

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
6 • 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

ИЮНЬ

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 20.05.2018.

Подписано в печать 14.06.2018.

Формат 60 × 88¹/₈.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Усл. печ. л. 8,33.

Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого из-
дания не может быть занесена в память компью-
тера либо воспроизведена любым способом
без предварительного письменного разреше-
ния издателя.

Журнал представлен в базе данных Российско-
го индекса научного цитирования (РИНЦ) и в
следующих международных информационно-
справочных изданиях: Abstracts of Micrology, 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. № 6. 321–384.

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"

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ диагностика

Volume 63
6 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

JUNE

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,
Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental
Literature, National Library of Medicine PubMed,
OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions
Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Ab-
stracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Pre-
views, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's
International Periodicals Directory.

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief V. N. TITOV

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

EDITORIAL COUNCIL:

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



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

БИОХИМИЯ

- Титов В.Н., Рожкова Т.А., Каминная В.И., Алчинова И.Б. Методы клинической биохимии в объективной оценке степени передаточности травоядным в филогенезе *Homo sapiens* (пациентом) плотоядной, мясной пищи 324
- Авдеев С.Н., Гайнитдинова В.В., Царёва Н.А., Мерзоева З.М. Натрийуретические пептиды как маркеры развития и прогноза тяжести лёгочной гипертензии у больных хронической обструктивной болезнью лёгких 333
- Чукаева И.И., Спирыкина Я.Г., Орлова Н.В., Глибко К.В., Орлов Д.А. Оценка маркеров воспаления и эндотелиальной дисфункции у пациентов с артериальной гипертензией на фоне достижения целевого уровня артериального давления 337

ИММУНОЛОГИЯ

- Александрова Е.Н., Новиков А.А., Верижников Ж.Г., Лукина Г.В. Современный взгляд на проблемы исследования антинуклеарных антител при системной красной волчанке (обзор литературы) 340
- Селезнева И.А., Свечникова М.В., Гильмияров Э.М., Гусякова О.А., Гильмиярова Ф.Н., Кузнецова О.Ю. Молекулярные маркеры повреждений слизистой оболочки полости рта у пациентов с лейкозами 349
- Мельник К.Н., Баишева Г.М., Гильмиярова Ф.Н., Алпатова Т.А. Саливадиагностика как метод определения иммунологической адаптации к учебному стрессу в условиях различного питьевого поведения 354
- Кравченко Л.В., Левкович М.А., Пятикова М.В. Роль полиморфизма гена интерферона γ и интерферонпродукции в патогенезе инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа у детей раннего возраста 357

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Агарков Н.М., Головченко О.В., Блинков Ю.А., Кулабухов А.С., Яковлев С.А., Будник И.В., Афанасова Е.П. Диагностика острого эндометрита по гематологическим показателям и с учётом дискриминантных моделей 361

ЦИТОЛОГИЯ

- Захарова Н.М., Ветчинникова О.Н. Терапевтический патоморфоз в практике клинического цитолога 365

КОАГУЛОЛОГИЯ

- Клычева М.М., Назаров С.Б., Кузьменко Г.Н., Попова И.Г., Ситникова О.Г., Бойко Е.Л., Харламова Н.В. Особенности изменения уровней гуморальных факторов, регулирующих систему гемостаза, в поздние сроки физиологической беременности 368

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Петров А.А., Лебедев В.Н., Казанцев А.В., Ковальчук Е.А., Сизикова Т.Е., Пышная Н.С., Павелъев Д.И., Кутаев Д.А., Борисевич С.В. Использование генно-инженерных конструкций в качестве контрольных образцов при оценке наборов реагентов для выявления РНК возбудителей опасных и особо опасных вирусных инфекций методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции 372
- Алиева А.А., Харсеева Г.Г., Мангутыев Э.О., Головин С.Н. Факторы патогенности недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта 375
- Щит И.Ю., Игнатов К.Б., Бикетов С.Ф. Сравнительный анализ методов LAMP и ПЦР-РВ для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза 378

BIOCHEMISTRY

- Titov V.N., Rozhkova T.A., Kaminnaya V.I., Alchinova I.B. Clinical biochemistry methods in objective evaluation of overeating food of carnivores (meat) by a phylogenetically herbivorous *homo sapiens* (a patient) 324
- Avdeev S.N., Gaynitdinova V.V., Tsareva N.A., Merzhoeva Z.M. Natriuretic peptides as markers of development and prognosis of the severity of pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease 333
- Chukaeva I.I., Spiryakina Ya.G., Orlova N.V., Glibko K.V., Orlov D.A. Evaluation of inflammatory and endothelial dysfunction's biomarkers in patients with hypertension at achieving the target blood pressure 337

IMMUNOLOGY

- Aleksandrova E.N., Verizhnikova Zh.G., Novikov A.A., Lukina G.V. Modern look at the problems of investigation of anti-nuclear antibodies in systemic lupus erythematosus (literature review) 340
- Seleznova I.A., Svechnikova M.V., Gilmiyarov E.M., Gussyakova O.A., Gilmiyarova F.N., Kuznetsova O.Yu. Molecular markers of the oral mucosa damage in patients with leukemia 349
- Melnik K.N., Baisheva G.M., Gilmiyarova F.N., Alpatova T.A. Saliva diagnostic in the research about human immune adaptation to study stress and to different water drinking behavior 354
- Kravchenko L.V., Levkovich M.A., Pyatikova M.V. The role of polymorphism of the interferon gene γ and interferonoproduction in the pathogenesis of infection caused by herpes 6 type virus in children of early age 357

