в мочевой пузырь редки, их следует дифференцировать с первичными не-уротелиальными (non-UC) опухолями МП [37]. Вторичные злокачественные опухоли составляют менее 10% опухолей МП, большая часть из которых – это прямая инвазия из простаты, шейки матки, тела матки или кишечника тракта.

Наиболее частыми метастазами являются метастазы меланомы, рака желудка, молочной железы, почки и лёгкого. Морфологически отличить non-UC или метастатическую

опухоль от уротелиальной карциномы бывает крайне трудно (описываются немногочисленные подобные случаи), а подчас и невозможно, одной из причин этого может быть низкая дифференцировка опухоли. В таких случаях часто требуется хирургическое иссечение опухоли для постановки уверенного диагноза. Первичные неэпителиальные опухоли МП клинически текут агрессивно и обнаруживаются, как правило, на запущенной стадии, общая выживаемость низкая [38].

Категории цитологических заключений, риск озлокачествления опухоли, рекомендуемая тактика ведения пациентов

Выводы. Цитологическое исследование при уринарной патологии остаётся значимым методом диагностики, позволяя выработать оптимальную тактику ведения больных с уротелиальным раком. Неинвазивность процедуры получения материала, а также возможность мониторингирования пациентов с онкологическим анамнезом – это неоспоримые преимущества цитологического метода в сравнении с гистологическим. Даже при относительно невысокой диагностической чувствительности практически стопроцентная специфичность цитологического исследования исключает наличие HGUC.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–38 см. REFERENCES)

1. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. Давыдов М.И., Аксель Е.М., ред. М.: Издательская группа РОНЦ; 2014.
2. Пугачев В.В., Горбань Н.А., Сафиуллин К.Н., Карякин О.Б. Иммуногистохимическое исследование в оценке степени злокачественности немusечно-инвазивного папиллярного уротелиального рака мочевого пузыря. *Онкоурология*. 2014; 3: 49-53.

REFERENCES

1. Statistics of malignant tumors in Russia and CIS countries in 2012. [Statistika zlokachestvennykh novoobrazovaniy v Rossii i stranakh SNG v 2012 godu]. Davydov M.I., Aksel E.M., eds. Moscow: Izdatel'skaya gruppa RONTs; 2014. (in Russian)
2. Pugachev V.V., Gorban N.A., Safullin K.N., Karyakin O.B. Immunohistochemical study in the grading of non-muscle-invasive papillary urothelial carcinoma of the bladder. *Oncourologiya*. 2014; 3: 49-53. (in Russian)
3. Amin M.B., Smith S.C., Reuter V.E. et al. Update for the practicing pathologist: The International Consultation On Urologic Disease-European association of urology consultation on bladder cancer. *Modern Pathology*. 2014; 1: 19.
4. Rosenthal D.L., Wojcik E.M., Kurtycz D.F.I.. The Paris System for Reporting Urinary Cytology. *Springer*; 2016.
5. Galed-Placed I., Valbuena-Ruvira L. Decoy cells and malignant cells coexisting in the urine from a transplant recipient with BK virus nephropathy and bladder adenocarcinoma. *Diagn Cytopathol*. 2011; 39:933-7.
6. Geetha D., Tong B.C., Racusen L. et al. Bladder carcinoma in a transplant recipient: evidence to implicate the BK human polyomavirus as a causal transforming agent. *Transplantation*. 2002; 73:1933-6.
7. Renshaw A.A. Subclassifying atypical urinary cytology specimens. *Cancer*. 2000; 90: 222-9.
8. Wojcik E.M. What should not be reported as atypia in urine cytology. *J. Am. Soc. Cytopathology*. 2015;4:30-6.
9. Piaton E., Decaussin-Petrucci M., Mege-Lechevallier F. et al. Diagnostic terminology for urinary cytology reports including the new subcategories 'atypical urothelial cells of undetermined significance' (AUC-US) and 'cannot exclude high grade' (AUC-H). *Cytopathology*. 2014; 25:27-38.
10. Sternberg I., Rona R., Olsfanger S. et al. The clinical significance of class III (suspicious) urine cytology. *Cytopathology*. 2011; 22: 329-33.
11. Vanden Bussche C.J., Sathiyamoorthy S., Owens C.L. et al. The Johns Hopkins Hospital template for urologic cytology samples: parts II and III: improving the predictability of indeterminate results in urinary cytologic samples: an outcomes and cytomorphologic study. *Cancer Cytopathol*. 2013;121: 21-8.
12. Ton Nu T.N., Kassouf W., Ahmadi-Kaliji B. et al. The value of the "suspicious for urothelial carcinoma" cytology category: a correlative study of 4 years including 337 patients. *Cancer Cytopathol*. 2014;122: 796-803.
13. Murphy W.M., Soloway M.S., Jukkola A.F. et al. Urinary cytology and bladder cancer. The cellular features of transitional cell neoplasms. *Cancer*. 1984; 53: 1555-65.

14. Raab S.S., Lenel J.C., Cohen M.B. Low grade transitional cell carcinoma of the bladder. Cytologic diagnosis by key features as identified by logistic regression analysis. *Cancer*. 1994; Sep. 1; 74 (5): 1621-6.
15. Hughes J. H., Raab S. S., Cohen M. B. The cytologic diagnosis of low-grade transitional cell carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000; 114: 59-67.
16. Xin W., Raab S. S., Michael C. W. Low-grade urothelial carcinoma: reappraisal of the cytologic criteria on ThinPrep. *Diagn. Cytopathol.* 2003; 29 (3):125-9.
17. Mai K. T., Ball C. G., Kos Z. et al. Three-dimensional cell groups with disordered nuclei and cellular discohesion (3DDD) are associated with high sensitivity and specificity for cystoscopic urine cytopathological diagnosis of low-grade urothelial neoplasia. *Diagn. Cytopathol.* 2014;42(7):555-63.
18. Nathan N.A., Narayan E., Smith M.M., Horn M.J. Cell block cytology. Improved preparation and its efficacy in diagnostic cytology. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000;114: 599-606.
19. Reid M.D., Osunkoya A.O., Siddiqui M.T., Looney S.W. Accuracy of grading of urothelial carcinoma on urine cytology: an analysis of inter-observer and intraobserver agreement. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2012; 5: 882-91.
20. Raab S.S., Grzybicki D.M., Vrbin C.M., Geisinger K.R. Urine cytology discrepancies: frequency, causes, and outcomes. *Am.J. Clin. Pathol.* 2007;127: 946-53.
21. Rosenthal D.L., Vandenbussche C.J., Burroughs F.H. et al. The Johns Hopkins Hospital template for urologic cytology samples: part I-creating the template. *Cancer Cytopathol.* 2013;121:15-20.
22. Ubago J.M., Mehta V. Wojcik E.M., Barkan G.A. Evaluation of atypical urine cytology progression to malignancy. *Cancer Cytopathol.* 2013;121: 387- 91.
23. Koss L.G., Hoda R.S. Koss's cytology of the urinary tract with histopathologic correlations. *New York: Springer Press*; 2012.
24. Hoda R.S. Non-gynecologic cytology on liquid-based preparations: 3 morphologic review of facts and artifacts. *Diagn. Cytopathol.* 2007; 35:621-34.
25. Khaled H. Schistosomiasis and cancer in Egypt review. *J. Adv. Res.* 2013; 4: 461- 6.
26. Hattori M., Nishimura Y., Toyonaga M. et al. Cytological significance of abnormal squamous cells in urinary cytology. *Diagn. Cytopathol.* 2012;40: 798-803.
27. Gulmann C., Paner G.P., Parakh R.S. et al. Immunohistochemical profile to distinguish urothelial from squamous differentiation in carcinomas of urothelial tract. *Hum. Pathol.* 2013; 44: 164-72.
28. Zhong M., Gersbach E., Rohan S.M., Yang X.J. Primary adenocarcinoma of the urinary bladder: differential diagnosis and clinical relevance. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2013; 137: 371-81.
29. Bardales R.H., Pitman M.B., Stanley M.W. et al. Urine cytology of primary and secondary urinary bladder adenocarcinoma. *Cancer*. 1998; 34: 335-43.
30. Ciesla M.C., Guidos B.J., Selvaggi S.M. Cytomorphology of small-cell (neuroendocrine) carcinoma on ThinPrep cytology as compared to conventional smears. *Diagn. Cytopathol.* 2001; 24: 46-52.
31. Dahm P., Gschwend J.E. Malignant non-urothelial neoplasms of the urinary bladder: a review. *Eur. Urol.* 2003; 44: 672-81.
32. Chalasani V., Chin J.L., Izawa J.I. Histologic variants of urothelial bladder cancer and nonurothelial histology in bladder cancer. *Can. Urol. Assoc. J.* 2009; 3(6): 193-8.
33. Westfall D.E., Folpe A.L., Paner G.P. et al. Utility of a comprehensive immunohistochemical panel in the differential diagnosis of spindle cell lesions of the urinary bladder. *Am.J.Surg.Pathol.* 2009; 33: 99-105.
34. Cheson B.D., Schumann J.L., Schumann G.B. Urinary cytodiagnostic abnormalities in 50 patients with non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer*. 1984; 54: 1914-9.
35. Jimenez-Hernandez M., Lopez-Guillermo A., Cobo F. et al. Bladder involvement of diffuse large B-cell lymphoma diagnosed by a cytological study of the urine. *Leuk. Lymphoma*. 2002; 43: 187-9.
36. Khalbuss W.E., Hossain M., Elhossainy A. Primary malignant melanoma of the urinary bladder diagnosed by urine cytology: a case report. *Acta Cytol.* 2001;45:631-5.
37. Xiao G.Q., Chow J., Unger P.D. Metastatic tumors to the urinary bladder. Clinicopathologic study of 11 cases. *Int.J.Surg.Pathol.* 2012; 20: 342-8.
38. Abol-Enein H., Kava B.R., Carmack A.J. Nonurothelial cancer of the bladder. *Urology*. 2007; 69 (1): 93-104.

Поступила
Принята к печати

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.61-089.843-085.276.2.015.22:615.831]-078.33

Федулкина В.А.¹, Кофиади И.А.², Ватазин А.В.¹, Кильдюшевский А.В.¹, Чуксина Ю.Ю.¹, Зилькарнаев А.Б.¹

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА АКТИВАЦИЮ И ИНГИБИРОВАНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ФОТОХИМИОТЕРАПИИ

¹ГБУЗ Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», 129110, Москва;

²ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115478, Москва, Россия

Разработаны и апробированы тест-системы для оценки уровня экспрессии генов иммунной системы, ответственных за активацию и ингибирование Т-клеточного ответа, у реципиентов почечного трансплантата при проведении экстракорпоральной фотохимиотерапии.

Ключевые слова: РНК; экспрессия генов; гены иммунной системы; обратная транскрипция; экстракорпоральная фотохимиотерапия.

Для цитирования: Федулкина В.А., Кофиади И.А., Ватазин А.В., Кильдюшевский А.В., Чуксина Ю.Ю., Зилькарнаев А.Б. Разработка метода оценки уровня экспрессии генов, ответственных за активацию и ингибирование т-клеточного ответа у реципиентов почечного трансплантата при проведении экстракорпоральной фотохимиотерапии. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (3): 173-178. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-173-178>

Для корреспонденции: Федулкина Вероника Андреевна, канд.мед.наук, ст.науч.сотр. хирургического отд-ния трансплантологии и диализа; e-mail: v.fedulkina@mail.ru

Fedulkina V.A.¹, Kofidi I.A.², Vatazin A.V.¹, Kildyushevsky A.V.¹, Chuksina Yu.Yu.¹, Zulkarnaev A.B.¹

THE DEVELOPMENT OF TECHNIQUE OF EVALUATION OF GENES' EXPRESSION LEVEL RESPONSIBLE FOR ACTIVATION AND INHIBITION OF T-CELL RESPONSE IN RECIPIENTS OF RENAL TRANSPLANT UNDER APPLICATION OF EXTRA-CORPORAL PHOTOCHEMOTHERAPY

¹The State Budget Institution of Health Care of the Moscow Oblast "The M.F. Vladimirskiy Moscow Oblast Research Clinical Institute", 1290110, Moscow, Russia

²The Federal State Budget Scientific Institution "The State Scientific Center "The Institute of Immunology" of the Federal Medical Biological Agency of Russia, 115478, Moscow, Russia

The article presents the developed and approved test-systems for evaluation of the level of expression of immune system responsible activation and inhibition of T-cell response in recipients of renal transplant under application of extra-corporal photochemotherapy.

Key words: RNA; gene expression; genes of immune system; reverse transcription; extra-corporal photochemotherapy.

For citation: Fedulkina V.A., Kofidi I.A., Vatazin A.V., Kildyushevsky A.V., Chuksina Yu.Yu., Zulkarnaev A.B. The development of technique of evaluation of genes' expression level responsible for activation and inhibition of T-cell response in recipients of renal transplant under application of extra-corporal photochemotherapy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic)* 2018; 63(3): 173-178. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-173-178>

For correspondence: Fedulkina V.A., candidate of medical sciences, senior researcher of the Surgical Department of Transplantation and dialysis of the State Budget Institution of Health Care of the Moscow Oblast "The M.F. Vladimirskiy Moscow Oblast Research Clinical Institute", e-mail: v.fedulkina@mail.ru

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

Acknowledgment. The study was supported by the grant of the The Federal State Budget Scientific Institution "The Russian foundation of fundamental Studies" and the Moscow government, project № 17-44-500307 r.a.

Received 23.10.2017
Accepted 08.11.2017

Введение. Внедрение новых методов предупреждения реакции отторжения трансплантата является актуальным направлением клинической иммунологии [1]. В связи с этим востребованы технологии повышения эффективности методов фармакологической поддержки трансплантата, реализации персонального подхода к терапии реципиентов и поиска новых путей индукции толерантности к пересаживаемым органам и тканям [2].

Одной из перспективных технологий в области индукции толерантности к трансплантату является экстракорпоральная фотохимиотерапия (ЭФХТ), основанная на электромагнитном воздействии на клетки реципиента [3]. Изначально успех ЭФХТ был связан с лечением Т-клеточной лимфомы кожи, затем показал эффективность при ингибировании хронического и острого отторжения в клинике трансплантации сердца, лёгких, печени и почек [4–7].

Несмотря на успешное клиническое применение метода ЭФХТ в клинике трансплантации, биохимические пути, объясняющие механизм индукции толерантности, до настоящего времени не выяснены. Это ограничивает клиническое применение метода ЭФХТ, в частности, в такой важной области, как трансплантация почки. Установление механизмов индукции толерантности позволит повысить эффективность метода, а также учесть индивидуальные особенности пациента при назначении терапии. В связи с этим востребованы исследования качественной и количественной характеристики эффекторных молекул, предположительно задействованных в механизме регуляции иммунного ответа при применении ЭФХТ.

В связи с вышесказанным целью нашего исследования является установление особенностей экспрессии ключевых генов, вовлечённых в регуляцию иммунного ответа до и после проведения ЭФХТ. Целью же данного этапа работы стала разработка средств диагностики ключевых молекул, вовлечённых в процессы активации и ингибирования Т-клеточного ответа, и оценка их аналитических параметров.

Материал и методы. Гены для включения в исследование были подобраны таким образом, чтобы охватить ключевые функциональные этапы, вовлечённые в реализацию иммунного ответа, в том числе при развитии реакции отторжения трансплантата и/или реакции трансплантат против хозяина (РТПХ): *IL1* - провоспалительное действие, активация

Т-клеточного ответа, дифференцировка Th17, передача сигнала по пути MAPK, TNF и NFκB; *IL2* - провоспалительное действие, активация Т-клеточного ответа, дифференцировка Th1, Th2, Th17, передача сигнала по пути PI3K и JAK-STAT; *IFNG* - провоспалительное действие, активация клеточного иммунитета, дифференцировка Th1, Th2, Th17, передача сигнала по пути HIF-1 и TGFβ; *TNFA* - провоспалительное действие, передача сигнала по MAPK, NFκB, mTOR, TNF, TGFβ пути, принимает участие в процессинге и презентации антигенов. Кроме того, в исследование взяты гены *CD28*, *CTLA4* и *PDL1*, кодирующие костимуляторные рецепторы, регулирующие клеточную адгезию, осуществляющие взаимодействие с рецепторами антигенпрезентирующих клеток и принимающие участие в передаче сигнала через рецептор Т-клеток.

Проведение анализа осуществляется в два этапа:

- выделение РНК,

- постановка полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени.

Выделение РНК. В работе были использованы образцы крови сотрудников-добровольцев отдела иммуногенетики ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (условно здоровые люди без известной истории иммунозависимых заболеваний и трансплантации органов, $n = 9$), образцы крови, полученные из отделения трансплантации ГБУЗ МО МОНИКИ (пациенты с почечным трансплантатом, $n = 6$) и клинического отделения ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (пациенты с диагнозом общая врожденная иммунная недостаточность - ОВИН, $n = 7$), собранные с соблюдением процедуры информированного согласия.

Для выделения РНК использовали набор реагентов Пробанк (ЗАО «НПФ ДНК-Технология») и реагент Trizol (Qiagen, США). Для выделения ДНК использовали колонки Nucleospin (MachereyNagel, Германия). Исползованные в работе методы очистки нуклеиновых кислот подходят для самых разнообразных биологических образцов: периферическая кровь, слюна, мокрота, молоко, моча, сперма, секрет предстательной железы, ликвор и др. Полученный препарат может быть использован для последующего анализа методом ОТ-ПЦР.

Постановка ОТ-ПЦР в реальном времени. Для оценки профиля экспрессии генов была использована технология

относительного анализа количества мРНК в образцах с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Поскольку на низких температурах возможно образование димеров праймеров и неспецифических продуктов амплификации при постановке ПЦР была использована технология «горячего» старта, который обеспечивается использованием модифицированной Taq-полимеразы с активным центром, инактивированной молекулой антитела. При достижении температур, оптимальных для отжига праймеров, происходит диссоциация комплекса фермент-антитело и активный центр освобождается (ООО «НПФ ДНК-Технология, Россия»).

В работе использовали вариант ПЦР, основанный на регистрации продуктов ПЦР в режиме реального времени. В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку (репортёр) и гаситель флуоресценции (акцептор). Находясь в пределах одного ДНК-зонда, молекула гасителя эффективно ингибирует флуоресценцию репортёра. При синтезе новой цепи Taq-полимеразы, обладающей 5'-экзонуклеазной активностью, разрушает ДНК-зонд, при этом действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. По мере накопления продуктов амплификации количество разрушенных зондов увеличивается, что приводит к пропорциональному увеличению регистрируемого сигнала. Каждый образец тестировали в двух повторностях.

Для корректной оценки уровня экспрессии исследуемых генов принципиальное значение имеет выбор нормировочных генов. Следует учитывать, что гены, выбранные в качестве нормировочных, могут по-разному экспрессироваться в разных тканях или даже в пределах одной ткани. Если учесть, что сам метод также имеет ошибку, представляется целесообразным проведение нормировки по нескольким генам. В данной работе для этих целей были выбраны гены «домашнего хозяйства» гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (*HPRT1*) и ТАТА-связывающего протеина (*TBP*), применявшиеся в практике анализа экспрессии генов и ранее [8].

При оценке аналитических параметров тест-систем учитывали эффективность амплификации. Стандартные прямые были получены при построении графиков зависимости индикаторных циклов исследуемых мишеней (Cp) от относительной концентрации образцов, рассчитанной в соответствии с выполненными разведениями. В основе анализа лежит метод сравнения индикаторных циклов (показатель Δ Cp). Экспрессия мРНК измеряется в относительных единицах и отражает соотношение уровня представленности транскриптов.

В реакции использовали следующие ферменты: ревертазу (реакция ОТ) и Taq-полимеразу в количестве 1 и 2,5 ед. активности на реакцию соответственно.

Использованные в работе алгоритмы и базы данных. При формировании перечня маркёров пользовались базами OMIM (<https://www.omim.org>), KEGG (<http://www.kegg.jp>), STRING (<http://string-db.org>) и PDB (<http://www.rcsb.org>).

Подбор праймеров и зондов осуществляли путём анализа последовательностей ДНК и мРНК базы данных NCBI. При подборе праймеров и зондов учитывали структурную организацию генов, кодирующих мРНК, чтобы исключить отжиг на геномной ДНК; наличие псевдогенов; варианты альтернативного сплайсинга.

При построении множественных выравниваний (multiple alignment) пользовались алгоритмом ClustalW сервера Европейского института биоинформатики (www.ebi.ac.uk). Олигонуклеотиды проектировали с помощью программно-

го обеспечения Oligo 6.0. Программа позволяет анализировать последовательность, рассчитывать температуру отжига праймеров и зондов, оценивать стабильность формирующегося дуплекса праймер-мишень, формирование тугоплавких шпилек и димеров праймеров.

Для оценки вероятности формирования и стабильности вторичных структур на выбранных участках генома пользовались алгоритмом Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/>). Биоинформационный анализ структуры генов, включающий оценку вероятности формирования вторичных структур, способных повлиять на эффективность отжига разрабатываемых олигонуклеотидов, позволил оценить эффективность и специфичность разрабатываемых тест-систем ещё на этапе разработки.

Первичное накопление и обработку данных проводили с помощью программы MSOfficeExcel. В ходе работы вычисляли параметры описательной статистики (среднее арифметическое, стандартное отклонение, дисперсию), используя программное обеспечение SPSS17.0.

Результаты и обсуждение. ЭФХТ часто рассматривается в качестве альтернативы фармакологическим методам подавления иммунного ответа. С молекулярной точки зрения индукция толерантности обусловлена тем, что в процессе ЭФХТ молекула фотоактивированного производного псоралена – 8-метоксипсоралена (8-MOP), обладающая высокой авидностью к пиримидиновым основаниям, интеркалирует в молекулы нуклеиновых кислот. В результате воздействия электромагнитного излучения в ультрафиолетовом диапазоне между ними образуются перекрестные связи, приводящие к нарушению синтеза белков и апоптозу клеток [9], причём наиболее подвержены этому воздействию лимфоциты, а моноциты, напротив, демонстрируют устойчивость. Это приводит к стимуляции субпопуляций дендритных клеток, приобретающих толерогенный фенотип, изменению профиля экспрессии цитокинов и переключению иммунного ответа с Th1 на Th2 путь [10].

Немногочисленные публикации в мировой литературе, посвящённые анализу эффективности метода ЭФХТ в комплексной терапии острого отторжения почечного аллотрансплантата, свидетельствуют о его положительном воздействии на купирование клинических и иммунологических симптомов отторжения, что создаёт благоприятные условия для редукции иммуносупрессивной терапии и снижения риска возникновения инфекционных осложнений. Комбинированное применение ЭФХТ со стандартной иммуносупрессивной терапией улучшило показатели раннего посттрансплантационного периода, снизив частоту реакции острого отторжения, инфекционных осложнений и улучшив показатели ранней функции аллотрансплантата [11].

Недавние клинические исследования продемонстрировали, что ЭФХТ вызывает выработку антигенспецифических регуляторных Т-клеток, в том числе CD4+, CD25+, eFoxP3+, Т-клеток и IL-10, продуцирующих Т-клеток, которые могут иметь значение в реализации второго пути индукции толерогенных антигенпредставляющих клеток [12].

Исследования последних 10 лет показали, что активация Т-клеток, равно как и индукция толерантности, регулируется соответствующими «вторичными» стимулирующими и ингибирующими сигналами [13]. Одними из ключевых молекул, ответственных за активацию и анергию CD4+ Т-клеток, являются CD28 и CTLA4. Блокирование этих молекул приводит к индукции толерантности к трансплантированному органу [14]. По всей видимости, подавление экспрессии CD28 приводит к переключению взаимодействия экспрессирующихся на поверхности антигенпрезентирующих клеток молекул класса B7 (CD80/86) на CTLA-4 и/или PD-L1 [15]. Конкурентное ингибирование CD80/86 ограничивает Т-клеточную активацию, терминирует лимфоцитарный ответ, приводит к подавлению экспрессии провоспалительных цитокинов

(TNF α , IL1) и способствует индукции иммунологической толерантности к презентуемым антигенам.

Цитокины представляют собой вторую важную группу медиаторов иммунного ответа. Они продуцируются клетками различных типов и участвуют в активации клеточного, гуморального ответа и в формировании иммунологической памяти. Помимо реализации иммунного ответа, система цитокинов участвует и в регуляции ряда других физиологических функций. Более того, она является наиболее универсальной системой регуляции, поскольку цитокины могут синтезироваться практически всеми ядросодержащими клетками организма и способны проявлять биологическую активность как дистанционно (в растворимой форме), так и при межклеточном контакте (в мембранной форме).

Сотрудниками ГБУЗ МО МОНИКИ и ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России разработаны тест-системы для оценки уровня экспрессии генов *CD28*, *CTLA4*, *PDL1*, *IL1B*, *IL2*, *IFNG*, *TNFA*, вовлечённых в регуляцию иммунного ответа до и после проведения ЭФХТ, в том числе две нормировочные тест-системы для оценки уровня экспрессии генов «домашнего хозяйства» *HPRT1* и *TBP*.

В ходе этой части работы в рамках разработки тест-систем решались следующие задачи: оценка стабильности экспрессии нормировочных генов, оценка специфичности и чувствительности метода, определение эффективности амплификации и ошибки метода. Оценку осуществляли в соответствии с рекомендациями по проведению анализа уровня экспрессии генов [8].

Оценка стабильности экспрессии нормировочных генов. Оценку стабильности экспрессии нормировочных генов проводили методом попарного сравнения значений ΔC_p , вычисленных по формуле:

$$\Delta C_p = C_{p1} - C_{p2},$$

где C_p – значение характеристического цикла амплификации, автоматически определяемое детектирующим термощиклером, C_{p1} и C_{p2} – значения индикаторных циклов для генов 1 и 2.

Если показатель ΔC_p между двумя генами постоянен в различных образцах при изменяющихся условиях эксперимента, то оба гена стабильно экспрессируются в данных образцах или имеют общую регуляцию экспрессии. Если для показателя ΔC_p характерна дисперсия, выходящая за рамки погрешности метода, то уровень экспрессии одного или обоих генов нельзя считать стабильным.

В этом случае при сравнении разных образцов наилучшими нормировочными генами можно считать:

- пары, имеющие одинаковые средние значения (M) в разных группах пациентов;
- пары, дающие наименьшее среднеквадратичное отклонение σ .

Уровень экспрессии нормировочных генов был определён с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Была рассмотрена пара нормировочных генов *TBP* и *HPRT1* в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК), полученных от разных групп пациентов из ГБУЗ МО МОНИКИ и ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России. Эксперименты проводились на образцах РНК, выделенных разными методами: реагентом Trizol (Qiagen, США) и набором реагентов Проба-НК (ООО «НПФ ДНК-Технология»). В ходе исследования установлено, что гены *TBP* и *HPRT1* экспрессируются на постоянном уровне во всех образцах периферической крови вне зависимости от группы пациентов (наличия/отсутствия иммунозависимой патологии или трансплантированного органа) и условий эксперимента и дают небольшое среднее квадратичное отклонение (в среднем 0,6) (табл. 1). Следовательно, их можно считать референсной парой, подходящей для проведения клинического исследования.

Аналитические параметры тест-систем. Специфичность. На начальном этапе специфичность тест-системы

Таблица 1

Сравнение уровня экспрессии нормировочных генов в группах пациентов

Группа	TBP-HPRT1, $M \pm \sigma$	
	МКПК/выделение Trizol	МКПК/выделение Проба-НК
РНК от условно здоровых пациентов	1,4 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,6
РНК от пациентов с почечным трансплантатом	1,5 $\pm$ 0,6	2,8 $\pm$ 0,7
РНК от пациентов с диагнозом ОВИН*	1,2 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,6

Примечание. * – ОВИН – общая врожденная иммунная недостаточность.

оценивалась бионформационным методом путём сравнения последовательности разработанных праймеров против базы данных геномных последовательностей GenBank и проверки их на температурную стабильность и температуру отжига с помощью программного обеспечения Oligo 6.0. По результатам первичного анализа ни один из праймеров не обладал достаточной степенью гомологии с геномом человека, для того чтобы привести к синтезу неспецифической мишени на расчётной температуре отжига.

Второй этап включал оценку возможности неспецифического отжига разработанных праймеров на геномную ДНК человека. Изначально при разработке тест-систем возможность неспецифического отжига праймеров ограничивалась дизайном ОТ-праймеров. По возможности в ДНК сразу за праймером находился интрон, к которому разработанные праймеры обладали пониженной специфичностью. В эксперименте специфичность тест-систем подтверждалась на референс-образцах ДНК, выделенных на колонках Macherey-Nagel и обработанных ферментом рибонуклеазой (NEB, США) в течение 20 мин при 37°C для разрушения остатков РНК. В результате анализа и в эксперименте на четырёх образцах ДНК установлено, что разработанные системы не дают положительного результата на геномной ДНК человека.

Чувствительность. Аналитическая чувствительность тест-системы – это минимальное количество матрицы в образце, которое может быть определено при использовании данного метода. Оценку аналитической чувствительности проводили путём разведений образца с определённой концентрацией кДНК мишени (определение концентрации проводили с помощью спектрофотометра Nanodrop, Thermofish-

Таблица 2

Аналитические характеристики тест-систем

Ген	Аналитическая чувствительность (копий кДНК на реакцию)	Коэффициент вариации C_v , %	Эффективность амплификации, %
<i>CD28</i>	6,8	18	97–98
<i>CTLA4</i>	3,0	6	95–97
<i>PDL1</i>	24,6	11	95–96
<i>IL1B</i>	3,2	4	97–98
<i>IL2</i>	16,4	12	97–98
<i>IFNG</i>	8,3	2	95–98
<i>TNFA</i>	6,0	6	95–96
<i>HPRT1</i>	4,5	8	95–96
<i>TBP</i>	11,0	14	97–98

ет, США), который титровали с шагом в 5 раз. В соответствии с выполненными разведениями определяли концентрацию матрицы, при которой во всех амплификационных пробирках при восьми повторах получен положительный результат. Определённая таким образом концентрация рассматривалась как аналитическая чувствительность метода. Аналитическая чувствительность составила 5–25 копий кДНК на амплификационную пробирку (табл. 2).

Эффективность амплификации. Эффективность амплификации (E) – величина, характеризующая увеличение количества специфичных продуктов реакции на каждом цикле. Теоретически на каждом цикле происходит удвоение ДНК, т.е. $E = 2$. На практике эффективность амплификации определяется экспериментально по формуле:

$$E = 1^{-(1/\text{slope})}$$

где slope – разность в значениях C_p при 10-кратном разведении образца (коэффициент уравнения линейной зависимости C_p от десятичного логарифма концентрации матрицы).

E может быть также выражена в процентах по формуле:

$$E (\%) = (10^{-(1/\text{slope})} - 1) \cdot 100\%.$$

Исследование было проведено в серии экспериментов. Для определения эффективности амплификации готовили серии 10-кратных разведений кДНК, проводили амплификацию и получали калибровочные «стандартные» кривые с помощью программного обеспечения DTmaster (ООО «НПФ ДНК-Технология»). Эффективность амплификации и для разработанных тест-систем составила 95–98% (см. табл. 2).

Ошибка метода. Ошибку относительной экспрессии генов определяли в пределах одного эксперимента при физиологически нормальной концентрации цитокинов в плазме крови условно здорового пациента [21]. Исследование одного образца было выполнено многократно ($n = 10$), начиная со стадии выделения лимфоцитов.

Уровень экспрессии мРНК исследуемого гена X относительно мРНК нормировочного гена N определяли по формуле:

$$[X]/[N] = E_N^{CpN} / E_X^{CpX},$$

где E_N , E_X – эффективности амплификации нормировочного и исследуемого генов;

CpN , CpX – значения пороговых циклов реакции амплификации нормировочного и исследуемого генов.

Для полученных значений уровня экспрессии мРНК цитокинов определяли коэффициент вариации (Cv). Значения коэффициентов вариации нормированного по гену *HPRT1* значения уровня экспрессии цитокинов составили от 2 до 18% (см. табл. 2).

Таким образом, в ходе исследования разработаны и охарактеризованы системы для определения количества мРНК следующих генов иммунной системы: *CD28*, *CTLA4*, *PDL1*, *IL1B*, *IL2*, *IFNG*, *TNFA*. Дальнейший количественный анализ экспрессии костимуляторных молекул *CD28*, *CTLA4*, *PD-L1*, а также генов цитокинов *TNFA*, *IL1*, *IL2*, *IFNγ* до и после проведения процедуры ЭФХТ позволит установить пути, а также механизмы индукции толерантности к почечному трансплантату при помощи физико-химических методов воздействия на рецепторный аппарат иммунокомпетентных клеток крови.

Заключение. Проведённая работа является первым этапом исследований, запланированных в рамках финансирования по Гранту Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский фонд фундаментальных исследований» и Правительства Московской области, проект № 17-44-500307 р_а. В ходе исследования сформирован перечень генетических мишеней, перспективных при оценке экспрессии ключевых генов, вовлечённых в регуляцию иммунного ответа до и после проведения ЭФХТ; разработаны методы оценки уровня экспрессии транскрипционных маркеров, включённых в исследование; разработаны тест-системы анализа профиля экспрессии генов иммунной системы, ответственных за активацию и ингибирование Т-клеточного ответа; проведена

оптимизация параметров реакции ОТ-ПЦР в реальном времени для оценки количества транскриптов генов иммунной системы, включённых в исследование.

В результате апробации тест-систем было установлено, что аналитические параметры разработанных тест-систем позволяют использовать их в дальнейшем при оценке уровня экспрессии генов, включённых в исследование.

Количественный анализ экспрессии костимуляторных молекул *CD28*, *CTLA4*, *PD-L1*, а также генов цитокинов *TNFA*, *IL1*, *IL2*, *IFNγ* до и после проведения процедуры ЭФХТ позволит установить пути, а также механизмы индукции толерантности к почечному трансплантату при помощи физико-химических методов воздействия на рецепторный аппарат иммунокомпетентных клеток крови. Сопряжённое исследование механизмов и клинической эффективности приведёт в результате к определению лабораторных критериев безопасного снижения медикаментозной иммуносупрессивной нагрузки, к которому на данный момент стремятся все трансплантологи мира.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование поддержано Грантом Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский фонд фундаментальных исследований» и Правительства Московской области, проект № 17-44-500307 р_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев Л. П., Хаитов Р. М., Долбин А. Г., Болдырева М. Н., Алесеева П. Л., Трофимов Д. Ю. и др. Иммуногенетика человека и клиническая трансплантация органов в России. *Иммунология*. 2015;36(2):76-89.
2. Родионов А. А., Кофиади И. А., Абрамов В. Ю., Алексеев Л. П. Новый метод измерения уровня вкДНК в диагностике криза отторжения трансплантата. *Иммунология сегодня: традиции и инновации*. 2016:13-4.
3. Кильдюшевский А. В., Федулкина В. А., Фомина О. А., Фомин А. М. Применение экстракорпоральной фотохимиотерапии при лимфомах кожи и трансплантации солидных органов. *Альманах клинической медицины*. 2014;30: 61–9.
4. Kuztal M., Kościeliska-Kasprzak K., Gdowska W., Zabińska M., Mysza M., Kłak R. et al. Extracorporeal photopheresis as an antirejection prophylaxis in kidney transplant recipients: preliminary results. *Transplant. Proc.* 2011;43(8):2938–40.
5. Хаитов Р. М., Трофимов Д. Ю., Алексеев Л. П. *Иммуногеномика и генодиагностика человека. Национальное руководство*. Кофиади И. А., ред. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017.
6. Ватазин А. В., Зулькарнаев А. Б., Кильдюшевский А. В. Некоторые механизмы действия экстракорпоральной фотохимиотерапии при трансплантации солидных органов. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2014;1(XVI):76-84.
7. Федулкина В. А., Ватазин А. В., Кильдюшевский А. В., Олышанский А. Я., Фаенко А. П. Значение экстракорпоральной фотохимиотерапии в ингибировании процессов отторжения почечного трансплантата. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2016;2(18):46-55.