HEMATOLOGY

- Agarkov N.M., Golovchenko O.V., Blinkov Y.A., Kulabukhov A.S., Yakovlev S.A., Budnik I.V., Afanasova E.P. Diagnosis of acute endometritis on hematologic indicators, and given discriminant models 361

CYTOLOGY

- Zakharova N.M., Vetchinnikova O.N. Therapeutic pathomorphosis in the practice of clinical cytologists 365

COAGULOLOGY

- Klycheva M.M., Nazarov S.B., Kuzmenko G.N., Popova I.G., Sitnikova O.G., Boyko E.L., Kharlamova N.V. Features of changes in levels of humoral factors regulating the system of hemostasis, in the late stages of pregnancy 368

MICROBIOLOGY

- Petrov A.A., Lebedev V.N., Kazantsev A.V., Kovalchuk E.A., Sizikova T.E., Pyshnaya N.S., Paveliev D.I., Kutaev D.A., Borisevich S.V. The use of genetic engineering constructions as control samples on evaluation of diagnostic kits for reveal of rna of hazard and extremely hazard agents of virus infections by reverse transcription – polymerase chain reaction 372
- Alieva A. A., Kharseeva G. G., Mangutov Ye. O., Golovin S. N. Factors of pathogenicity of Corynebacterium non-diphtheria, isolated from patients with the pathology of the respiratory tract 375
- Shchit I. Yu., Ignatov K. B., Biketov S. F. Comparative analysis of LAMP and Real Time PCR methods to detect pathogens of glanders and meliodosis 378

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616-056.257-092:612.332]-008.9-074

Титов В.Н.¹, Рожкова Т.А.¹, Каминная В.И.¹, Алчинова И.Б.².

МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ В ОБЪЕКТИВНОЙ ОЦЕНКЕ СТЕПЕНИ ПЕРЕЕДАНИЯ ТРАВояДНЫМ В ФИЛОГЕНЕЗЕ *HOMO SAPIENS* (ПАЦИЕНТОМ) ПЛОТояДНОЙ, МЯСНОЙ ПИЩИ

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

²ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» АН, РФ 125315, Москва, Россия

Атеросклероз начинается, когда травоядный в филогенезе *Homo sapiens* (пациент) начинает злоупотреблять плотоядной (мясной) пищей. Пристальное внимание привлекает «биогенетический принцип» Э. Геккеля: в онтогенезе каждая особь «воспроизводит» основные этапы эволюции, филогенеза – единого анамнеза всего живого. Мы предлагаем диагностический приём, который на основе филогенетической теории общей патологии в клинической практике позволяет объективно, по 4 степеням и при качественном различии тестов, оценивать переедание травоядным *Homo sapiens* мясной пищи. Степени объективного контроля афизиологического переедания мясной пищи, экзогенной пальмитиновой НЖК, следующие. Первая степень – увеличение в плазме крови натоцк содержания триглицеридов в позиционной форме олеиновых триглицеридов как пальмитоил-олеил-пальмитат (ПОП). Вторая – гипертриглицеридемия + повышение холестерина ХС липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) в составе пальмитиновых ЛПНП. Третья – увеличение в плазме крови содержания ещё и апоС-III. Четвертая степень – в дополнение к тому, что уже повышено, концентрации апоВ-48. Если же параметры проследить при оценке электрофореграмм липопротеинов и использовать метод фенотипирования (типирования) гиперлиппротеинемии ГЛП по классификации ВОЗ, то 1-я степень переедания при типировании ГЛП неинформативна, 2-я – ГЛП типа IV; 3-я – ГЛП типа IIb, 4-я степень – ГЛП типа V; это почти плотоядное питание пациента. Все типы ГЛП сопровождается синдромом резистентности к инсулину, гипергликемия и гиперинсулинемия; основу синдрома составляет повышение в плазме крови содержания жирных кислот в форме полярных незатерифицированных жирных кислот (НЭЖК). По филогенетической теории общей патологии, клетки *in vivo* не начнут поглощать глюкозу, пока есть возможность поглощать НЭЖК. Профилактическая направленность обследования позволяет характеризовать степень нарушения биологической функции питания, функции трофологии. Применение функционально разных методических приёмов к оценке нарушения функции трофологии позволяет у каждого пациента отслеживать эффективность диетотерапии с того уровня нарушений, на котором мы начали его наблюдать.

Ключевые слова: триглицериды; позиционные формы триглицеридов; типы гиперлиппротеинемии, апоС-III; апоВ-48; биогенетический принцип Геккеля.