REFERENCES

1. Alekseev L.P., Haitov R.M., Dolbin A.G., Boldyreva M.N., Aleseeva P.L., Trofimov D.Y. et al. Human immunogenetics and organ transplant clinics in Russia. *Immunologiya*. 2015;36(2):76-89. (in Russian)
2. Rodionov A.A., Kofiadi I.A., Abramov V.Y., Alekseev L.P. A new method for measuring the level of icDNA in diagnosing of transplant rejection. *Immunologiya segodnya: traditsii i innovatsii*. 2016:13-4. (in Russian)
3. Adamski J., Kinard T., Ipe T., Cooling L. Extracorporeal photopheresis for the treatment of autoimmune diseases. *Transfusion and Apheresis Science*. 2015;52:171–82.
4. Kil'djusheskij A.V., Fedulkina V.A., Fomina O.A., Fomin A.M. Application of extracorporeal photochemotherapy in skin lympho-

- mas and transplantation of solid organs. *Al'manah klinicheskoy meditsiny*. 2014;30:61–9. (in Russian)
5. Rummler S., Barz D. Extracorporeal photopheresis – a beneficial treatment for cardiac and lung transplant rejection. *Transplant international*. 2011;24:5.
 6. Kusztal M., Kościelska-Kasprzak K., Gdowska W., Zabińska M., Mysza M., Klak R. et al. Extracorporeal photopheresis as an antirejection prophylaxis in kidney transplant recipients: preliminary results. *Transplant Proc*. 2011;43(8): 2938–40.
 7. Barten M.J., Dieterlen M.T. Extracorporeal photopheresis after heart transplantation. *Immunotherapy*. 2014;6(8):927–44.
 8. Haitov R.M., Trofimov D.U., Alexeev L.P. Human immunogenomics and genodiagnosis. National leadership. [*Immunogenomika i genodiagnostika cheloveka. Nacionalnoe rukovodstvo*]. Kofiadi I.A., ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2017. (in Russian)
 9. Lamioni A., Parisi F., Isacchi G., Giorda E., Di Cesare S., Landolfo A. et al. The immunological effects of extracorporeal photopheresis unraveled: induction of tolerogenic dendritic cells in vitro and regulatory T cells in vivo. *Transplantation*. 2005;79(7):846–50.
 10. Vatazin A.V., Zul'karnaev A.B., Kil'djushevskij A.V. Some of the mechanisms of extracorporeal photochemotherapy in solid organ transplantation. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2014;1(XVI):76–84. (in Russian)
 11. Fedulkina V.A., Vatazin A.V., Kildyushevskij A.V., Olshanskij A.Y., Faenko A.P. The value of extracorporeal photochemotherapy in renal transplant rejection inhibition. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2016;2(18):46–55. (in Russian)
 12. Biagi E., Di Biaso I., Leoni V., Gaipa G., Rossi V., Bugarin C. et al. Extracorporeal photochemotherapy is accompanied by increasing levels of circulating CD4+ CD25+ GITR+ Foxp3+ CD62L+ functional regulatory T-cells in patients with graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2007;84(1):31–9.
 13. Fife B.T., Bluestone J.A. Control of peripheral T - cell tolerance and autoimmunity via the CTLA - 4 and PD - 1 pathways. *Immunological reviews*. 2008;224(1):166–82.
 14. Dieterlen MT, Bittner HB, Pierzchalski A, Dhein S, Mohr FW, Barten MJ. Immunological monitoring of extracorporeal photopheresis after heart transplantation. *Clinical & Experimental Immunology*. 2014;176(1):120–8.
 15. Holtick U., Wang X.N., Marshall S.R., Scheid C., von Bergwelt-Baildon M., Dickinson A.M. Immature DC isolated after co-culture with PUVA-treated peripheral blood mononuclear cells downregulate graft-versus-host reactions in the human skin explant model. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2013;8(4):324–32.

Поступила 23.10.17

Принята к печати 08.11.17

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616-008.949-078.33

Бекман Н.И.¹, Помелова В.Г.¹, Осин Н.С.²

МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ ИММУНОЧИПОВ ФОСФАН

¹ ФГУП «Государственный НИИ биологического приборостроения» ФМБА РФ, 125424, Москва, Россия;

² ЗАО «Иммуноскрин», 125424, Москва, Россия

Разработан новый метод мультиплексного количественного анализа наркотических, психотропных средств на основе технологии Фосфан с использованием иммуночипов в формате стандартных 96-луночных планшетов, моноклональных антител к наркотическим соединениям и Рт-копропорфирина в качестве длительно люминесцирующего метчика. Для мультиплексного анализа используется 20 мкл биологической жидкости человека (мочи, сыворотки крови или слюны) или 2 диска диаметром 3,2 мм из высушенного на бумаге пятна мочи. Не требуется предварительная обработка или разведение исследуемой пробы. Продемонстрирован широкий диапазон измеряемых концентраций при высокой чувствительности анализа: 1 нг/мл морфина и метадона, 0,5 нг/мл барбитуратов, 2 нг/мл бензоилэкогони, метамфетамина, каннабиноидов и бензодиазепинов, 8 нг/мл амфетамина при вариабельности результатов не более 15%. Апробация метода на аттестованных образцах мочи (n = 197) и сывороток крови (n = 98) показала, что метод позволяет правильно определять опиаты, кокаин, каннабиноиды, метадон, бензодиазепины, барбитураты и амфетамины при отсутствии ложноположительных результатов при исследовании образцов, содержащих ненаркотические лекарственные средства. Результаты исследования высушенных на бумаге проб мочи (n = 50) хорошо совпадали с результатами анализа жидких проб для всех исследуемых аналитов. На основе предложенного мультиплексного анализа разработана тест-система Нарк-Фосфан для количественного исследования одновременно до 96 проб различных биологических жидкостей, в том числе в виде высушенных на бумаге пятен. Продемонстрированные высокая чувствительность, специфичность и точность анализа при определении наиболее распространенных наркотических средств позволяют предложить его в качестве первичного теста при массовых обследованиях населения для выявления наркомании, особенно на ранней стадии.

Ключевые слова: Фосфан; мультиплексный анализ; биочипы; наркотики; морфин; кокаин; каннабиноиды; амфетамины; бензодиазепины; барбитураты.

Для цитирования: Бекман Н.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Мультиплексный анализ наркотических средств на основе технологии иммуночипов Фосфан. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (3): 178–183. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-178-183>

Bekman N.I.¹, Pomelova V.G.I., Osin N.S.²

THE MULTIPLEX ANALYSIS OF DRUG MEDICINALS ON THE BASIS OF TECHNOLOGY OF IMMUNOCHIPS PHOSPHAN

¹The Federal State Unitary Institution "The State Research Institute of Biological Instrument-Making Industry" of the Federal Medical Biological Agency of Russia, 125424, Moscow, Russia

²The Closed Corporation "Immunoskrin", 125424, Moscow, Russia

Для корреспонденции: Бекман Наталья Игоревна, канд. хим. наук, ст.науч. сотр. лаборатории молекулярных методов диагностики инфекционных и соматических заболеваний; e-mail: nibeckman@mail.ru

The new technique of multiplex qualitative analysis of narcotic, psychotropic remedies is developed on the basis of technology Phosphan using immunochips in the format of standard 96-wells plates, monoclonal antibodies to narcotic compounds and Pt-coproporphyrin as a long luminescent marker. The multiplex analysis was implemented using 20 mkl of human biological fluid (urine, blood serum or saliva) of 2 discs of 3.2 mm in diameter made of dried urine spot on paper. No preliminary processing or dilution of analyzed sample is required. The large range of measured concentrations was demonstrated under high sensitivity of analysis: 1 ng/ml of morphine and methadone, 0.5 ng/ml of barbiturates, 2 ng/ml of benzoylecgonine, methamphetamine, cannabinoids and benzodiazepines, 8 ng/ml amphetamine at variability of results no more than 15%. The approbation of technique was implemented using valid samples of urine (n=197) and blood serum (n=98) demonstrated that the technique permits to detect properly opiates, cocaine, cannabinoids, methadone, benzodiazepine, barbiturates and amphetamines at absence of false positive results in case of analysis of samples containing non-narcotic medications. The results of study of samples of dried urine spot on paper (n=50) well coincided with the results of analysis of fluid samples for all analyzed analytes. On the basis of proposed multiplex analysis a test-system Narc-Phosphan was developed for quantitative studying simultaneously up to 96 samples of various biological fluids, including as dried spots on paper. The analysis demonstrated high sensitivity, specificity and exactness during detection of the most prevailed narcotic substances that permits to propose this technique as a primary test during mass check-ups of population with purpose of detection of drug abuse, especially at the earlier stage.

Key words: Phosphan; multiplex analysis; biochip; narcotics; morphine; cocaine; cannabinoids; amphetamines; benzodiazepine; barbiturates.

For citation: Bekman N.I., Pomelova V.G., Osin N.S. The multiplex analysis of drug medicinals on the basis of technology of immunochips Phosphan. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(3): 178-183. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-178-183>*

For correspondence: Bekman N.I., candidate of chemical sciences, senior researcher of the laboratory of molecular methods of diagnostic of infectious and somatic diseases, e-mail: nibeckman@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.11.2017
Accepted 18.11.2017

В последние годы распространение заболеваний наркоманий в России и за рубежом приобретает всё более угрожающие масштабы, причём наркомания имеет опасную тенденцию к омоложению. В связи с этим очевидна необходимость усиления мер по своевременному выявлению и предупреждению наркомании, среди которых важное место занимает профилактическое обследование различных групп населения – учащихся, военнослужащих, призванных, иммигрантов, работников опасных производств и др. Для эффективного развития программ наркологического скрининга нужны новые методы анализа наркотических соединений (НС) или их метаболитов. Предложенные к настоящему времени методы газовой и жидкостной хроматографии [1–3], масс-спектрометрии [4], иммунохроматографии [5], иммуноферментные [6–8], иммунофлуоресцентные [9] и другие, в том числе мультиплексные, методы [10–12] не в полной мере удовлетворяют таким критериям массового скрининга, как возможность одновременного анализа большого числа исследуемых образцов на широкую панель аналитов, низкая стоимость, простота пробоподготовки, высокая точность и чувствительность для детектирования наркозависимости на ранней стадии. Помимо этого, большое значение имеет возможность анализа биологических жидкостей человека в виде высушенных на бумаге пятен как более безопасных и удобных при транспортировке и хранении [13, 14]. Совокупности этих критериев, по нашему мнению, в наибольшей степени отвечает биочип-технология мультиплексного фосфоресцентного иммуноанализа Фосфан (Иммуноскрин, РФ), эффективность которой для скрининга различных патологий была продемонстрирована ранее [15–17].

Цель исследования – разработать на основе технологии Фосфан метод мультиплексного количественного анализа основных наркотических, психотропных средств в биологических жидкостях человека (в том числе в виде высушенных на бумаге пятен) и оценить перспективы его применения для наркологического скрининга.

Материал и методы. Для проведения исследований использовали указанные ниже иммунобиологические препараты.

Мышинные моноклональные антитела (МКА) к морфину (MOR) бензоилэконгину (BZE), амфетамину (AMP), метамфетамину (mAMP), метадону (MTD), бензодиазепинам

(BZD), барбитуратам (BAR) и Δ^9 -тетра-гидроканнабинолу (THC) (Calbioreagents, США), меченные биотином по стандартной методике (SIGMA, США).

Конъюгаты MOR, BZE, AMP, mAMP, MTD, BZD, BAR и THC с бычьим сывороточным альбумином (Calbioreagents, США).

Референтный образец мочи «Detectabuse Liquid Control Urine +25%» (Biochemical diagnostics, США), содержащий 2500 нг/мл MOR, 375 нг/мл BZE, 65,5 нг/мл Δ^9 -THC-COOH, 1250 нг/мл d-AMP, 1250 нг/мл d-mAMP, 375 нг/мл MTD, 375 нг/мл пропоксифена, 375 нг/мл оксазепамы, 375 нг/мл нор-триптилина, 375 нг/мл секобарбитала, 375 нг/мл метаквалона и 31 нг/мл фенциклидина.

Исследуемые аттестованные образцы (любезно предоставлены Первым МГМУ им. И.М. Сеченова) включали 197 проб мочи человека, отобранных по результатам химикотоксикологической экспертизы, и 98 образцов мочи и сыворотки крови пациентов наркологического диспансера с известными сведениями о составе, дозе и времени приёма НС. Сухие образцы ($n = 50$) готовили путём нанесения 20 мкл аттестованных образцов мочи на бланк фильтровальной бумаги (Whatman 903, США) и высушивания на воздухе. Жидкие образцы хранили при температуре -20°C , сухие пятна мочи – при температуре 4°C с осушителем.

Иммуночипы представляли собой 16 микрозон (диаметром 0,5 мм), напечатанных контактным способом на дне лунок 96-луночного полистиролового планшета (Nunc, Дания) [16]. Иммуночипы печатали с использованием конъюгатов НС в различных конфигурациях: моночипы с одним типом аналита, чипы с четырьмя типами аналитов в разных сочетаниях (по 4 идентичные микрозоны для каждого аналита) или чип с восемью аналитами (по 2 микрозоны для каждого), представленный на рис. 1. Печать идентичных микрозон применяли для повышения точности измерения [18].

Схема проведения иммуноанализа (см. рис. 1) состояла в следующем. В лунки планшета с напечатанными иммуночипами вносили по 20 мкл исследуемых проб мочи или сыворотки крови либо два диска диаметром 3,2 мм, вырезанных из высушенного на бумаге пятна мочи. Затем добавляли по 100 мкл смеси биотинилированных мышиных МКА к анализируемому НС и инкубировали в течение часа. После отмывки в лунки добавляли по 25 мкл конъюгата стрептавидина

ИММУНОЛОГИЯ

с Рт-копропорфирином (Иммуоскрин, РФ) и инкубировали 15 мин. Разведения МКА и конъюгата готовили в буфере (рН 7,75), содержащем 12,1 мг/мл трис-(гидроксиметил)-аминометана, 0,1 мл/л твина-20, 0,5 мг/мл БСА, 8,7 мг/мл хлорида натрия, 0,5 мг/мл азидата натрия (все реагенты фирмы Sigma, США). Все инкубации проводили при перемешивании при комнатной температуре. Затем планшет промывали и высушивали.

Регистрацию флуоресцентного сигнала осуществляли на биочип-анализаторе ИФИ-04 (ГосНИИБП, РФ) путём сканирования дна лунки планшета лучом с длиной волны излучения 365 нм в режиме выделения длительной люминесценции с максимумом 645 нм. Обработка и представление результатов осуществлялись с помощью программных средств биочип-анализатора.

Чувствительность анализа (предел детекции) каждого НС рассчитывали по калибровочной кривой как концентрацию НС, которая соответствует значению интенсивности регистрируемого сигнала при анализе пробы, не содержащей данное НС, минус два стандартных отклонения.

Результаты. При разработке метода мультиплексного анализа наркотических средств (Нарк-Фосфан) первоочередная задача состояла в оценке специфичности используемых иммунологических реакций. С этой целью были исследованы характеристики восьми МКА к MOR, BZE, THC, MTD, BZD, BAR, AMP и mAMP, предназначенных для выявления соответственно опиатов, кокаина, каннабиноидов, метадона, бензодиазепинов, барбитуратов и амфетаминов. Проведённые исследования показали высокую специфичность иммунореакций выбранных МКА и конъюгатов НС. Перекрестные реакции не превышали 0,01% за исключением амфетаминов, перекрест между которыми достигал 20%. Не было обнаружено значительных отличий результатов мультиплексного анализа НС на иммуночипах разных конфигураций. Для одного анализа было достаточно 0,5 - 1,8 нг меченных биотином антител (при этом максимальный регистрируемый сигнал превышал фоновый более чем в 1000 раз). Для выбора оптимальной методики постановки анализа объём исследуемой пробы варьировали от 10 до 50 мкл с предварительным разведением в 2–10 раз буфером или мечеными антителами непосредственно на иммуночипах в лунке планшета и временем инкубации от 15 мин до 2 ч. Выбранная методика (20 мкл пробы с разведением в 6 раз в лунке с иммуночипами и инкубацией 1 ч) обеспечивала необходимую чувствительность анализа при снижении вариабельности и влияния неспецифических взаимодействий с компонентами биологических жидко-

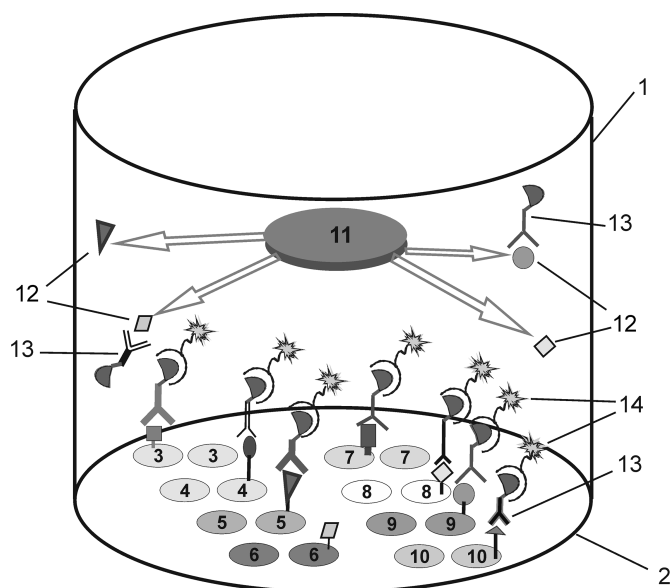


Рис.1. Схема мультиплексного анализа НАРК-ФОСФАН наркотических соединений (НС).

1 – лунка 96-луночного микропланшета; 2 – дно лунки; 3–10 – микрозоны, специфические к восьми НС; 11 – исследуемый образец; 12 – исследуемые НС из образца; 13 – меченные биотином антитела к НС; 14 – конъюгат стрептавидин-Рт-копропорфирин.

стей. Это позволило использовать данную методику для исследования различных биологических жидкостей человека (мочи, сыворотки крови или слюны), а также приготовленных из них высушенных на бумаге образцов.

На рис. 2 приведены результаты мультиплексного анализа проб мочи на кокаин, каннабиноиды, амфетамин и опиаты. Данные сканирования 96-луночного планшета представлены в виде диаграммы пространственного распределения интенсивности регистрируемого сигнала флуоресценции внутри зоны сканирования дна лунки планшета. При визуальной оценке результатов анализа отсутствие окрашенных пятен свидетельствует о высоком уровне соответствующего НС в исследуемой пробе (например, в пробе, анализируемой в лунке планшета D4, присутствуют BZE и MOR, а в пробе в лунке C12 – THC и AMP).

Калибровочные кривые для количественного измерения НС в анализируемых пробах были построены по результатам мультиплексного исследования (в варианте одновременного определения восьми аналитов) референтного образца, содержащего НС в известных концентрациях (рис. 3). Полученные кривые имели характер обратной зависимости. В таблице суммированы аналитические характеристики метода Нарк-Фосфан, рассчитанные по калибровочным кривым. Согласно полученным данным, метод обеспечивает высокочувствительное количественное определение большинства исследуемых НС в широком диапазоне концентраций. Так,

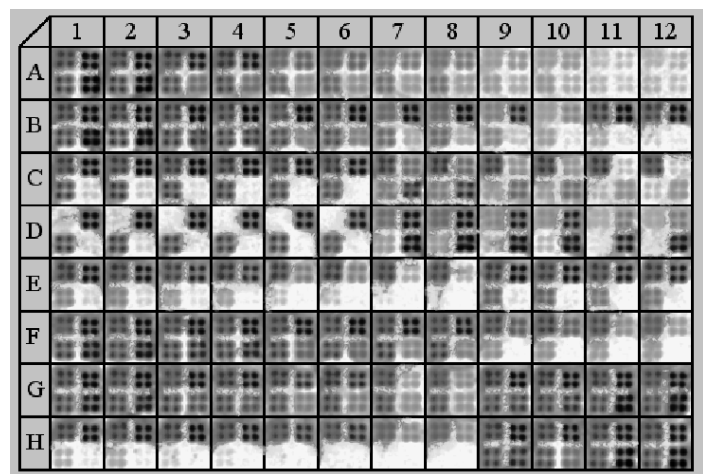


Рис. 2. Графическое представление результатов сканирования 96-луночного планшета после проведения анализа исследуемых проб мочи на кокаин (BZE), каннабиноиды (THC), амфетамин (AMP) и опиаты (MOR).

Справа приведена схема иммуночипа (квадратом выделена зона сканирования дна лунки планшета).

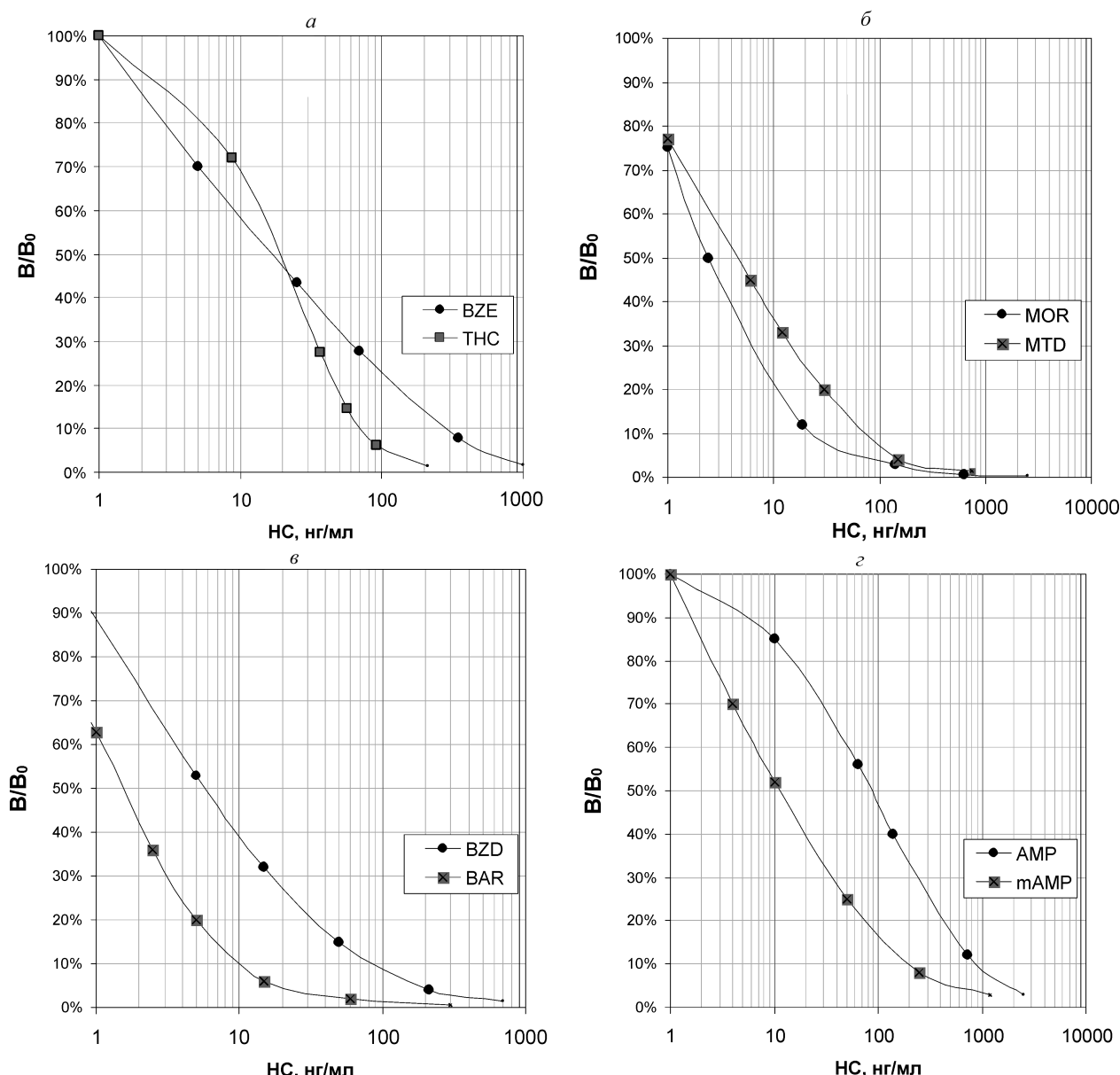


Рис. 3. Калибровочные кривые для одновременного определения методом НАРК–ФОСФАН кокаина (BZE) и каннабиноидов (THC) (а), опиатов (MOR) и метадона (MTD) (б), бензодиазепинов (BZD) и барбитуратов (BAR) (в), амфетаминов (AMP и mAMP) (г).

По оси абсцисс – концентрация исследуемого наркотического соединения (НС), нг/мл; по оси ординат – степень ингибирования регистрируемого сигнала (B/B_0), %.

при выявлении опиатов, возможно измерение MOR до 2000 нг/мл при пределе детекции 1 нг/мл (см. таблицу). Вариабельность результатов анализа каждого НС не превышала 15%, а воспроизводимость соответствовала интервалу 80–120%.

С помощью разработанного метода Нарк–Фосфан исследовано 197 образцов мочи, аттестованных в рамках химикотоксикологической экспертизы на присутствие НС (в том числе, синтетических), их метаболитов, а также различных лекарственных препаратов. Во всех образцах, которые по предварительным данным содержали НС, были выявлены высокие уровни соответствующих НС: MOR ($n = 31$), BZE ($n = 2$), THC ($n = 37$), AMP ($n = 21$), mAMP ($n = 7$), MTD ($n = 15$), BZD ($n = 20$) и BAR ($n = 32$). В образцах, содержащих ненаркотические лекарственные средства, уровни исследуемых аналитов не превышали пороговых значений cut off, приведённых в таблице. Из 62 образцов мочи с наличием разных

синтетических НС (в основном АВ-Chminаса АВ-Pinаса и РВ-22) в 37 получены положительные реакции на один из аналитов. Параллельный анализ образцов сыворотки крови и мочи ($n = 98$) подтвердил соответствие (с учётом характера метаболизма НС в крови и моче) наших результатов сведениям о составе, дозе и времени приёма НС, собранным при поступлении пациентов в стационар.

Сравнение результатов выявления НС в жидких и высушенных на бумаге пробах мочи ($n = 50$) продемонстрировало хорошее совпадение. Вместе с тем при использовании для анализа только одного вырезаемого из сухого пятна диска диаметром 3,2 мм (содержит примерно 1 мкл пробы) не удалось определить AMP и BZE при концентрации ниже 150 нг/мл. С учётом этого число анализируемых дисков было увеличено до двух, что позволило правильно выявить все НС: BZE ($n = 4$), THC ($n = 18$), MOR ($n = 22$), AMP ($n = 8$), mAMP ($n = 6$),

Аналитические характеристики метода Нарк-Фосфан

Наркотические, психотропные средства	Аналит	Рекомендованный предел детекции тестов*, нг/мл		Характеристики Нарк-Фосфан, нг/мл		
		предварительных	подтверждающих	предел детекции	рабочий диапазон	cut off**
Опиаты	MOR	300	10	1,0	0–2000	50
Кокаин	BZE	25	50	2,0	0–500	50
Каннабиноиды	THC	15	15	2,0	0–100	50
Амфетамин	AMP	25	20	8,0	0–1500	100
Метамфетамин	mAMP	25	20	2,0	0–1000	100
Метадон	MTD	25	50	1,0	0–500	100
Бензодиазепины	BZD	20	50	2,0	0–600	200
Барбитураты	BAR	50	100	0,5	0–300	100

Примечание. * – согласно требованиям к техническим средствам химико-токсикологических исследований (см. Методические рекомендации Ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины». Изотов Б.Н., Кочетов А.Г., ред. М., 2015); ** – cut off – пороговое значение концентрации НС в пробе, при превышении которого результат анализа признаётся положительным.

MTD ($n = 10$), BZD ($n = 13$) и BAR ($n = 15$). Большинство образцов содержало несколько исследуемых НС. Изучение стабильности НС в сухих образцах мочи показало, что в процессе их хранения в течение года не был потерян ни один положительный результат анализа.

Обсуждение. Разработанный мультиплексный анализ Нарк-Фосфан предназначен для определения НС в образцах биологических жидкостей человека. Метод основан на технологии Фосфан с использованием иммуночипов в формате стандартного многоруночного планшета [15, 16]. Принцип анализа базируется на конкурентной реакции между НС из исследуемой пробы и конъюгатами НС в микрозонах иммуночипа за связывающие центры специфических МКА, меченных биотином. Для проявления образующихся иммунных комплексов используют конъюгат стрептавидина с длительно люминесцирующим метчиком Рт-копропорфирином и последующую регистрацию в режиме временного разрешения интенсивности флуоресценции различных микрозон иммуночипа (см.рис. 1).

Использование длительно люминесцирующего метчика обеспечило широкий динамический диапазон измерения концентрации НС (см.таблицу). При этом достигнуты высокие значения чувствительности анализа большинства исследуемых НС, многократно превышающие значения, рекомендованные как для предварительных, так и подтверждающих химико-токсикологических исследований (см.таблицу). Проведено продемонстрирована высокая специфичность используемых иммунореакций и возможность правильного одновременного определения всех исследуемых аналитов с хорошей воспроизводимостью получаемых результатов. С учётом этого применение метода Нарк-Фосфан может позволить точно детектировать не только высокие уровни НС непосредственно после приёма препарата, но и остаточные уровни НС, в том числе при однократном употреблении, что очень важно для выявления наркомании на ранней стадии.

Апробация разработанного метода показала возможность определения основных НС в различных клинических образцах. Были правильно выявлены все образцы, содержащие исследуемые НС в концентрации выше выбранных значений пороговых уровней cut off (см.таблицу). Отсутствовали ложноположительные результаты анализа образцов с различными ненаркотическими соединениями, хотя в некоторых из них были зафиксированы невысокие (ниже cut off) уровни исследуемых аналитов. Для уточнения интерпретации этих результатов необходимы дополнительные исследования на расширенной выборке таких образцов, охарактеризованных с помощью высокочувствительных референтных методов.

В последние годы помимо основных НС получают распространение новые синтетические НС. Тот факт, что при анализе

большинства образцов, содержащих такие НС, были зафиксированы положительные результаты Нарк-Фосфан, по крайней мере, на один из аналитов, открывает перспективу использования этого метода в качестве предварительного теста с последующим определением конкретного состава употребляемого синтетического препарата с помощью подтверждающих тестов.

Благодаря высокой чувствительности метод позволяет исследовать образцы биологических жидкостей в виде высушенных на бумаге пятен. Проведённые исследования продемонстрировали хорошее совпадение результатов анализа на все исследуемые НС как в жидких, так и сухих образцах мочи, в том числе с низким содержанием НС. Разработанный метод не требует предварительной пробоподготовки обоих видов проб и выполняется по единой методике. Внедрение в практику высушенных образ-

цов может значительно упростить скрининговые обследования и существенно снизить затраты на их проведение.

Метод Нарк-Фосфан защищён патентом РФ [19]. На его основе создана тест-система, включающая отрицательный и три положительных мультианалитных контролей с низким, средним и высоким уровнем исследуемых НС, смесь биотинилированных антител к НС, универсальный проявляющий реагент и 96-луночный планшет с нанесёнными на дно лунок иммуночипами. Использование стандартных полистироловых планшетов существенно снижает стоимость тест-системы и упрощает постановку мультиплексного анализа благодаря возможности использования обычного лабораторного оборудования.

Тест-система Нарк-Фосфан может быть предназначена для выявления разных панелей НС в биологических жидкостях (моче, сыворотке крови или слюне). Оптимальным представляется вариант с панелью из восьми наиболее распространённых НС, перечисленных в таблице. Также найдут применение специализированные тест-системы, предназначенные для выявления психотропных лекарственных средств, амфетаминов или курительных смесей. В настоящее время изучается возможность дополнения панели исследуемых НС некоторыми синтетическими наркотиками, а также метилendioксиметамфетамин (МДМА), фентанилом и котином.

Заключение. На базе технологии иммуночипов Фосфан разработан новый высокочувствительный метод мультиплексного анализа основных наркотических средств. С его помощью можно исследовать одновременно до 96 проб различных биологических жидкостей, в том числе в виде высушенных на бумаге пятен, без предварительной пробоподготовки. Достигнутые характеристики Нарк-Фосфан позволяют предложить его в качестве первичного теста для наркологического скрининга населения.

Благодарность. Авторы выражают благодарность А.Е. Носыреву и другим сотрудникам кафедры аналитической и судебно-медицинской токсикологии под руководством Б.Н. Изотова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова за консультации при подготовке исследований и предоставление аттестованных образцов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–4, 6–12, 14 см. REFERENCES)

- Шанин И.А., Хан О.Ю., Петухов А.Е., Смирнов А.В., Еремин С.А. Детектирование амфетаминов в моче с помощью иммунохроматографических тест-полосок. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2012; 55(4): 33-7.

13. Помелова В.Г., Осин Н.С. Перспективы интеграции технологии су-хого пятна крови в популяционные исследования здоровья и среды обитания человека. *Вестник РАМН*. 2007; 12:10-6.
15. Осин Н.С., Помелова В.Г., Быченкова Т.А., Соколов А.С. Способ многоаналитного иммуноанализа. *Патент РФ* № 2184970; 2002.
16. Осин Н.С., Помелова В.Г., Соколов А.С., Быченкова Т.А., Бекман Н.И. Шарафудинова Т.Ю. и др. Фосфоресцентный микроанализ как новая технологическая платформа для молекулярной диагностики. *Вестник РАМН*. 2007; 12: 3-10.
17. Бекман Н.И., Ларичева С.Ю., Быченкова Т.А., Помелова В.Г., Осин Н.С. Применение технологии иммуночипов ФОСФАН для исследования маркеров щитовидной железы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 5: 23-6.
18. Бекман Н.И., Быченкова Т.А., Ларичева С.Ю., Помелова В.Г. и др. Способ одновременного детектирования тиротропина и общего тироксина в сухих пятнах крови. *Патент РФ* № 2480772; 2013.
19. Осин Н.С., Бекман Н.И., Помелова В.Г., Гранцева Н.Х. Способ многоаналитного иммуноанализа. *Патент РФ* № 2593787; 2016.