Для цитирования: Титов В.Н., Рожкова Т.А., Каминная В.И., Алчинова И.Б. Методы клинической биохимии в объективной оценке степени переедания травоядным в филогенезе *Homo sapiens* (пациентом) плотоядной, мясной пищи. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(6): 324-332. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-324-332>

Titov V.N.¹, Rozhkova T.A.¹, Kaminnaya V.I.¹, Alchinova I.B.²

CLINICAL BIOCHEMISTRY METHODS IN OBJECTIVE EVALUATION OF OVEREATING FOOD OF CARNIVORES (MEAT) BY A PHYLOGENETICALLY HERBIVOROUS *HOMO SAPIENS* (A PATIENT)

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

²FGBNU "Research Institute of General Pathology and Pathophysiology", Academy of Sciences of the Russian Federation 125315, Moscow

The abuse of food of carnivores (meat) by phylogenetically herbivorous *Homo sapiens* (a patient) initiates atherosclerosis. Addressing biogenetic law of E. Haeckel that ontogeny recapitulates phylogeny (a universal anamnesis), we suggest a diagnostic technique that allows evaluation of the meat diet abuse by a herbivorous *Homo sapiens*. This technique is based on application of phylogenetic theory of general pathology to clinical practice. The degrees of objective evaluation of nonphysiological overeating of meat are: the first, an increase in the fast plasma content of oleic triglycerides palmitoyl-oleyl-palmitate (POP). The second, hyperglyceridemia + an increase in low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) content. The third, increased plasma content of apoC-III. The fourth, an increase in the concentration of apoB-48. If electrophoregrams are analyzed and hyperlipoproteinemia (HLP) type is determined according to WHO classification, the first degree of meat overeating is not informative, the second, corresponds to type IV HLP; the third, to type IIb HLP, and the forth, to type V HLP, i.e., the patient diet consists practically of the food of carnivores. Hyperlipoproteinemia coincides with insulin resistance syndrome, hyperglycemia and hyperinsulinemia, which is based on blood increase of fatty acids in the form of polar unesterified fatty acids (UFA). According to phylogenetic theory of general pathology, *in vivo* cells do not internalize glucose if there is a possibility to internalize UFA. Preventive examination allows evaluation of disorders in the biological function of trophology (food consumption). Thus, the use of different methods in the analysis of this function offers evaluation of the effectiveness of diet therapy from the level of disorders when treatment was started.

Для корреспонденции: Титов Владимир Николаевич, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. клинической биохимии липопротеинов; e-mail: vn_titov@mail.ru

Key words: *triglycerides; positional forms of triglycerides; types of hyperlipoproteinemia; apoC-III; apoB-48; Haeckel's biogenetic law.*

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. Alchinova. *Clinical biochemistry methods in objective evaluation of overeating food of carnivores (meat) by a phylogenetically herbivorous homo sapiens (a patient). Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63(6): 324-332. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-324-332>*

Acknowledgment. *This study had no sponsorship.*

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

Received 01.08.2017
Accepted 15.08.2017

Прошло 5 лет со времени опубликования разработанной нами [1] филогенетической теории общей патологии, которая дала возможность впервые обосновать становление на ступенях филогенеза 7 биологических функций; ранее о некоторых из них даже не упоминали: 1) биологическая функция гомеостаза; 2) функция трофологии (питания); 3) биологическая функция эндозологии; 4) функция адаптации; 5) биологическая функция продолжения вида (размножения); 6) функция локомоции и 7) когнитивная биологическая функция; высшим проявлением которой является интеллект. Используя положения филогенетической теории общей патологии и биологические функции, мы обосновали формирование на ступенях филогенеза 7 афизиологичных несоответствий регуляции метаболизма *in vivo* на разных уровнях относительного биологического совершенства [2].

Сформировались они при раздельном, последовательном становлении регуляции метаболизма на 3 уровнях: а) на 1-м, аутокринном – в клетках; б) на 2-м – в паракринно регулируемых сообществах функционально разных клеток, органов и систем; в) на 3-м уровне организма, *in vivo*. Сформированные при действии разных этиологических факторов в течение миллионов лет на разных ступенях филогенеза, мы называем их метаболическими пандемиями, болезнями цивилизации.

Руководствуясь филогенетической теорией общей патологии, мы обосновали становление на ступенях филогенеза 7 «метаболических пандемий» – нарушений в филогенезе регуляции метаболизма сочетано *in vivo* на 3 уровнях относительного биологического совершенства. Метаболические пандемии это: 1) атеросклероз и атероматоз – два функционально разных, афизиологичных, последовательных, патогенетически сочетанных процесса; 2) эссенциальная, метаболическая артериальная гипертензия; 3) синдром резистентности к инсулину (ИР); 4) метаболический синдром – патология инсулиннезависимой, висцеральной жировой ткани; 5) ожирение – патология инсулинозависимых, подкожных адипоцитов; 6) неалкогольная жировая болезнь печени и 7) эндогенная гиперурикемия. Общее для всех афизиологичных состояний (за исключением эндогенной гиперурикемии) – нарушение метаболизма жирных кислот (ЖК). Согласно этиологическим факторам, сформированным на разных ступнях филогенеза, метаболические пандемии по этиологии выражено различаются; несмотря на это, патогенез их сформировался на основе единого алгоритма.

В течение миллионов лет филогенеза можно проследить, что мир реально семеричен: 7 цветов радуги, 7 музыкальных нот, основа социальной жизни общества – семья, человек сотворен по образу и подобию на 6-й день трудов праведных, в субботу, но если добавить воскресенье, получается неделя из 7 дней. На земле среди мирового океана – 7 континентов. Согласно филогенетической теории общей патологии, для того чтобы разобраться в этиологии метаболической пандемии (атеросклероза и атероматоза), мы полагаем, обоснованно проследить становление на ступенях филогенеза биологической функции питания, функции трофологии, биологических реакций экзотрофии (внешнего) и эндотрофии (внутреннего) питания. Основное внимание мы предлагаем уделить станов-

лению регуляции на ступенях филогенеза метаболизма ЖК; они обеспечивают как построение структуры (плазматической мембраны) животных клеток, так и снабжение их энергией в форме синтеза макроэргического аденозинтрифосфата (АТФ). Мы предлагаем начать обсуждение с уровня клеток, с одноклеточных организмов, с 1-го уровня относительного биологического совершенства. Завершилось оно формированием многоклеточных организмов.