REFERENCES

1. Raikas N., Christopoulou K., Theodoridis G., Tsoukali H., Psaroulis D. Determination of amphetamines in human urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. B*. 2003; 789: 59-63.
2. Sun Q.R., Xiang P., Yan H., Shen M. Simultaneous analyses of cocaine and its metabolite benzoylecgonine in urine by LC-HPLC. *J. Forensic Sci.* 2008; 24: 268-72.
3. Nakashima R. Development of ultra sensitive HPLC determination for drugs of abuse. *Chromatography*. 2009; 30: 57-60.
4. Wohlfarth A., Scheidweiler K.B., Chen X., Liu H., Huestis M.A. Qualitative confirmation of 9 synthetic cannabinoids and 20 metabolites in human urine using LC-MS/MS and library search. *Anal. Chem.* 2013; 85: 3730-8.
5. Shanin I.A., Khan Olu, Petukhov A.E., Smirnov A.V., Eremin S.A. The detection of amphetamines in urine samples using immunochromatographic test strips. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 2012; 55(4): 33-7. (in Russian)
6. Crooks C.R., Brown S. Roche DAT immunoassay: sensitivity and specificity testing for amphetamines, cocaine, and opiates in oral fluid. *J. of Analytical Toxicology*. 2010; 34: 103-9.
7. Snyder M.L., Jarolim P., Melanson S.E. A new automated urine 8. fentanyl immunoassay: technical performance and clinical utility for monitoring fentanyl compliance. *Clin Chim Acta*. 2011; 412(11-12): 946-51.
8. Carney S., Wolf C.E., Tarnai-Moak L., Poklis A. Evaluation of two enzyme immunoassays for the detection of the cocaine metabolite benzoylecgonine in 1,398 urine specimens. *J. Clin. Lab. Anal.* 2012; 26(3): 130-5.
9. Gandhi S., Sharma P., Capalash N., Verma R.S., Suri R.C. Group-selective antibodies based fluorescence immunoassay for monitoring opiate drugs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008; 392 (1-2): 215-22.
10. Bruls D.M., Evers T.H., Kahlman J.A., van Lankvelt P.J., Ovsyanko M., Pelssers E.G. Rapid integrated biosensor for multiplexed immunoassays based on actuated magnetic nanoparticles. *Lab. Chip*. 2009; 9(24): 3504-10.
11. Smith J., Sammons D., Robertson S., Biagini R., Snawder J. Measurement of multiple drugs in urine, water, and on surfaces using fluorescence covalent microbead immunosorbent assay. *Toxicol. Mech. Methods*. 2010; 20(9): 587-93.
12. Ellefsen K.N., Anizan S., Castaneto M.S., Desrosiers N.A., Martin T.M., Klette K.L. Validation of the only commercially available immunoassay for synthetic cathinones in urine: Randox Drugs of Abuse V Biochip Array Technology. *Drug Test Anal.* 2014; 6(0): 728-38.
13. Pomelova V.G., Osin N.S. Prospects of the integration of dry blood spot technology with human health and environmental population studies. *Vestnik RAMN*; 2007; 12:10-6. (in Russian)
14. Stove C.P., Ingels A.S., De Kesel P.M., Lambert W.E. Dried blood spots in toxicology: from the cradle to the grave? *Crit Rev Toxicol.* 2012; 42(3):230-43.
15. Osin N.S., Pomelova V.G., Bychenkova T.A., Sokolov A.S. Method of multianalyte immunoassay. *Patent RF*, N 2184970; 2002. (in Russian)
16. Osin N.S., Pomelova V.G., Sokolov A.S., Bychenkova T.A., Bekman N.I., Sharafudinova T.Yu. et al. Phosphorescent microanalysis as a new technical platform for molecular diagnostics. *Vestnik RAMN*. 2007; 12: 3-10. (in Russian)
17. Bekman N.I., Laricheva S.Iu., Bychenkova T.A., Pomelova V.G., Osin N.S. The application of technology of immune chips for investigation of markers of thyroid gland. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 5:23-6. (in Russian)
18. Bekman N.I., Bychenkova T.A., Laricheva S.Yu., Pomelova V.G. et al. The method of simultaneous detection of TSH and total thyroxine in dried blood spots. *Patent RF*, N 2480772; 2013. (in Russian)
19. Osin N.S., Bekman N.I., Pomelova V.G., Grantseva N.H. Method of multi-analyte immunoassay. *Patent RF*, N 2593787; 2016. (in Russian)

Поступила 01.11.17

Принята к печати 18.11.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 578.891:578.11.083.3

Личная Е.В.¹, Климашевская С.В.², Обрядина А.П.², Вербов В.Н.¹, Белопольская М.А.^{3,4}, Эсауленко Е.В.¹, Калинина О.В.^{1,5}

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ К БЕЛКУ F ВИРУСА ГЕПАТИТА С МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА

¹ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», 197101, Санкт-Петербург, Россия;

²ООО «НПО «Диагностические системы», 603093, Нижний Новгород, Россия;

³СПбГБУЗ «Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина», 195067, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, Санкт-Петербург, Россия;

⁵ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова», 197341, Санкт-Петербург, Россия

В области core гена вируса гепатита С (ВГС) располагается альтернативная рамка считывания, кодирующая один белок, известный как белок F, или core+1/ARFP. Наличие антител к белку F ВГС в сыворотке крови больных хроническим гепатитом С свидетельствует об экспрессии белка in vivo. В данной работе отработана методика иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием синтетического пептида F10, соответствующего антигенной детерминанте белка F ВГС субтипа 1b, для определения антител к белку F в образцах сыворотки крови. Иммуногенность и иммунохимическая специфичность синтетического пептида F10 доказана на лабораторных животных (мышах).

Ключевые слова: вирус гепатита С; хронический гепатит С; белок F; иммуноферментный анализ.

Для цитирования: Личная Е.В., Климашевская С.В., Обрядина А.П., Вербов В.Н. Белопольская М.А., Эсауленко Е.В., Калинина О.В. Определение антител к белку F вируса гепатита С методом иммуноферментного анализа с использованием синтетического пептида. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(3): DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-183-186>

Для корреспонденции: Личная Евгения Викторовна, мл. науч. сотр. лаборатории вирусных гепатитов; e-mail: evlichnaya@gmail.com

Lichnaia E.V.¹, Klimashevskaya S.V.², Obryadina A.P.², Verbov V.N.¹, Belopolskaya M.A.^{3,4}, Esaulenko E.V.¹, Kalinina O.V.^{1,5}

THE DETECTION OF ANTIBODIES TO HCV F PROTEIN WITH IMMUNE ENZYME ANALYSIS USING SYNTHETIC PEPTIDE

¹The Federal Budget Institution of Science "The Pasteur St. Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology", 197101, St. Petersburg, Russia

²The R&D Production Complex "Diagnostic Systems", 603093, Nizhny Novgorod, Russia

³The St. Petersburg State Budget Institution of Health Care "The S.P. Botkin Clinical Infection Hospital", 195067, St. Petersburg, Russia

⁴The Federal State Budget Scientific Institution "The Institute of Experimental Medicine", 197376, St. Petersburg, Russia

⁵The Federal State Budget Institution "The V.A. Almazov National Medical Research Center", 197341, St. Petersburg, Russia

Alternative reading frame encoding a single protein known as protein F or core + 1 / ARFP is located in the core region of the hepatitis C virus (HCV) genome. The presence of antibodies to the F protein of HCV in the serum of patients with chronic hepatitis C indicates the expression of this protein in vivo. In this study, to determine antibodies to the F protein of HCV in serum samples the methodology of the enzyme immunoassay (ELISA) was developed using the synthetic peptide F10 corresponding to the antigenic determinant of the F protein of the HCV subtype 1b. The immunogenicity and immunochemical specificity of synthetic F10 peptide has been demonstrated in laboratory animals (mice).

Keywords: hepatitis C virus; chronic hepatitis C; protein F; enzyme-linked immunosorbent assay.

For citation: Lichnaia E.V., Klimashevskaya S.V., Obryadina A.P., Verbov V.N., Belopolskaya M.A., Esaulenko E.V., Kalinina O.V. The detection of antibodies to HCV F protein with immune enzyme analysis using synthetic peptide. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(3): 183-186. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-183-186>

For correspondence: Lichnaia E.V., junior research associate, laboratory of viral hepatitis e-mail: evlichnaya@gmail.com

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

Acknowledgment. The study was partially supported by the young scientists grant of the Federal Budget Institution of Science "The Pasteur St. Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology".

Received 01.11.2017
Accepted 08.11.2017

Введение. Вирусный гепатит С является одной из ведущих причин хронических заболеваний печени с высоким риском развития цирроза печени и гепатокарциномы [1]. В изучении гепатита С актуальным остаётся поиск факторов, влияющих на прогрессирование инфекционного процесса.

Высокая генетическая вариабельность вируса гепатита С (ВГС) определяет появление постоянно меняющихся антигенных структур вируса. Геном вируса представлен (+)-цепью РНК длиной около 9600 нуклеотидов. Открытая рамка считывания (ORF), ограниченная 5'-UTR и 3'-UTR (untranslated region – нетранслируемыми участками), кодирует полипротеин, состоящий из ~ 3000 аминокислотных остатков (а.о.). Во время вирусной репликации полипротеин расщепляется вирусными и клеточными протеазами на 10 белков: три структурных (core, E1, E2) и семь неструктурных (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). В области core гена располагается дополнительная альтернативная рамка считывания, которая кодирует один белок, получивший название F (frameshift) или core+1/ARFP (alternative reading frame protein) [2, 3]. Состав и длина белка F варьируют в зависимости от генотипа вируса, его роль в морфогенезе вируса и патогенезе инфекционного процесса остаётся неясной [4, 5, 6]. Обнаружение антител к этому белку в сыворотке крови пациентов, инфицированных ВГС, указывает на его экспрессию в процессе естественного течения гепатита С. В ряде исследований установлено, что антитела к данному белку имеют около 25% пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС) и 50% больных ХГС с первичным раком печени [7, 8].

Целью данного исследования была отработка методики выявления антител к белку F ВГС в образцах сыворотки крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием синтетического пептида.

Материал и методы. В работе исследованы 165 образцов сыворотки крови, полученных от доноров станций переливания крови. В рамках регламентированного скрининга донорской крови все образцы проанализированы на наличие серологических маркеров к ВГС, вирусу гепатита В (ВГВ) и вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ). Из данных образцов

сформированы 5 панелей: панель № 1 включала анти-ВГС-позитивные образцы сыворотки крови ($n = 72$); панель № 2 – анти-ВИЧ-позитивные/анти-ВГС-позитивные образцы сыворотки крови ($n = 35$); панель № 3 – анти-ВИЧ-позитивные/анти-ВГС-негативные образцы сыворотки крови ($n = 7$); панель № 4 – HBsAg-позитивные/анти-ВГС-негативные образцы сыворотки крови ($n = 31$); панель № 5 – анти-ВГС-негативные/анти-ВИЧ-негативные/HBsAg-негативные образцы сыворотки крови ($n = 20$).

Синтетический пептид F10 получен путём твёрдофазного синтеза (ООО «НПФ Верта», г. Санкт-Петербург). Последовательность аминокислот синтетического пептида (110–131 а.о.) соответствовала антигенной детерминанте белка F/core+1/ARFP изолятов ВГС субтипа 1b.

Иммуногенные свойства синтетического пептида F10 изучены на лабораторных животных (мышах). Для получения гипериммунных сывороток иммунизировали самок мышей линии BALB/c в возрасте 12 нед (массой 35 г). Синтетический пептид F10 растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия в концентрации 1 мг/мл, смешивали с равным объёмом пол-

Таблица 1
Результаты выявления антител к белку F ВГС в образцах сыворотки крови

Панель	Количество образцов	Анти-F-позитивные образцы, n (%)
№ 1 – анти-ВГС(+)	72	7 (9,7)
№ 2 – анти-ВИЧ(+)/анти-ВГС(+)	35	7 (20,0)
№ 3 – анти-ВИЧ(+)/анти-ВГС(-)	7	0
№ 4 – HBsAg(+)/анти-ВГС(-)	31	0
№ 5 – анти-ВГС(-)/анти-ВИЧ(-)/HBsAg(-)	20	0
Всего...	165	14 (8,5)

Таблица 2

Антитела к белку F ВГС в образцах сыворотки крови панелей № 1 и № 2

Показатель	Анти-ВГС(+)	Анти-ВИЧ(+)/ анти-ВГС(+)	Всего
Анти-F(+)	7	7	14
Анти-F(-)	65	28	93
Всего...	72	35	107

ного адъюванта Фрейнда (ПАФ) и вводили подкожно по 200 мкл. Мышей иммунизировали 4-кратно с интервалом 2 нед. Кровь забирали тотально через 12 дн после последнего введения антигена. Полученные сыворотки алиquotировали и хранили при температуре -20°C.

Синтетический пептид F10 сорбировали в лунках 96-луночных планшетов фирмы «NUNC» (Дания) в 0,02 М бикарбонатно-карбонатном буферном растворе с pH 9,6 в течение 24 ч при комнатной температуре. Для блокировки свободных центров связывания на планшетах использовали фосфатно-солевой раствор с pH 7,2 с добавлением 0,1% Tween-20 (ФСР-Т) и 1% бычьего сывороточного альбумина. Исследуемые образцы сыворотки крови вносили в лунки по 100 мкл в разведении 1:10 в буферном растворе. При анализе образцов сыворотки крови человека использовали пероксидазный конъюгат на основе моноклональных антител к тяжёлой цепи IgG человека; при анализе мышиной сыворотки крови - пероксидазный конъюгат на основе козьих поликлональных антител к IgG мыши, разведённый в растворе ФСР-Т, содержащем 1% сыворотки крупного рогатого скота. Субстратом служил раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина с перекисью водорода (ТМБ). Инкубацию осуществляли в течение 45 мин при температуре 37°C. После каждой инкубации планшет промывали раствором ФСР-Т 5 раз. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 450 нм, референс-фильтр 630 нм. Результаты анализа оценивали по величине коэффициента позитивности (КП) - отношению оптической плотности (ОП) исследуемого образца к критической оптической плотности (ОПкрит), где ОПкрит = 0,2 + ОП_{кр} K(-) (ОП_{кр} K(-) - среднее значение ОП для отрицательного контроля). Положительными считали образцы, величина КП которых больше 2,0.

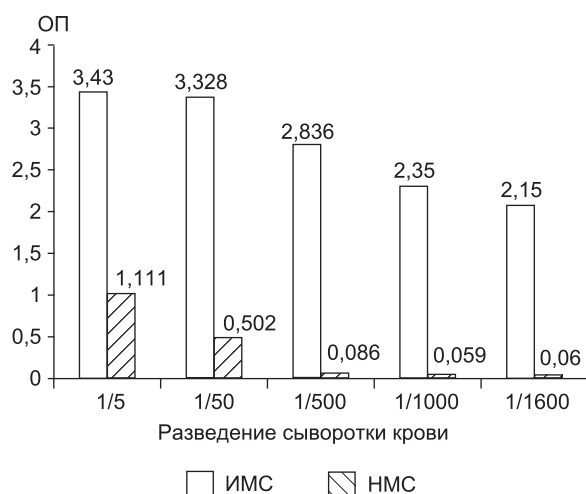


Рис.1. Показатели ОП при различных разведениях образцов иммунной мышиной сыворотки (ИМС) и неиммунной мышиной сыворотки крови (НМС).

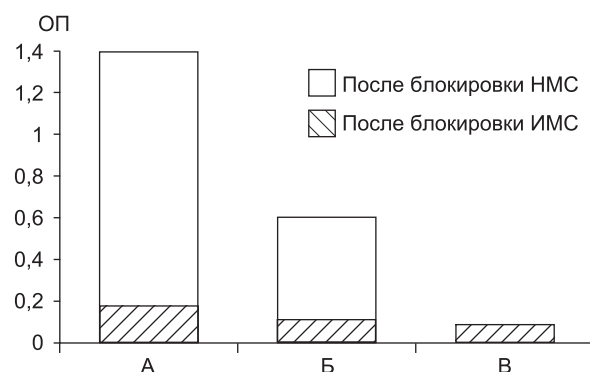


Рис.2. Значения ОП после блокировки синтетического пептида ИМС и НМС при анализе пулированных анти-ВГС-позитивных образцов сыворотки крови из панели 1 (А), анти-ВИЧ-позитивных/анти-ВГС-позитивных образцов сыворотки крови панели 2 (Б) и пулированных анти-ВГС-негативных/анти-ВИЧ-негативных/НВsAg-негативных образцов сыворотки крови из панели 5 (В).

Для оценки статистической значимости отличий между панелями № 1 (анти-ВГС- позитивные образцы сыворотки крови) и № 2 (анти-ВИЧ-позитивные/анти-ВГС-позитивные сыворотки крови) для качественных признаков применяли критерий хи-квадрат (χ^2). Статистически значимыми считались отличия при $p < 0,05$.

Результаты. Антитела к синтетическому пептиду F10 в образцах сыворотки крови мышей определяли методом ИФА после последней иммунизации. В сыворотке крови интактных мышей специфические антитела к синтетическому пептиду не выявлялись. В образцах сыворотки крови иммунизированных мышей титр антител к пептиду F10 составил 1:1600 (рис. 1), что свидетельствует об иммуногенности синтезированного пептида.

В образцах сыворотки крови, полученных от доноров, антитела к белку F ВГС определяли, используя метод ИФА. При отработке методики постановки ИФА была определена оптимальная концентрация пептида в составе иммуносорбента. Для этого в лунки планшета сорбировали синтетический пептид F10 в концентрациях 2; 5 и 10 мкг/мл. Иммунную (ИМС) и нормальную мышиные сыворотки (НМС) вносили в разведении 1:400 и измеряли ОП, используя конъюгат на основе козьих поликлональных антител к IgG мыши (рис. 2). Концентрация пептида для сорбции, при которой наблюдались максимальные различия между значениями ОП положительного образца и контрольных отрицательных образцов, не содержащих антител к ВГС, составила 5 мкг/мл.

Образцы сыворотки крови из 5 сформированных панелей проанализировали с учётом выбранных оптимальных параметров постановки ИФА. Доля обнаружения положительных образцов сыворотки крови с КП более 2,0 для каждой панели приведена в табл. 1. Антитела к белку F не определялись в анти-ВГС-негативных/анти-ВИЧ-негативных/НВsAg-негативных образцах сыворотки крови, а также среди анти-ВИЧ-позитивных/анти-ВГС-негативных, НВsAg-позитивных/анти-ВГС-негативных образцов. На основании критерия хи-квадрат (табл. 2) статистически значимых различий между образцами сыворотки крови панелей № 1 и № 2 не выявлено ($\chi^2 = 2,1876$; $p = 0,139$).

Положительные образцы из панели № 1 были пулированы. Аналогично пулированы положительные образцы из панели № 2 и отрицательные образцы из панели № 5. Для доказательства специфичности синтезированного пептида F10 проведён ИФА с предварительной блокировкой пептида F10 иммунной мышиной сывороткой. Для этого в лунки планшета с сорбированным пептидом вносили растворы им-

мунной и неиммунной мышинной сыворотки крови в разведении 1:400. Инкубировали 45 мин при температуре 37°C, отмывали планшет раствором ФСП-Т 5 раз и далее проводили анализ, как описано выше. Как показано на рис. 2, ИМС блокирует сайты связывания сорбированного пептида и снижает значения ОП для положительных образцов из панелей № 1 и № 2, что доказывает специфичность пептида F10.

Заключение. В ходе проведённого исследования оптимизированы основные параметры постановки ИФА для обнаружения антител к синтетическому пептиду F10, соответствующему антигенной детерминанте белка F/core+1/ARFP изолятов ВГС субтипа 1b. Доказана иммуногенность и иммунохимическая активность синтетического пептида F10.

Финансирование. Исследование частично поддержано грантом молодых учёных ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 4, 6-8 см. REFERENCES)

1. Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Аналитический обзор. 10 выпуск. Покровский В.И., Тотолян А.А., ред. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2016.
2. Калинина О.В., Дмитриев А.В. Структурно-функциональная организация генома и жизненный цикл вируса гепатита С. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2015; 2: 9-12.
5. Калинина О.В. Молекулярно-генетические механизмы эволюции вируса гепатита С. Дис. ... д-ра биол. наук. СПб.; 2013.

REFERENCES

1. *Viral hepatitis in Russian Federation. Analytical review. 10th edition.* [Virusnye gepatity v Rossiyskoy Federatsii. Analiticheskiy obzor. 10 vypusk]. Pokrovskiy V.I., Totolyan A.A., eds. St.Peterburg: Nauchno-issledovatel'skiy institute epidemiologii i mikrobiologii imeni Pastera, 2016. (in Russian)
2. Kalinina O.V., Dmitriev A.V. Structural and functional genome organization and life cycle of hepatitis C virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2015; 2: 9-12. (in Russian)
3. Budkowska A., Kakkanas A., Nerrienet E., Kalinina O., Maillard P. et al. Synonymous Mutations in the Core Gene Are Linked to Unusual Serological Profile in Hepatitis C Virus Infection. *PLoS ONE*. 2011; 6(1): e15871.
4. Vassilaki N., Mavromara P. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 40503-13.
5. Kalinina O.V. Molecular genetic mechanisms of the evolution of the hepatitis C virus. Diss. St.Peterburg; 2013. (in Russian)
6. Li H.C., Ma H.C., Yang C.H., Lo S.Y. Production and pathogenicity of hepatitis C virus core gene products. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(23): 7104-22.
7. Mavromara P., Dalagiorgou G., Vassilaki N., Foka P., Boumlic A., Kakkanas A. et al. High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gen. Vir.* 2011; 92: 1343-51.
8. Dalagiorgou G., Vassilaki N., Foka P., Boumlic A., Kakkanas A., Kochliou E. et al. High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gen. Virol.* 2011; 92 (6): 1343-51.

Поступила 01.11.17

Принята к печати 08.11.17

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.153.937-008.61-092:612.6.05]-07

Волков А.Н.^{1,2}, Хабиева С.М.², Смирнова Е.Ю.², Ларионов А.В.²

ГЕНОДИАГНОСТИКА МУТАЦИЙ *UGT1A1* В ПРАКТИКЕ СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЫ

¹ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, 650029, г. Кемерово, Россия;

²ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650043, г. Кемерово, Россия

Выявление мутаций гена УДФ-глюкуронилтрансферазы *A1* (*UGT1A1*) имеет важное практическое значение. Носители мутантных генотипов, главным образом *28/*28, характеризуются сниженной функцией глюкуронирования и экскреции ряда эндогенных и экзогенных токсинов. Установлена чёткая ассоциация некоторых форм доброкачественной гипербилирубинемии (особенно синдрома Жильбера) с мутациями в промоторной и экзонной областях *UGT1A1*. С другой стороны, носители различных генотипов *UGT1A1* существенно различаются особенностями метаболизма ряда распространённых лекарственных препаратов (иринотекана, белинотата и др.), что требует дозирования этих лекарств с учётом индивидуального генетического статуса пациента.

Проведён анализ современных технических решений для генодиагностики мутаций *UGT1A1*. Особое внимание уделено обсуждению отечественных разработок для генотипирования *UGT1A1*. Сделано заключение о небольшом ассортименте соответствующих тест-систем российского производства. В ряде случаев нет данных об их основных аналитических и диагностических характеристиках. При разработке дизайна диагностикумов используются различные методические подходы, что позволяет потенциальным потребителям сделать выбор в зависимости от финансово-технических возможностей лаборатории, объёма проводимых исследований, квалификации персонала. Для инструментального обеспечения исследования *UGT1A1* достаточным может быть лабораторное оборудование отечественных производителей, что позволило бы построить весь аналитический цикл на основе принципа импортозамещения.

Ключевые слова: генодиагностика, *UGT1A1*, синдром Жильбера, рак, иринотекан.

Для корреспонденции: Волков Алексей Николаевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ЦНИЛ ФГБОУ ВО КемГМУ, доц. каф. генетики ФГБОУ ВО КемГУ; e-mail: volkov_alex@rambler.ru

Для цитирования: Волков А.Н., Хабиева С.М., Смирнова Е.Ю., Ларионов А.В. Генодиагностика мутаций *UGT1A1* в практике современной медицины. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (3): 186-192. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-186-192>

Volkov A.N.^{1,2}, Khabieva S.M.², Smirnova E.Yu.², Larionov A.V.²

THE GENETIC DIAGNOSTICS OF MUTATIONS *UGT1A1* IN PRACTICE OF MODERN MEDICINE

¹The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Kemerovo State Medical University" of Minzdrav of Russia, 650029, Kemerovo, Russia

²The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Kemerovo State University", 650043, Kemerovo, Russia

*The detection of mutations of the gene of UDF-glucuronyltransferase A1 (*UGT1A1*) has an important practical value. The carriers of mutant genotypes, mainly *28/*28, are characterized by a reduced function of glucuronidation and excretion of a number of endogenous and exogenous toxins. A precise association of particular forms of benign hyperbilirubinemia (especially Gilbert's syndrome) with mutations in promoter and exonic areas of *UGT1A1* is established. On the other hand, carriers of various genotypes of *UGT1A1* differ significantly in metabolism characteristics of a number of common medications (irinotecan, belinostat, etc.), that requires a dosage of these medications considering individual genetic status of patient.*

*The analysis of modern technical solutions for genetic diagnostics of *UGT1A1* mutations is carried out. The particular attention is paid to discussion of national developments for genetic typing of *UGT1A1*. The conclusion is made concerning small assortment of corresponding test-systems of Russian production. In some cases, there is no data about their main analytical and diagnostic characteristics. When developing design of diagnosticums, various methodological approaches are applied that allow to potential consumers to choose depending on financial technical capabilities of laboratory, amount of implemented analyses, qualification of personnel. To support *UGT1A1* research instrumentally, laboratory equipment of national manufacturers can be sufficient that would permit to organize entire analytical cycle on the basis of import substitution principle.*

Key words: genetic diagnostics, *UGT1A1*, Gilbert's syndrome, cancer, irinotecan.

For citation: Volkov A.N., Khabieva S.M., Smirnova E.Yu., Larionov A.V. The genetic diagnostics of mutations *UGT1A1* in practice of modern medicine. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(3): 186-192. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-3-186-192>

For correspondence: Volkov A.N., .candidate of biological sciences, senior researcher of the Central Research Laboratory of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Kemerovo State Medical University", associate professor of the chair of genetics of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Kemerovo State University", e-mail: volkov_alex@rambler.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 07.11.2017
Accepted 22.11.2017

Введение. УДФ-глюкуронилтрансферазы (UGTs) – обширное суперсемейство ферментов, участвующих в биотрансформации малорастворимых в биологических жидкостях молекул как эндогенного, так и экзогенного происхождения. UGTs осуществляют конъюгацию субстратов с глюкуроновой кислотой, что повышает их растворимость и скорость выведения из организма. Таким образом происходит экскреция ряда потенциально токсичных метаболитов (билирубина, желчных кислот, ретиноидов), гормонов (тиреоидных и стероидных) и пр. [1]. Отдельные представители семейства обладают достаточно выраженной субстратной специфичностью. Так, УДФ-глюкуронилтрансфераза типа A1 (*UGT1A1*) обладает высоким сродством главным образом к билирубину, определяя его метаболизм и дальнейшую кинетику в организме [2, 3].

Ген *UGT1A1* привлекает внимание клиницистов по двум причинам. С одной стороны, установлена чёткая ассоциация некоторых форм доброкачественной гипербилирубинемии (особенно синдрома Жильбера – СЖ) с мутациями в промоторной и экзонной областях гена [4–8]. С другой – различные генетические варианты *UGT1A1*, обладая различными функциональными особенностями, производят белковые продукты с неодинаковой трансферазной активностью в отношении таких клинически значимых препаратов, как иринотекан, что требует дозирования этих лекарств с учётом индивидуального генетического статуса пациента [9, 10].

Целью настоящего обзора является определение области использования генодиагностики мутаций *UGT1A1* в практической медицине и анализ современных технических решений для выполнения данного исследования.

Клиническое значение выявления мутаций *UGT1A1*. Генетический полиморфизм *UGT1A1* при синдроме Жильбера.

СЖ – самая частая форма наследственного пигментного гепатоза. Характерным внешним признаком патологии является иктеричность кожных покровов, склер и слизистых оболочек. Отмечаются разнообразные диспептические явления и астеновегетативный синдром. Симптомы патологии обычно возникают на фоне физического перенапряжения, инфекционных заболеваний, после голодания или низкокалорийной диеты, при приёме некоторых лекарственных препаратов. Лабораторным показателем считается повышение уровня билирубина в крови в основном за счёт непрямой фракции [4, 11]. При этом как физикальные, так и биохимические критерии заболевания ненадежны и явно недостаточны для установления диагноза, особенно у детей до пубертатного возраста [12].

Основные проявления СЖ носят транзиторный характер и, как считается, не ведут напрямую к тяжёлым поражениям печени. Вместе с тем СЖ часто сопровождают иные заболевания желудочно-кишечного тракта [11], а вероятным отдалённым следствием синдрома у некоторых пациентов может быть желчнокаменная болезнь [13, 14]. Данная тенденция усиливается при сочетании СЖ с сопутствующими заболеваниями. Так, наличие СЖ у больных серповидноклеточной анемией увеличивает вероятность развития желчнокаменной болезни более чем в 6 раз [4].

Биохимическая и генетическая основа СЖ в настоящее время однозначно установлена. Снижение активности фермента *UGT1A1* при этом заболевании определяется либо изменением уровня экспрессии *UGT1A1*, либо структурными модификациями самого фермента. В первом случае обычно обнаруживается изменение числа динуклеотидных повторов *TA* в промоторной области гена (полиморфный сайт

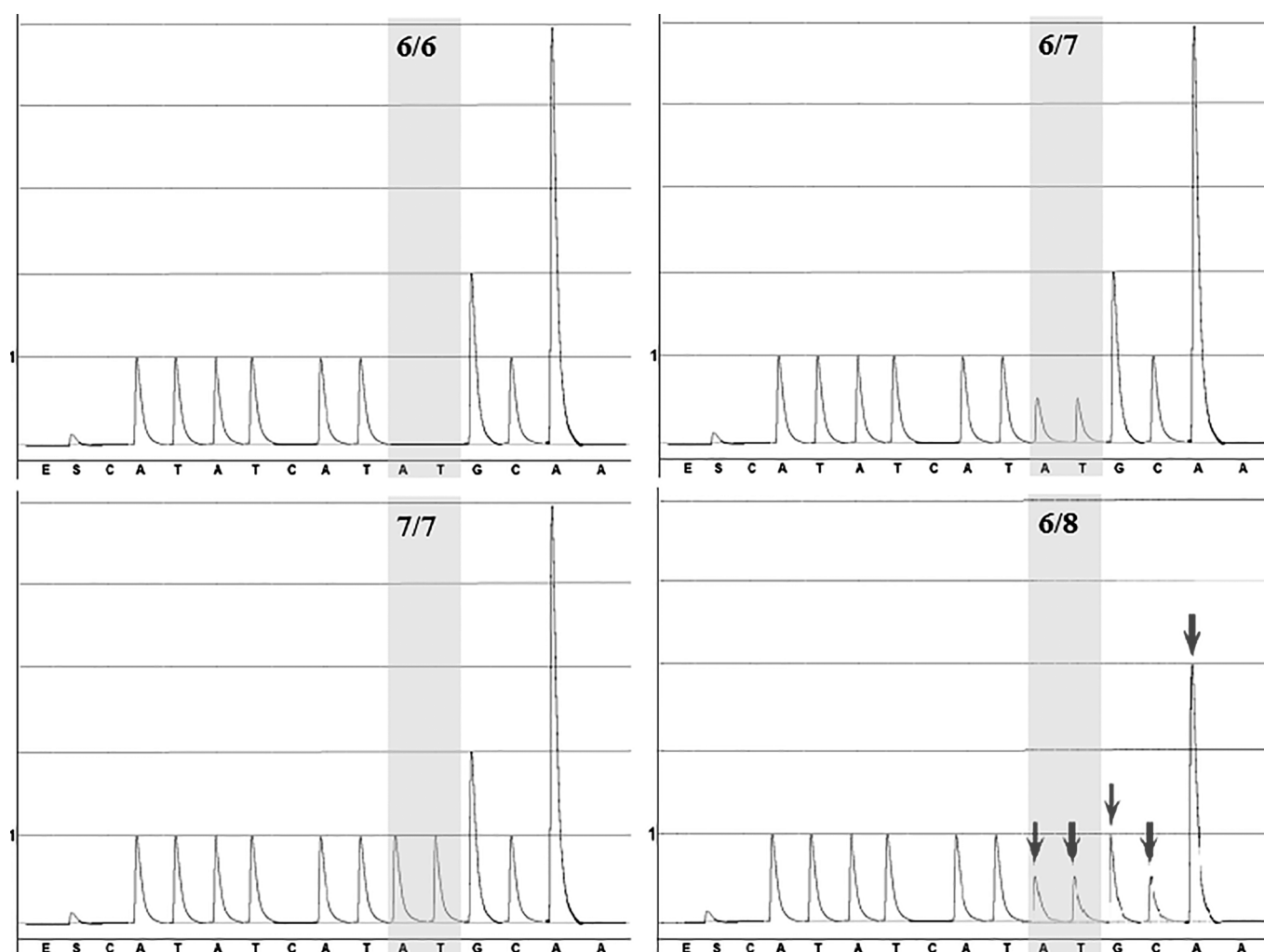


Рис. 1. Графическое представление результатов пиросеквенирования *UGT1A1* (*rs8175347*) при использовании тест-системы «АмплиСенс Пироскрин *UGT1A1*-скрин»

Примечание. На графиках указано число выявленных повторов ТА (6/7/8) в локусе *rs8175347* и соответствующий генотип. Стрелками указаны пики, по высоте которых проводится детекция генотипа с 6 и 8 ТА-повторами.

rs8175347). Так, если аллель «дикого типа» **1* характеризуется шестью tandemными повторами ТА, то при мутациях, ассоциированных с СЖ, их число увеличивается до семи (аллель **28*) или восьми (аллель **37*). Ещё одна вариация промоторной области характеризуется уменьшением числа повторов ТА до пяти (аллель **36*) и приводит к повышению активности *UGT1A1* без патологических проявлений [5]. Установлено, что носители генотипа **1/*28* и особенно **28/*28* имеют в среднем более высокий уровень билирубина в сыворотке крови, чем гомозиготы **1/*1* [4, 8].

Известны также мутации в экзонной области гена, снижающие активность фермента *UGT1A1* за счёт его структурных изменений. Таковы нуклеотидные замены 211G>A (*rs 4148323*) и 686C>A (*rs 35350960*), приводящие к аминокислотным заменам в белке Gly71Arg и Pro229Gln соответственно. Имеются и другие мутации *UGT1A1*, редкие или специфичные для отдельных этнических групп и не представляющие большого интереса с клинической точки зрения при рассмотрении европеоидных популяций [6, 7].

Популяционно-генетические исследования мутаций *UGT1A1* показывают, что большинство случаев СЖ связаны с наличием у пациента гомозиготного генотипа **28/*28*, так как именно аллель **28* является наиболее распространённым мутантным вариантом *UGT1A1*. Частота указанного аллеля

среди представителей европеоидной расы варьирует от 30,9 до 36,1%, что соответствует ожидаемой частоте гомозигот **28/*28* в пределах 9,5–13,0%. Суммарная частота прочих мутаций, снижающих активность *UGT1A1*, в большинстве исследованных популяций не превышает 1% [5, 6, 8]. Таким образом, около 10% населения европейских стран являются потенциальными или уже выявленными больными с СЖ. Данных о генетическом полиморфизме *UGT1A1* у населения России крайне мало. Так, Е. Shatalova и соавт. [15] в выборке из 121 женщины русской национальности выявили аллели **1* и **28* с частотой 68,22 и 31,78%. При этом частота клинически значимого генотипа **28/*28* составила лишь 5,93%.

Генотипирование мутаций *UGT1A1* для персонализированной фармакотерапии. Будучи ферментом группы трансфераз, *UGT1A1* является важным элементом системы детоксикации организма, защищая его от воздействия потенциально опасных метаболитов и ксенобиотиков. Нормальными субстратами для *UGT1A1* являются билирубин и сходные по структуре стероиды, а перечень субстратов-ксенобиотиков фермента включает такие широко используемые лекарственные средства, как иринотекан.

Иринотекан является препаратом первой линии химиотерапии при лечении колоректального рака, хотя назначается и при других онкопатологиях (глиобластоме, раке лёгкого,

желудка, поджелудочной железы и пр.). Терапевтический эффект препарата связан с образованием в организме его активного метаболита SN-38, который, в свою очередь, подвергается глюкуронированию UGT1A1, дезактивируется и выводится [2].

Наиболее частыми токсическими эффектами накопления SN-38 являются нейтропения, тяжёлая диарея, а также тошнота и рвота, которые регистрируются примерно у 34, 20 и 13% пациентов соответственно. Более того, по наблюдениям отдельных авторов, принятая в США при монотерапии иринотеканом терапевтическая доза 350 мг/м² может быть летальной для 1,6% пациентов за счёт избыточной токсичности препарата [16].

Токсические эффекты иринотекана достоверно чаще регистрируются у пациентов со сниженной функцией UGT1A1 (обычно с генотипом *28/*28) [17–20]. Для лиц с генотипом *1/*1 максимальная допустимая разовая доза препарата составляет 850 мг, для носителей генотипа *1/*28 – 700 мг, генотипа *28/*28 – 500 мг [21]. Эти данные ставят вопрос о необходимости предварительного определения генотипа UGT1A1 у пациента и назначении индивидуальной схемы приёма препарата.

Несколько независимых исследовательских групп пришли к заключению о целесообразности снижения начальной дозы иринотекана, назначаемой пациентам с генотипом *28/*28. В этом случае стандартная (принятая в странах Западной Европы) доза препарата 180 – 230 мг/м² должна быть уменьшена на 25 – 30%, по крайней мере в первом цикле приёма лекарства. Высокие дозы иринотекана (более 240 мг/м²) могут назначаться только пациентам с генотипом *1/*1 [6]. В США, где принята иная схема фармакотерапии, разовая доза до 250 мг/м² может быть прописана вне зависимости от генотипа. При необходимости назначения более высоких доз препарата учитывается генотип пациента, гомозиготам с пониженной функцией гена снижают дозу на 30% [22].