Жирные кислоты, пальмитиновые, олеиновые, линолевые триглицериды и одноименные липопротеины очень низкой плотности. Липидами, мы полагаем, являются все ЖК и соединения, в состав которых ЖК входят. Если холестерин (ХС) – это спирт, к липидам отношения не имеет, то холестерололеат – его эфир с олеиновой ЖК; липид. Все ЖК мы делим на насыщенные (НЖК), которые двойных связей (ДС) (С = С) не имеют, мононенасыщенные ЖК (МЖК) с одной ДС, ненасыщенные ЖК (ННЖК) с 2–3 ДС и эссенциальные полиеновые ЖК (ПНЖК) с 4–6 ДС. Метаболические превращения *in vivo* НЖК, МЖК, ННЖК и ПНЖК выражено разные, как и функциональная роль их в организме [3]. Основной формой депонирования (запасания) *in vivo* всех ЖК являются эфиры с трехатомным спиртом глицерином – триглицериды (ТГ). Основная форма переноса в водной среде ПНЖК – эфиры с одноатомным, циклическим, вторичным спиртом ХС в форме полиеновых эфиров ХС (поли-ЭХС).

Каждый из эфиров ЖК, в зависимости от того, какие три ЖК этерифицированы с глицерином, в гидрофильной среде кровотока и цитоплазмы клеток принимает специфичную, стерическую (пространственную) форму молекулы. В зависимости от того, какая ЖК этерифицирована во 2-й (sn-2), средней позиции трехатомного спирта глицерина с вторичной спиртовой группой, все ТГ мы подразделяем на пальмитиновые, олеиновые, стеариновые, линолевые и линоленовые. Все внеклеточные липазы (триглицеридгидролазы) в составе ТГ не гидролизуют эфирную связь ЖК с вторичной спиртовой группой sn-2 глицерина. В гепатоцитах с такой же мерой специфичности апоВ-100 избирательно структурирует (связывает) одноименные ТГ с образованием пальмитиновых, олеиновых и линолевых ЛПОНП. ЛП обладают разными физико-химическими свойствами. Гидролиз олеиновых ТГ в одноименных липопротеинах очень низкой плотности (ЛПОНП) при действии фермента – постгепариновой липопротеинлипазы (ЛПЛ) происходит со значительно большей скоростью, чем липолиз пальмитиновых ТГ в одноименных ЛПОНП.

Согласно филогенетической теории общей патологии, на ступенях филогенеза, при жизни в водах океанов и на суше последовательно за многие миллионы лет у прародителей вида *Homo sapiens* произошло формирование 3 последовательных вариантов переноса и поглощения клетками экзогенных и эндогенных ЖК в форме ТГ в составе апоВ липопротеинов (ЛП). Во всех ситуациях вызвано это было воздействием афизиологичных факторов внешней среды.

Первый вариант переноса in vivo ЖК у плотоядных. В глубинах океана при отсутствии света, растений и О₂ все животные были плотоядными (*Carnivores*), мясоедами; поедали

все они себе подобных. Это была животная пища с высоким содержанием пальмитиновой ЖК. Всасывание ЖК, которые освобождены при гидролизе ТГ в тонком кишечнике при действии липазы панкреатической железы, осуществляли энтероциты. Ресинтезированные в этих клетках экзогенные ТГ к гепатоцитам доставлял аполипопротеин-48 (апоВ-48) в составе сформированных им хиломикронов (ХМ) [4]. Из кровотока все ХМ поглощали только гепатоциты [5]. После реализации биохимических реакций оптимизации (окисление в пероксисомах афизиологичных, экзогенных ЖК при одновременном действии α -, β - и ω -оксидаз) гепатоциты включали физиологичные ЖК в состав пальмитиновых, олеиновых и линолевых ТГ; происходило это пропорционально содержанию этих экзогенных ЖК в пище. После этого в гепатоцитах уже иной апо, синтезированный *in situ de novo* апоВ-100, структурировал ТГ раздельно в состав пальмитиновых, олеиновых и линолевых ЛПОНП, секретируя их в кровоток.

В процессе гидролиза неполярных ТГ в крови в составе ЛПОНП при действии липаз часть ЖК покидали ЛПОНП в форме: а) незатерифицированных жирных кислот (НЭЖК); в крови их связывает липидпереносящий белок альбумин; б) полярных ди- и моноглицеридов – в кровотоке их связывают ЛПП высокой плотности (ЛПВП). После гидролиза количество ТГ в каждом ЛПОНП становится меньше, гидратированная плотность ЛПП увеличивается и происходит превращение ЛПОНП → ЛПНП. При оптимальном содержании ТГ апоВ-100 в пальмитиновых, олеиновых и линолевых ЛПНП принимает активную конформацию (стерическую, пространственную форму) и выставляет на поверхность ЛПП апоВ-100 лиганд. Связывая его апоВ-100 рецепторами, все клетки активно поглощают ЛПНП со всеми ЖК, которые они переносят.