Белиностант используется для лечения периферической Т-клеточной лимфомы. Вещество подвергается глюкуронированию преимущественно UGT1A1 [23], поэтому его фармакологическая эффективность и кинетика в организме напрямую зависят от активности фермента. Недостаточная скорость выведения препарата часто приводит к разнообразным токсическим реакциям: тошноте, рвоте, анемии, пирексии и состоянию общей усталости. Уже на основании доклинических исследований была сформулирована рекомендация снижать терапевтическую дозу препарата на 25% пациентам, гомозиготным по аллелю *28 UGT1A1 [10].

В отличие от иринотекана и белиностана ряд лекарственных препаратов не даёт специфических побочных эффектов, а провоцирует развитие на фоне фармакотерапии симптомокомплекса СЖ. Это означает, что лекарство само по себе не является субстратом UGT1A1, а лишь вызывает проявление дисфункции печени, характерной для носителей мутаций UGT1A1 либо ингибирует экспрессию гена или активность фермента.

Так, пазопаниб, используемый при лечении распространённого почечно-клеточного рака и распространённой саркомы мягких тканей, метаболизируется печёночными цитохромами, прежде всего изоферментом CYP3A4. У многих пациентов, принимавших 800 мг препаратов ежедневно, отмечались эпизоды гипербилирубинемии. У гомозиготных носителей аллеля *28 UGT1A1 частота событий составляла около 50%, в то время как у гетерозигот *1/*28 и гомозигот *1/*1 лишь 13 и 7% [24].

Аналогично приём нилотиниба больными хроническим миелоидным лейкозом приводил к гипербилирубинемии преимущественно у пациентов с генотипом *28/*28 или другими генетическими вариантами, снижающими активность фермента UGT1A1 [25, 26]. А относительный риск гипер-

билирубинемии 3-й степени (уровень общего билирубина в 3–10 раз выше верхней границы нормы) для носителей этого генотипа повышен в 4,5 раза по сравнению с прочими индивидами [25].

Атазанавир – ингибитор вирусной протеазы ВИЧ в качестве побочного эффекта при антиретровирусной терапии даёт тяжёлую гипербилирубинемия. Установлен высокий риск развития данного осложнения при наличии у пациента аллеля *28 UGT1A1, особенно в гомозиготном состоянии. Предсказательная ценность генотипа *28/*28 ещё более возрастает, если во внимание принимать только вероятность возникновения гипербилирубинемии 3-й и 4-й степени [27–29]. На основании обобщения имеющихся данных некоторые исследователи предлагают назначать пациентам с генотипом *28/*28 вместо атазанавира альтернативные препараты. В случае невозможности такой замены ожидать гипербилирубинемии, по крайней мере, в 20% случаев [30].

Кроме перечисленных лекарственных средств с UGT1A1, возможно, взаимодействуют этопозид, ралоксифен, ралтегравир, индакатерол, оланзапин [10, 31]. Имеются также отдельные сообщения об ингибировании фермента препаратами сорафениб, траниласт, индинавир, что приводит к манифестации СЖ у носителей генотипа *28/*28 UGT1A1 [10]. По мере дальнейшего накопления фармакогенетических данных и появления новых лекарственных препаратов диагностическое значение выявления мутаций UGT1A1, вероятно, будет только возрастать.

Современные методы генотипирования мутаций UGT1A1. Генодиагностика мутаций UGT1A1: предпосылки и поиск решений. В 2005 г. FDA рекомендовала проводить генотипирование UGT1A1 для определения индивидуальной схемы приёма иринотекана, что нашло отражение в инструкции по применению лекарственного препарата [9]. В связи с высокой популяционной частотой генотипа *28/*28 и его выраженным клиническим эффектом, возник вопрос о необходимости внедрения в медицинскую практику методов выявления мутаций UGT1A1.

Мировыми разработчиками диагностических тест-систем были предложены различные алгоритмы генотипирования UGT1A1, из них наибольшую известность получил молекулярно-генетический тест «Invader UGT1A1 Molecular Assay», предлагаемый как часть рекомендации FDA. В основу метода положена специфическая гибридизация зонда-репортёра с тем или иным аллелем изучаемого полиморфного участка UGT1A1. Часть зонда в момент присоединения к ДНК отщепляется и накапливается в растворе. На следу-

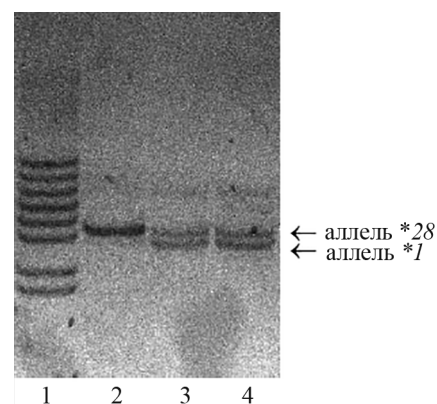


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР локуса rs8175347 UGT1A1 и молекулярного стандарта при использовании тест-системы «UGT1A1-STR»

Примечание. 1 – молекулярный стандарт; 2 – генотип *28/*28; 3, 4 – генотип *1/*28.

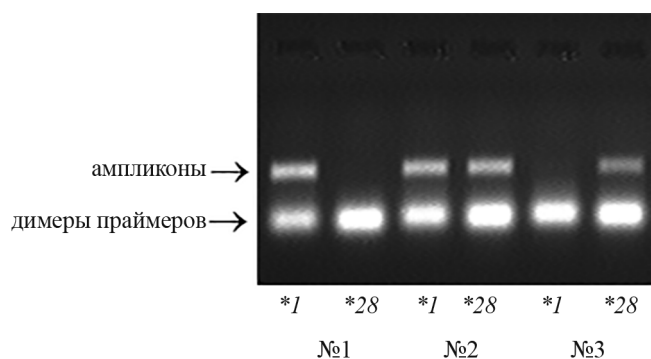


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР локуса *rs8175347 UGT1A1* при использовании тест-системы «Синдром Жильбера»

Примечание. Генотипы образцов: №1 – **1/*1*; №2 – **1/*28*; №3 – **28/*28*.

шем этапе в другой реакционной смеси накопленные фрагменты зонда-репортёра инициируют ещё одну химическую реакцию, сопровождающуюся накоплением флуоресценции, которая регистрируется флуориметром [5, 32]. Этот несложный с технической точки зрения и показавший хорошие аналитические характеристики метод требует для реализации наличия дорогостоящего оборудования и реагентов, что делает высокой стоимость лабораторного анализа.

В качестве альтернативного метода была предложена схема выявления мутаций *UGT1A1* с использованием ДНК-микрочипов. При этом диагностическая панель может включать зонды для многих мутаций в изучаемом гене, что недоступно при использовании «Invader *UGT1A1* Molecular Assay». Более того, в панель могут быть включены различные гены, представляющие интерес в том или ином аспекте. Таков, например «PHARMASchip», позволяющий одновременно проводить генотипирование не только *UGT1A1*, но и ряда других генов, задействованных в метаболизме различных лекарственных средств. Высокие аналитические показатели теста были подтверждены в ходе независимых испытаний [33]. Вместе с тем для выполнения исследования, как и ранее, требуется сложное оборудование, а анализ большого количества мутаций для каждого пациента необоснованно повышает цену исследования, так как далеко не все гены и мутации представляют интерес в конкретной ситуации.

Многочисленные клиничко-генетические исследования, проведённые с момента опубликования рекомендаций FDA и включавшие генотипирование *UGT1A1*, были основаны на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) в различных её модификациях. Для этих исследований характерны использование реагентов «домашнего приготовления» и собственный дизайн реакционных смесей. Проверка надёжности получаемых результатов с помощью референсных методов обычно не проводится [4, 8, 15]. По этим причинам непосредственное внедрение данных методических подходов в медицинскую практику невозможно.

Методы генотипирования *UGT1A1* не только должны отвечать требованиям надёжности, оперативности исполнения, простоты постановки и интерпретации полученных результатов, но и обладать низкой себестоимостью, чтобы стать максимально доступной медицинской услугой для населения. Соответствующие тест-системы должны в идеале производиться на территории Российской Федерации для выполнения требования импортозамещения на рынке лабораторных диагностикомов. Учитывая это, далее нами были охарактеризованы коммерческие тест-системы отечественных производителей, предназначенные для генотипирования *UGT1A1*.

Выявление мутаций *UGT1A1* путём секвенирования.

Секвенирование целого гена или его части подразумевает прямое определение нуклеотидной последовательности изучаемого участка ДНК. На протяжении десятилетий ключевым методом такого чтения генома было секвенирование по Сэнгеру. Современные технологические решения отличаются разнообразием подходов к задаче и большей продуктивностью с точки зрения как скорости выполнения анализа, так и объёма получаемой информации. Однако сложность проведения секвенирования и анализа получаемого сиквенса, а также высокая цена исследования остаются главными препятствиями на пути повсеместного внедрения этих методов в лабораторную практику медицинских учреждений. По этой причине количество коммерческих тестов для секвенирования крайне мало.

Единственной доступной на российском рынке тест-системой для секвенирования *UGT1A1*, по нашим данным, является набор реагентов «АмплиСенс Пироскрин *UGT1A1*-скрин» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии). Система рассчитана на выявление вариации числа динуклеотидных повторов *TA* в промоторной области *UGT1A1* (*rs8175347*) путём пиросеквенирования на приборах серии PyroMark («QIAGEN», Германия). В основе данного метода лежит детекция пирофосфата, который высвобождается при каждом цикле включения нуклеотида в синтезируемую нить ДНК. В дальнейшем пирофосфат инициирует хемилюминесцентный сигнал, регистрируемый системой.

Как и всякое секвенирование, пиросеквенирование позволяет выявить все аллели в изучаемой области гена, включая такие редкие, как **36* и **37*. Это является несомненным преимуществом данной методики. По результатам собственных лабораторных испытаний разработчика набор обладает высокой аналитической и диагностической чувствительностью и специфичностью (99–100%).

Технология пиросеквенирования включает несколько стадий. Сначала проводится амплификация целевого участка образца ДНК. Затем выполняется пробоподготовка ПЦР-продукта. Данная стадия достаточно трудоёмка, требует использования дополнительного лабораторного оборудования и включает ряд ручных манипуляций, увеличивающих время анализа и повышающих зависимость результата от квалификации и опыта персонала. На завершающем этапе в автоматическом режиме проводится собственно пиросеквенирование подготовленных ПЦР-образцов.

Анализ данных выполняется с помощью программного обеспечения путём сравнения полученных результатов с референсной нуклеотидной последовательностью (рис. 1)¹. На этом этапе возможны определённые затруднения в интерпретации результатов. Как отмечают разработчики, при секвенировании повторяющихся последовательностей в гомозиготных образцах может детектироваться повышенный уровень фонового сигнала. Для гомозиготных образцов допустимо повышение фоновых значений в полиморфной области до 20%. Для гетерозигот допустимо колебание отношения аллелей **1* к **28* от 40% к 60%, до 60% к 40%. При этом образцы, в которых детектированы частоты аллелей, находящиеся в диапазоне 20–40%, требуют перестановки.

Дополнительную сложность представляет анализ редких аллелей *UGT1A1*. Дело в том, что порядок подачи нуклеотидов в реакционную смесь по умолчанию рассчитан на выявление наиболее частых аллелей (**1* и **28*). При подозрении на наличие в образце пяти или восьми *TA*-повторов необходимо провести повторный анализ с изменённым порядком подачи нуклеотидов и(или) изменённой последовательностью нуклеотидов для анализа.

¹ http://www.interlabservice.ru/upload/iblock/217/piroskrin-ugt1a1-skrin_zaregistr_cha_150716.pdf

Учитывая сказанное, можно заключить, что пиросеквенирование *UGT1A1* является достаточно трудоёмкой технологией с использованием дорогостоящего оборудования и реагентов. Проведение анализа и интерпретация полученных данных должны выполняться высококвалифицированным персоналом. Все это неизбежно отразится на себестоимости анализа. Некоторого её снижения можно ожидать в случае одновременного анализа большого количества клинических образцов благодаря рациональному использованию реагентов. Анализ единичных образцов (что не редкость в лабораторной практике), напротив, экономически невыгоден.

Диагностика мутаций *UGT1A1* в формате ПЦР/детекция. ПЦР является обязательной стадией современного молекулярно-генетического анализа. В идеале она должна оставаться основным или единственным (в случае ПЦР с детекцией кинетики в реальном времени) этапом исследования. В связи с этим большой интерес представляют наиболее простые тест-системы на основе ПЦР-диагностики мутаций *UGT1A1*. Кроме высокой срочности исследований, лёгкости исполнения и интерпретации результатов такой формат гарантирует низкую стоимость медицинской услуги даже при работе с единичными клиническими образцами.

Поиск отечественных коммерческих диагностикомов для анализа мутаций *UGT1A1* в формате ПЦР/детекция позволил выявить лишь две тест-системы. ФГБУН ИБХФ РАН разработана панель «ТАПОТИЛИ» для генотипирования высокополиморфных локусов генома человека, используемых при установлении биологического родства. Частью панели является комплект реагентов «*UGT1A1*-STR» для обнаружения мутаций в промоторной области *UGT1A1*. ООО НПФ «Литех», в свою очередь, предлагает линейку реагентов «SNP-ЭКСПРЕСС» для выявления различных полиморфизмов в геноме человека, в том числе набор «Синдром Жильбера» для генотипирования *rs8175347*.

Обе тест-системы рассчитаны на ПЦР-амплификацию полиморфного участка *UGT1A1* на любом амплификаторе, например «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия), с последующей электрофоретической детекцией результата ПЦР. К сожалению, разработчики не предоставляют данных о лабораторных испытаниях своих наборов. В то время как для повышения доверия к диагностикомам до внедрения их в широкую медицинскую практику желательно исследование их чувствительности, специфичности и других аналитических и диагностических характеристик.

Набор «*UGT1A1*-STR» позволяет одновременно различить 4 варианта *rs8175347* с числом *TA*-повторов от пяти до восьми (аллели *36, *1, *28, *37). При этом используется одна пара праймеров, а в ходе амплификации в одной ПЦР-смеси возможно образование различных по длине продуктов-ампликонов. Детекция результата ПЦР осуществляется путём электрофореза в полиакриламидном геле в вертикальной камере, например «VE-20» (ООО «Компания Хеликон», Россия) (рис. 2). Последующее окрашивание гелей позволяет изучить полиморфизм длин амплифицированных фрагментов и сделать заключение о генотипе образца ДНК.

Специфика такого варианта электрофореза заключается в высокой разрешающей способности системы при различении ампликонов сопоставимой длины, что достигается достаточно большой продолжительностью процедуры. Повышение электрического напряжения позволяет несколько сократить время электрофореза. При этом возможны разогрев геля, потеря однородности электрическим полем и искажение полос ампликонов на электрофореграмме, что усложнит интерпретацию результата. Учитывая это, процедуру обычно проводят при пониженном напряжении в течение не менее 4–5 ч.

При работе с тест-системой «Синдром Жильбера» от ООО НПФ «Литех» выполняется аллельспецифическая ПЦР, в ко-

торой задействуются различные пары праймеров, специфичные к концевым участкам альтернативных аллелей *UGT1A1*. Таким образом, сами праймеры выполняют дискриминирующую функцию при различении вариантов *rs8175347*. Но при этом в одной ПЦР-пробирке выявляется только один из возможных аллелей. С учётом распространённости разных аллелей в популяциях человека и соответственно их диагностической значимости разработчики ограничили спектр выявляемых вариантов *UGT1A1* аллелями *1 и *28. В таком случае один клинический образец исследуется с помощью двух ПЦР-реакций.

Указанный формат ПЦР позволяет проводить детекцию продуктов амплификации в агарозном геле, более простом в приготовлении и эксплуатации, чем полиакриламидные гели, с использованием отечественного оборудования (например, камеры «SE-2», ООО «Компания Хеликон», Россия). Разрешающей способности системы должно быть достаточно лишь для разделения не израсходованных в ходе ПЦР праймеров и ампликонов, что достигается при концентрации агарозы в геле 3% и даже менее. Собственный опыт работы с данной тест-системой показывает, что в ходе горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле, проводимом при 200 В в течение 15 мин, ампликоны образуют чётко различимые дискретные полосы (рис. 3). Суммарное время стадии детекции (при внесении красителя для ДНК непосредственно в гель) составляет менее 1 ч.

Заключение. Генодиагностика мутаций *UGT1A1* имеет важное практическое значение в гастроэнтерологии, онкологии и ряде смежных медицинских областей. Анализ технических решений для генотипирования клинически значимых мутаций гена *UGT1A1* позволяет отметить, что на рынке лабораторных диагностикомов представлен небольшой ассортимент тест-систем, производимых в Российской Федерации. В ряде случаев нет данных об их основных аналитических и диагностических характеристиках, что крайне важно для повышения доверия к изделиям.

Положительным является то, что дизайн обсуждаемых наборов основан на использовании различных методических подходов. Это позволяет потенциальным потребителям сделать выбор в зависимости от финансово-технических возможностей лаборатории, объёма проводимых исследований, квалификации персонала. Наконец, существенно, что для инструментального обеспечения исследований вполне достаточным может быть лабораторное оборудование отечественных производителей, что потенциально позволит построить весь аналитический цикл на основе принципа импортозамещения.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-10, 13-33 см. REFERENCES)

1. Дубровина Г.М., Ботвиньев О.К., Колотилина А.И. Сочетание синдрома Жильбера с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2014; 24(3): 13-21.
2. Захарова И.Н., Пыков М.И., Калоева З.В., Катаева Л.А., Шишкина С.В., Бережная И.В., Резниченко Е.В., Молоткова Н.В. Апостериорная ценность клинических и лабораторных проявлений синдрома Жильбера у детей. *Педиатрическая фармакология*. 2011; 8(4): 101-4.