В функциональном отношении все апо, которые задействованы в переносе и поглощении клетками ЖК в форме неполярных ТГ, мы разделяем на стационарные и динамичные. Стационарные апо формируют ЛП из неполярных ТГ и поли-ЭХС; клетки поглощают их путём рецепторного эндоцитоза в составе ЛП. Стационарными апо при переносе к клеткам ЖК в форме ТГ являются апоВ-48 и апоВ-100 [6]. Самый ранний на ступенях филогенеза – и стационарный апоА-I; однако он связывает и переносит ЖК только в форме полярных ди-, моноглицеридов и фосфолипидов, но не ТГ. В составе ЛПВП триглицеридов практически нет, но высоко содержание ди-, моноглицеридов. Динамичными апо, которые перемещаются между классами апоВ-100 и апоА-I липопротеинами (ЛП), являются апоС-II, апоС-III, апоЕ [7]. АпоС – кофакторы внеклеточных липаз; апоЕ ассоциируется главным образом с теми стационарными апо (апоВ-48 и апоА-I), которые в первичной структуре не имеют домена-лиганда. Мы рассматриваем апоЕ как белок-вектор, белок направленного переноса ЖК к клеткам, которые в большей мере нуждаются в: а) более эффективном снабжении их субстратами для выработки энергии или б) более активном оттоке от них метаболитов ЛП, спирта ХС.

У плотоядных (*Carnivores*) на ступенях филогенеза в переносе и поглощении клетками экзогенных ЖК задействованы: а) три ЛП, липидтранспортные макромолекулы: апоВ-48 ХМ + апоВ-100 ЛПОНП + апоВ-100 ЛПНП; два стационарных апо – апоВ-48 и апоВ-100; б) два рецептором опосредованных, активных – апоЕ/В-48-эндоцитоз гепатоцитами ХМ и апоВ-100-эндоцитоз пальмитиновых, олеиновых и линолевых ЛПНП всеми клетками *in vivo*; в) гидролиз преимущественно пальмитиновых, меньше олеиновых и линолевых ТГ в ЛПОНП и ЛПНП, осуществляет ранняя в филогенезе печеночная глицеролгидролаза + апоС-III. Отправной точкой переноса ко всем клеткам экзогенных ЖК *in vivo* становятся энтероциты [8].

Второй вариант переноса in vivo ЖК у травоядных. На планете Земля в период сложных геологических и биологиче-

ских перипетий (пермский и триасовый периоды) произошли самые существенные перемены. Часть плотоядных из океана не по своей воле оказалась на суше. Пищи на суше для них нет; нет и ω -3 ПНЖК, столь характерных для рыбьего жира (растения не синтезируют). В то же время в изобилии произрастает травоядная пища – множество биологических видов растений, в том числе плодовых кустарников и деревьев. В этих условиях большинство оказавшихся на суше плотоядных животных вымерли. Однако малое количество особей, реализуя биологическую функцию адаптации, все-таки сумели начать потребление растительной пищи. Далее за миллионы лет из плотоядных (*Carnivores*) они медленно, но все-таки стали травоядными (*Herbivores*). Они изменили функцию многих органов, физико-химические их параметры и даже особенности скелета; в последующие миллионы лет травоядные виды на суше стали доминировать [9]. Пища травоядных видов содержит лишь малое количество ЖК [10]; основу её после гидролиза целлюлозы составляет глюкоза.

У травоядных синтез основного количества эндогенных ЖК из глюкозы происходит *in situ de novo* в гепатоцитах и позже – в адипоцитах; гепатоциты при этом становятся отправной точкой переноса ЖК ко всем клеткам для реализации всех биологических функций. Необходимость в синтезе апоВ-48, в формировании ХМ и переносе *in vivo* ЖК от энтероцитов к гепатоцитам в лимфо- и кровотоке, органично отпадает. Травоядные останавливают синтез апоВ-48, формирование ХМ и неустраивают апоЕ/В-48 эндоцитоз ХМ гепатоцитами.

У травоядных на ступенях филогенеза в переносе к клеткам, поглощении ими ЖК в составе ТГ задействованы: а) один стационарный апоВ-100 и формируемые им из ТГ два ЛП: ЛПОНП и ЛПНП; б) один опосредованный рецепторами апоВ-100-эндоцитоз для поглощения всеми клетками пальмитиновых, олеиновых и линоленовых ЛПНП при переносе ими эндогенно синтезированных НЖК + МЖК и экзогенных ННЖК + ПНЖК; в) гидролиз пальмитиновых и олеиновых ТГ в составе ЛПОНП и ЛПНП, как и у плотоядных, реализует печеночная глицеролгидролаза (ГЛГ) + апоС-III.

Третий вариант переноса ЖК у травоядных при действии инсулина. На поздних ступенях филогенеза при становлении биологической функции локомоции – движение за счёт реципрокного сокращения поперечнополосатых, скелетных миоцитов, β -клетки островков Лангерганса начали синтезировать новый гуморальный медиатор (гормон) – инсулин. Биологическое предназначение инсулина – обеспечение субстратами для выработки энергии всех клеток, которые задействованы в реализации биологической функции локомоции. При становлении *in vivo* поздней на ступенях филогенеза биологической функции локомоции произошло: а) формирование замкнутой системы кровообращения; б) образование большого и малого её круга и в) формирование синцития кардиомиоцитов. Экспрессия инсулином *in vivo* привела к формированию на поздних ступенях филогенеза функционально новых клеток. Ими стали: 1) β -клетки островков поджелудочной железы; 2) скелетные миоциты; 3) кардиомиоциты; 4.) подкожные инсулинозависимые адипоциты; 5) перипортальные гепатоциты и 6) оседлые, высокоспециализированные макрофаги печени – клетки Купфера.

Формирование столь анатомически совершенных оседлых макрофагов – клеток Купфера и специфичных пространств Диссе, мы полагаем, инициировано в процессе превращения плотоядных животных в травоядных. В травоядной пище, по сравнению с плотоядной, в разы более высоко содержание афизиологичных для человека ЖК. От них то, при реализации в печени биологической реакции оптимизации, при синтезе эндогенных ТГ, приходится избавляться. Происходит это в пероксисомах гепатоцитов и клеток Купфера при активации одновременно всех вариантов окисления ЖК при действии альфа-, бета- и омега-оксидаз. В липидах животной пищи со спиртами (глицерин, ХС, сфингозин, долихол)

этерифицированы несколько десятков ЖК только с чётным числом атомов углерода; растительная пища в разных климатических зонах содержит около 800 индивидуальных ЖК при наличии большого количества афизиологичных ЖК. ЖК пищи, которые окисляют органеллы-пероксисомы: 1) ЖК с нечётным числом атомов углерода; 2) ЖК с разветвлёнными цепями атомов углерода; 3) дикарбоновые ЖК; 4) ЖК с 5-, 6-членными кольцами в цепи; 5) очень длинноцепочечные ЖК C24-C26 и более; 6) тио-ЖК с атомами серы (S) в структуре. Пространства Диссе в печени сформировали анатомическую возможность оседлым, полифункциональным макрофагам практически свободно контактировать с межклеточной средой.

Исполняя основное биологическое предназначение инсулина – обеспечение субстратами для наработки энергии всех клеток, которые задействованы в реализации биологической функции локомоции, гормон экспрессировал формирование направленного, векторного переноса к клеткам двух основных ЖК – эндогенно синтезированных олеиновой МЖК и эндогенной пальмитиновой НЖК. Для этого инсулин экспрессировал синтез *in vivo* двух новых ферментов: а) пальмитоил-КоА-элонгаза и стеарил-КоА-десатураза. Гормон активировал синтез гепатоцитами ЖК по пути: C16:0 пальмитиновая НЖК → (пальмитоил-КоА-элонгаза) C18 : 0 стеариновая НЖК → (стеарил-КоА-десатураза) C18 : 1 ω -9 цис-олеиновая МЖК.

Проведённые нами десятью годами ранее эксперименты *in vitro* показали, что озон окисляет C18 : 1 олеиновую МЖК в 5–6 раз с большей константой скорости реакции, по сравнению с окислением пальмитиновой НЖК [11]. Гепатоциты при действии инсулина поворачивают в олеиновую МЖК всю пальмитиновую НЖК, которую они синтезировали *in vivo de novo* эндогенно из экзогенной глюкозы. Однако гепатоциты не могут превратить в олеиновую МЖК экзогенную пальмитиновую НЖК, которая поступила с плотоядной пищей. Биологическое предназначение инсулина – повышение кинетических параметров организмов при реализации функции локомоции. Биологическая функция локомоции на поздних ступенях оказала выраженное влияние на совершенствование всех остальных 6 биологических функций, поскольку она увеличила обеспечение организма энергией, повысила эффективность энергообеспечения, инициировала синтез большего числа макроэргических молекул АТФ в единицу времени.

Совершенствуя обеспечение субстратами для наработки энергии в первую очередь инсулинозависимые клетки, имеющие на плазматической мембране рецепторы к инсулину, инсулин сформировал новый, векторный перенос олеиновой МЖК в форме олеиновых и пальмитиновых ТГ. Происходит это в составе одноименных ЛПОНП путём нового, кооперативного апоЕ/В-100-эндоцитоза; образования олеиновых ЛПНП при этом не происходит. Перенос же к клеткам ПНЖК у травоядных остался практически тем же, как и у плотоядных, когда все клетки поглощают ПНЖК в неполярной форме поли-ЭХС в составе линолевых ЛПОНП → ЛПНП путём апоВ-100 рецепторного эндоцитоза.

У травоядных (*Herbivores*) на поздних ступенях филогенеза при становлении функции инсулина, биологической функции локомоции, в переносе к клеткам и поглощении ими эндогенно синтезированной олеиновой МЖК в форме одноименных ТГ в составе одноименных ЛПОНП задействованы: а) один стационарный апо – апоВ-100; б) один апоЕ/В-100-эндоцитоз ЛПОНП и в) гидролиз олеиновых ТГ в составе одноименных ЛПОНП в крови стала активировать постгепариновую липопротеинлипаза (ЛПЛ) + апоС-II.

Если сопоставить варианты переноса ЖК на ступенях филогенеза у плотоядных (вариант 1), у травоядных до синтеза инсулина (вариант 2) и у них же при синтезе и действии гормона (вариант третий) получится следующее: плотояд-

ные: ХМ → пальмит. ЛПОНП → ЛПНП → апоВ-100 эндоцитоз; травоядные до инсулина: пальмит. ЛПОНП → ЛПНП → апоВ-100 эндоцитоз; травоядные + инсулин: олеиновые ЛПОНП → апоЕ/В-100 эндоцитоз.