REFERENCES

1. Fujiwara R., Yokoi T., Nakajima M. Structure and protein-protein interactions of human UDP-glucuronosyltransferases. *Front Pharmacol*. 2016; 7: 10.3389/fphar.2016.00388.
2. Barbarino J.M., Haidar C.E., Klein T.E., Altman R.B. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for *UGT1A1*. *Pharmacogenet Genomics*. 2014; 24: 177-83.
3. Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltrans-

- ferase enzymes. *Pharmacogenomics J.* 2003; 3(3): 136–58.
4. Carpenter S.L., Lieff S., Howard T.A., Eggleston B., Ware R.E. UGT1A1 promoter polymorphisms and the development of hyperbilirubinemia and gallbladder disease in children with sickle cell anemia. *Am. J. Hematol.* 2008; 83(10): 800–3.
5. Palomaki G.E., Bradley L.A., Douglas M.P., Kolor K., Dotson W.D. Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. *Genet Med.* 2009; 11(1): 21–34.
6. Etienne-Grimaldi M.C., Boyer J.C., Thomas F., Quaranta S., Picard N., Loriot M.A., Narjoz C., Poncet D., Gagnieu M.C., Ged C., Broly F., Le Morvan V., Bouquie R., Gaub M.P., Philibert L., Ghiringhelli F., Le Guellec C. UGT1A1 genotype and irinotecan therapy: general review and implementation in routine practice. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2015; 29(3): 219–37.
7. Han F.F., Guo C.L., Yu D., Zhu J., Gong L.L., Li G.R., Lu Y.L., Liu H., An G.Y., Liu L.H. Associations between UGT1A1*6 or UGT1A1*6/*28 polymorphisms and irinotecan-induced neutropenia in Asian cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2014; 73(4): 779–88.
8. Hong A.L., Huo D., Kim H.J., Niu Q., Fackenthal D.L., Cummings S.A., John E.M., West D.W., Whittmore A.S., Das S., Olopade O.I. UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 gene polymorphisms and total bilirubin levels in an ethnically diverse cohort of women. *Drug Metab. Dispos.* 2007; 35(8): 1254–61.
9. Innocenti F., Ratain M.J. Pharmacogenetics of irinotecan: clinical perspectives on the utility of genotyping. *Pharmacogenomics.* 2006; 7(8): 1211–21.
10. Goey A.K., Figg W.D. UGT genotyping in belinostat dosing. *Pharmacol. Res.* 2016; 105: 22–7.
11. Dubrovina G.M., Botvin'yev O.K., Kolotilina A.I. Combination of Gilbert's syndrome and gastrointestinal diseases. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, hepatologii, coloproktologii.* 2014; 24(3): 13–21. (in Russian)
12. Zakharova I.N., Pykov M.I., Kaloyeva Z.V., Kataeva L.A., Shishkina S.V., Berejnaya I.V., Reznichenko E.V., Molotkova N.V. Gilbert's syndrome in children: contemporary diagnostic potentialities. *Pediatricskaya farmakologiya.* 2011; 8(4): 101–4. (in Russian)
13. Buch S., Schafmayer C., Völzke H., Seeger M., Miquel J.F., Sookoian S.C., Egberts J.H., Arlt A., Pirola C.J., Lerch M.M., John U., Franke A., von Kampen O., Brosch M., Nothnagel M., Kratzer W., Boehm B.O., Bröring D.C., Schreiber S., Krawczak M., Hampe J. Loci from a genome-wide analyses of bilirubin levels are associated with gallstone risk and composition. *Gastroenterology.* 2010; 139(6): 1942–51.
14. Tsezou A., Tzetis M., Giannatou E., Spanos I., Roma E., Fretzayas A., Kanavakis E., Kitsiou-Tzeli S. Gilbert syndrome as a predisposing factor for cholelithiasis risk in the Greek adult population. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009; 13(1): 143–6.
15. Shatalova E.G., Loginov V.I., Braga E.A., Kazubskaya T.P., Sudomoina M.A., Blanchard R.L., Favorova O.O. Association of polymorphisms in SUL1A1 and UGT1A1 genes with breast cancer risk and phenotypes in Russian women. *Mol. Biol.* 2006; 40(2): 228–34.
16. Fuchs C.S., Moore M.R., Harker G., Villa L., Rinaldi D., Hecht J.R. Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 5: 807–14.
17. Hoskins J.M., Goldberg R.M., Qu P., Ibrahim J.G., McLeod H.L. UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J. Natl. Cancer Inst.* 2007; 17: 1290–5.
18. Liu X., Cheng D., Kuang Q., Liu G., Xu W. Association of UGT1A1*28 polymorphisms with irinotecan-induced toxicities in colorectal cancer: a meta-analysis in Caucasians. *Pharmacogenomics J.* 2014; 2: 120–9.
19. Hu Z.Y., Yu Q., Pei Q., Guo C. Dose-dependent association between UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: low doses also increase risk. *Clin. Cancer Res.* 2010; 15: 3832–42.
20. Chen Y.J., Hu F., Li C.Y., Fang J.M., Chu L., Zhang X., Xu Q. The association of UGT1A1*6 and UGT1A1*28 with irinotecan-induced neutropenia in Asians: a meta-analysis. *Biomarkers.* 2014; 19(1): 56–62.
21. Innocenti F., Schilsky R.L., Ramirez J., Janisch L., Undevia S., House L.K., Das S., Wu K., Turcich M., Marsh R., Karrison T., Maitland M.L., Salgia R., Ratain M.J. Dose-finding and pharmacokinetic study to optimize the dosing of irinotecan according to the UGT1A1 genotype of patients with cancer. *J. Clin. Oncol.* 2014; 32(22): 2328–34.
22. Swen J.J., Nijenhuis M., de Boer A., Grandia L., Maitland-van der Zee A.H., Mulder H., Rongen G.A., van Schaik R.H., Schalekamp T., Touw D.J., van der Weide J., Wilffert B., Deneer V.H., Guchelaar H.J. Pharmacogenetics: from bench to byte – an update of guidelines. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2011; 89(5): 662–73.
23. Wang L.Z., Ramirez J., Yeo W., Chan M.Y., Thuya W.L., Lau J.Y., Wan S.C., Wong A.L., Zee Y.K., Lim R., Lee S.C., Ho P.C., Lee H.S., Chan A., Ansher S., Ratain M.J., Goh B.C. Glucuronidation by UGT1A1 is the dominant pathway of the metabolic disposition of belinostat in liver cancer patients. *PLoS One.* 2013; 8: 10.1371/journal.pone.0054522.
24. Xu C.F., Reck B.H., Xue Z., Huang L., Baker K.L., Chen M., Chen E.P., Ellens H.E., Mooser V.E., Cardon L.R., Spraggs C.F., Pandite L. Pazopanib-induced hyperbilirubinemia is associated with Gilbert's syndrome UGT1A1 polymorphism. *Br. J. Cancer.* 2010; 102(9): 1371–7.
25. Singer J.B., Shou Y., Giles F., Kantarjian H.M., Hsu Y., Robeva A.S., Rae P., Weitzman A., Meyer J.M., Dugan M., Ottmann O.G. UGT1A1 promoter polymorphism increases risk of nilotinib-induced hyperbilirubinemia. *Leukemia.* 2007; 21(11): 2311–5.
26. Abumiya M., Takahashi N., Nioka T., Kameoka Y., Fujishima N., Tagawa H., Sawada K., Miura M. Influence of UGT1A1 6, 27, and 28 polymorphisms on nilotinib-induced hyperbilirubinemia in Japanese patients with chronic myeloid leukemia. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2014; 29(6): 449–54.
27. Culley C.L., Kiang T.K., Gilchrist S.E., Ensom M.H. Effect of the UGT1A1*28 allele on unconjugated hyperbilirubinemia in HIV-positive patients receiving Atazanavir: a systematic review. *Ann. Pharmacother.* 2013; 47(4): 561–72.
28. Lankisch T.O., Moebius U., Wehmeier M., Behrens G., Manns M.P., Schmidt R.E., Strassburg C.P. Gilbert's disease and atazanavir: from phenotype to UDP-glucuronosyltransferase haplotype. *Hepatology.* 2006; 44(5): 1324–32.
29. Park W.B., Choe P.G., Song K.H., Jeon J.H., Park S.W., Kim H.B., Kim N.J., Oh M.D., Choe K.W. Genetic factors influencing severe atazanavir-associated hyperbilirubinemia in a population with low UDP-glucuronosyltransferase 1A1*28 allele frequency. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 51(1): 101–6.
30. Gammal R.S., Court M.H., Haidar C.E., Iwuchukwu O.F., Gaur A.H., Alvarellos M., Guillemette C., Lennox J.L., Whirl-Carrillo M., Brummel S.S., Ratain M.J., Klein T.E., Schackman B.R., Caudle K.E., Haas D.W. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for UGT1A1 and atazanavir prescribing. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2016; 99(4): 363–9.
31. Cabaleiro T., López-Rodríguez R., Ochoa D., Román M., Novalbos J., Abad-Santos F. Polymorphisms influencing olanzapine metabolism and adverse effects in healthy subjects. *Hum. Psychopharmacol.* 2013; 28(3): 205–14.
32. Hasegawa Y., Ando Y., Shimokata K. Screening for adverse reactions to irinotecan treatment using the Invader UGT1A1 Molecular Assay. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006; 6(4): 527–33.
33. Cuyàs E., Olano-Martín E., Khymenets O., Hernández L., Jofre-Monseny L., Grandoso L., Tejedor D., Martínez A., Farré M., de la Torre R. Errors and reproducibility of DNA array-based detection of allelic variants in ADME genes: PHARMachip. *Pharmacogenomics.* 2010; 11(2): 257–66.

Поступила 07.11.17

Принята к печати 22.11.17

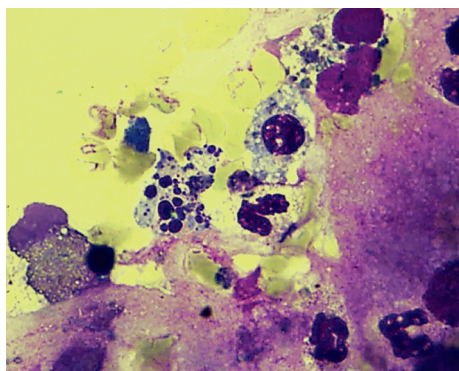


Рис. 1. Свободно выпущенная моча. Неадекватный материал: полуразрушенные, лизированные клетки.
Окраска по Лейшману. Ув. 1000.

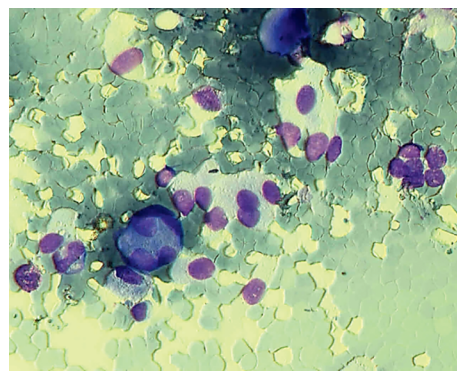


Рис. 2. Смыв с мочевого пузыря. Клетки уротелия и единичное небольшое скопление клеток LGUC.
Окраска по Лейшману. Ув. 100.

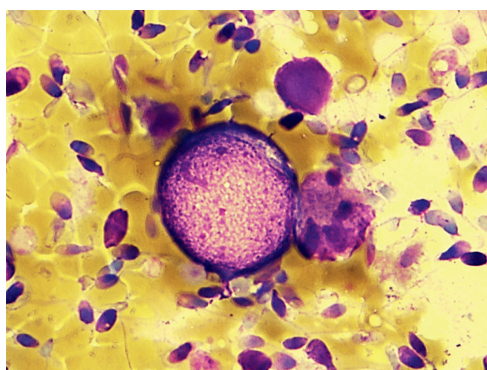


Рис. 3. Свободно выпущенная моча. Десоу-клетки -- признак манифестации полиомавируса.
Окраска по Лейшману. Ув. 100.

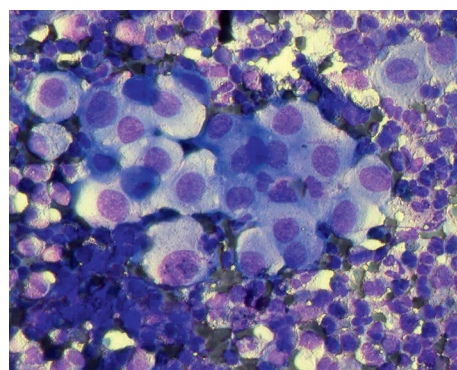


Рис. 4. Свободно выпущенная моча. Доброкачественные уротелиальные тканевые фрагменты.
Окраска по Лейшману. Ув. 100.

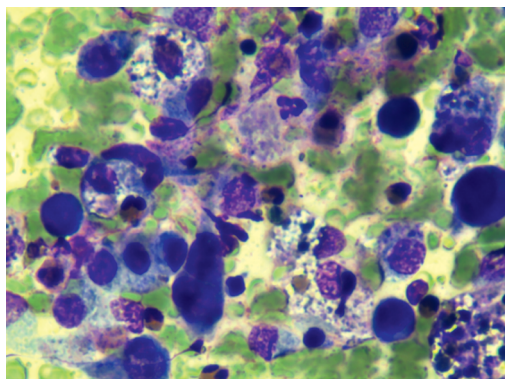


Рис. 5. Свободно выпущенная моча. Гистиоидные элементы, многоядерные гигантские клетки.
Окраска по Лейшману. Ув. 100.

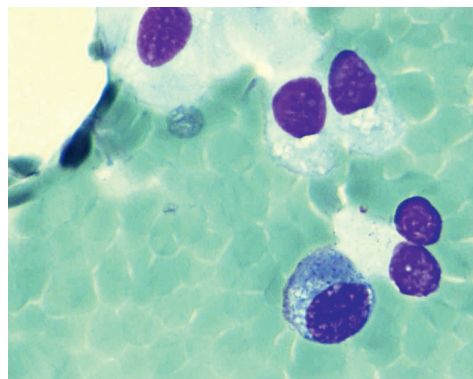


Рис. 6. Свободно выпущенная моча. Среди обилия эритроцитов единичные атипичные уротелиальные клетки (AUC).
Окраска по Лейшману. Ув. 1000.

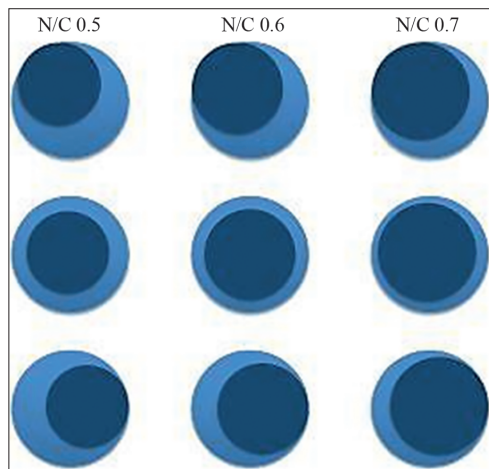


Рис. 7. Оценка ядерно-цитоплазматического соотношения в категории AUC.

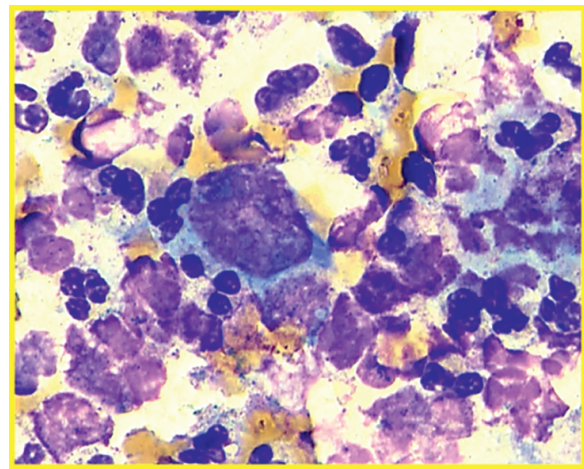


Рис. 8. Свободно выпущенная моча. Среди лейкоцитов определяются единичные атипичные уротелиальные клетки, по которым нельзя исключить уротелиальную карциному высокой степени злокачественности (AUC-H).

Окраска по Лейшману. Ув. 1000.

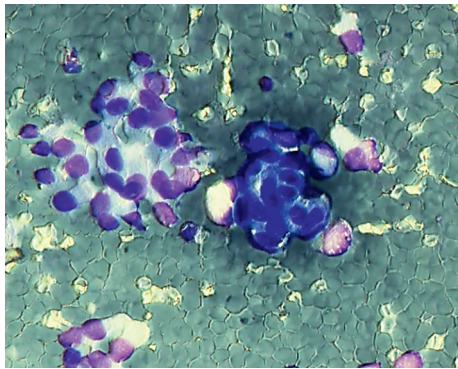


Рис. 9. Смыв с мочевого пузыря. Эритроциты, клетки уротелия и единичные небольшие скопления клеток LGUC.

Окраска по Лейшману. Ув. 200.

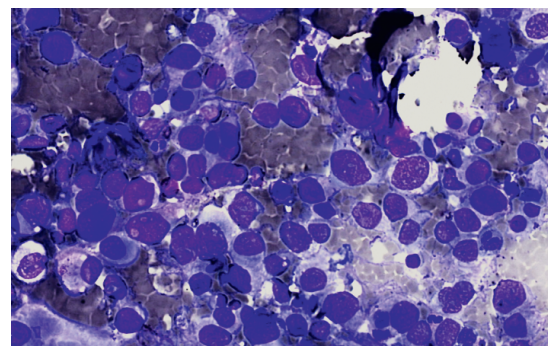


Рис. 10. Свободно выпущенная моча. Уротелиальная карцинома высокой степени злокачественности (HGUC).

Окраска по Лейшману. Ув. 200.

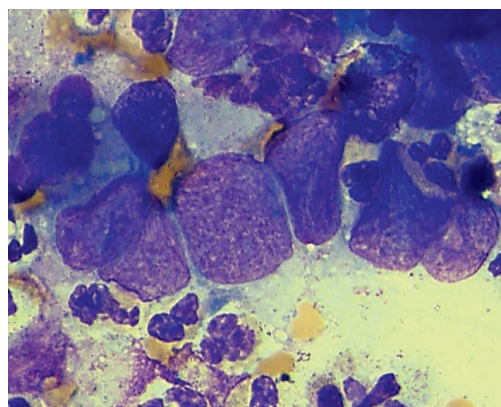


Рис. 11. Свободно выпущенная моча. Мелкоклеточный рак мочевого пузыря.

Окраска по Лейшману. Ув. 100.