Атеросклероз начинается, когда травоядный в филогенезе человек начинает злоупотреблять плотоядной (мясной) пищей. В свете изложенной филогенетической теории общей патологии и методологических основ общей биологии пристальное внимание привлекло сформированное более века назад положение Э. Геккеля, предложенный им «биогенетический принцип», согласно которому в индивидуальном развитии организма, в онтогенезе (в анамнезе особи) каждое животное как бы воспроизводит основные этапы эволюции, филогенеза – единого анамнеза всего живого. Говоря проще, каждая особь в онтогенезе воспроизводит основные этапы филогенеза.

Выше мы, в свете филогенетической теории общей патологии, коротко изложили 3 этапа превращения на ступенях филогенезе плотоядных в травоядные, основные этапы отработки переноса в составе ЛП и поглощения клетками ЖК, роль инсулина в превращении видов *Carnivores* в *Herbivores* на суше в ходе реализации биологической функции локомоции. Биологическая роль инсулина в превращении плотоядных → травоядные состоит в том, что у всех у них основным субстратом, который окисляют митохондрии в цикле трикарбоновых кислот и дыхательной цепи матрикса, является ацетил-КоА. Только у плотоядных основным предшественником образования ацетил-КоА *in vivo* служит пальмитиновая экзогенная НЖК, а у травоядных – экзогенная глюкоза, эндогенно синтезированная гепатоцитами и депонированная в инсулинозависимых подкожных адипоцитах олеиновая МЖК в форме олеиновых ТГ.

Инсулин экспрессировал замену на ступенях филогенеза пальмитинового варианта метаболизма ЖК на более поздний, более производительный, эффективный олеиновый вариант. Инсулин инициировал *in vivo* превращение всей синтезированной в цикле Кноппа–Линена из глюкозы пальмитиновой НЖК в олеиновую МЖК. Согласно же недавно повторенным нами экспериментам *in vitro*, окисление озоном C18 : 1 ω -9 цис- олеиновой МЖК происходит с константой скорости реакции в 5–6 раз более высокой, по сравнению со скоростью окисления O₃ пальмитиновой НЖК. К тому же, внутренняя мембрана митохондрий очень медленно вводит пальмитиновую НЖК в матрикс, в котором и происходит окисление ЖК и наработка АТФ.

У всех травоядных в филогенезе, в том числе и у вида *Homo sapiens*, гепатоциты из экзогенной глюкозы синтезируют в конечном итоге олеиновую МЖК. Гепатоциты этерифицируют МЖК в олеиновые ТГ, далее апоВ-100 структурирует ТГ в олеиновые ЛПОНП и секретирует в кровоток. В крови гидролиз олеиновых ТГ в олеиновых ЛПОНП активирует постгепариновую ЛПЛ и кофактор апоС-II. При оптимальном количестве ТГ, которые ассоциированы с апоВ-100, апо меняет конформацию (пространственную форму) и, в ассоциации с апоЕ, формирует кооперативный апоЕ/В-100 лиганд. Далее лигандные, олеиновые ЛПОНП связывают одноименными рецепторами все зависимые от инсулина клетки, поглощая их путём последнего в филогенезе, мы полагаем, апоЕ/В-100-эндоцитоза; олеиновые ЛПОНП в крови не образуются. По сути, у травоядных инсулин экспрессировал самый короткий вариант эффективного поглощения клетками ЖК – субстратов для наработки энергии, главным образом олеиновой МЖК в форме олеиновых ТГ в составе олеиновых ЛПОНП.

Каковым же в теоретическом осмыслении может быть то количество пальмитиновой НЖК, которое физиологично поглощают инсулинозависимые клетки травоядных в составе олеиновых ЛПОНП? Оно зависит от содержания *in vivo* олеиновой НЖК и равно тому количеству, которое может быть

этерифицировано в состав олеиновых ТГ вне синтеза пальмитиновых ТГ и формирования пальмитиновых ЛПОНП.

Если расставить все пальмитиновые и олеиновые позиционные формы ТГ в порядке возрастания скорости гидролиза их как субстратов при действии экзогенной липазы, образуется последовательность:

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

При этом 4 позиционные формы (слева) – пальмитиновые ТГ; 4 позиционные формы ТГ справа – олеиновые ТГ: ПОП – ПОО – ООП – ООО; олеиновая МЖК всегда в sn-2 ТГ. С наиболее высокой константой скоростью реакции постгепариновая ЛПЛ и её кофактор апоС-II гидролизует позиционные формы ТГ как олеил-олеил-олеат глицерол (ООО). Менее эффективно осуществим липолиз позиционных форм ТГ как пальмитоил-олеил-олеат (ПОО) и олеил-олеил-пальмитат (ООП) глицерол; с более низкой скоростью реакции гидролизу подвержены формы ТГ как пальмитоил-олеил-пальмитат глицерол (ПОП) [12].

В форме олеиновых ТГ в олеиновых ЛПОНП можно перенести такое количество пальмитиновой НЖК, которое может быть этерифицировано в олеиновые формы ТГ, главным образом в ПОП. При этом температура плавления олеиновых форм ТГ составляет: +5,5°C для ООО, +18,2°C для ООП и 35,2°C для ПОП, см.таблицу. По этой причине постгепариновая ЛПЛ + апоС-II станет гидролизовать ТГ как ПОП в крови в составе олеиновых ЛПОНП с более низкой константой скорости реакции. Это и есть объективная причина формирования умеренной гипертриглицеридемии. Повышенное содержание ТГ – первый диагностический признак того, что содержание в пище пальмитиновой НЖК стало превышать физиологичный уровень и среди олеиновых форм ТГ преобладают ПОП.

Если же количество пальмитиновой НЖК в животной пище продолжает возрастать, а синтез олеиновой НЖК из экзогенной глюкозы снижается, этерифицировать всю пальмитиновую НЖК в олеиновые ТГ становится затруднительно. В этих условиях клетки вынужденно, при активном иницировании субстратом, начинают синтез пальмитиновых ТГ. Далее в гепатоцитах апоВ-100 структурирует пальмитиновые ТГ в состав одноименных ЛПОНП; клетки секретируют в кровь уже пальмитиновые ЛПОНП. С этого времени диагностическими тестами нарушения биологической функции трофологии (питания), биологической реакции экзотрофии, переедания мясной пищи становятся: а) гипертриглицеридемия; б) повышение ХС-ЛПНП и в) формирование ГЛП типа Пб при электрофорезе ЛП. Согласно Д. Фредриксону и классификации фенотипов ГЛП, разработанной ВОЗ, формируемый тип именуют «семейная комбинированная ГЛП» со специфичными генетическими, компенсаторными нарушениями, которые инициированы *in vivo* вторично в ответ на афизиологичные, эпигенетические воздействия внешней среды.

Пальмитиновыми позиционными формами ТГ являются ОПО–ОПП–ППО–ППП. Формы ТГ как пальмитоил-пальмитат глицерол (ППП) гидролизу, исходя из температуры плавления +66,4°C (см. таблицу), не поддаются. Клетки, в цитоплазме которых в каплях липидов накапливаются ТГ как ППП, погибают по типу апоптоза и аутофагии. При дальнейшем увеличении количества мясной пищи и пальмитиновой НЖК повышается в плазме крови содержание ХС-ЛПНП пропорционально секреции гепатоцитами пальмитиновых ЛПОНП. Для постгепариновой ЛПЛ + апоС-II пальмитиновые ТГ в составе одноименных ЛПОНП оптимальным субстратом не являются.

Гидролиз пальмитиновых ТГ в одноименных ЛПОНП в крови при действии постгепариновой ЛПЛ + апоС-II происходит афизиологично медленно, ЛПОНП не формируют апоЕ/В-100 лиганд. Не поглощают безлигандные пальмитиновые ЛПОНП *in vivo* инсулинозависимые клетки. Пальми-

Температура плавления индивидуальных триглицеридов

Триглицериды	Точка плавления
Насыщенные:	
ССС	73,1
ППП	66,4
ССП	65,2
СПП	62,7
СПС	68,5
ПСП	68,6
Мононенасыщенные:	
СОС	41,6
СОП	38,0
ПОП	35,2
ССО	41,6
ССП	41,0
СПО	41,5
ППЛ	38,0
ССЛ	38,0
Ди- ненасыщенные:	
ОПО	22,0
ОСО	25,2
ООП	18,2
ООС	24,0
Три- ненасыщенные:	
ООО	5,5
ЛЛЛ	-13,1

тиновые ЛПОНП при афизиологично медленном липолизе и длительной циркуляции в крови превращаются в пальмитиновые ЛПНП. Они формируют малые, плотные, наиболее атерогенные ЛПНП; эти ЛП и повышают ХС-ЛПНП, создавая далее атероматоз интимы артерий эластического типа [13]. Ретенционное накопление в крови пальмитиновых ЛПОНП → ЛПНП – следствие нарушения биологической функции трофологии (питания); одновременно это условие нарушения иной биологической функции – функции эндозкологии. «Замусоривание» межклеточной среды *in vivo* эндогенными флогогенами большой молекулярной массы – безлигандными пальмитиновыми ЛПОНП → ЛПНП, инициаторами биологической реакции воспаления, создаёт основу для формирования вслед за атеросклерозом иного афизиологичного процесса – атероматоза.

Атероматоз – проявление активизации биологической функции эндозкологии, поддержания «чистоты» межклеточной среды путём удаления (сбора и утилизации) всех эндогенных флогогенов и экзогенных, в том числе и инфекционных патогенов. Для этого *in vivo* происходит активация биологической функции эндозкологии и использована интима артерий эластического типа как физиологичного пула сбора и утилизации всех эндогенных флогогенов (инициаторов биологической реакции воспаления) большой молекулярной массы. Безлигандные пальмитиновые ЛПОНП → ЛПНП, которые не могут физиологично поглотить клетки, становятся субстратом атероматоза в интима артерий эластического типа. Пальмитиновые ЛПОНП → ЛПНП объединяют два афизиологичных процесса – атеросклероз (нарушение биологической функции трофологии) и атероматоз (нарушение биологической функции эндозкологии).

При атеросклерозе, афизиологичном процессе, происходит образование пальмитиновых ЛПОНП → ЛПНП, «замусоривание» межклеточной среды *in vivo*. Атероматоз же – поддержание «чистоты» межклеточной среды, реализация биологической функции эндозкологии, удаления из кровото-

тока, в частности, безлигандных пальмитиновых ЛПОИП → ЛПНП. Происходит это не в полной мере физиологично, точнее афизиологично. Именно пальмитиновые ЛПОИП → ЛПНП в конечном итоге становятся субстратом атероматозных масс липидов в интима артерий эластического типа. Избыток в пище пальмитиновой НЖК служит и основной причиной специфического липоидоза зависимых от инсулина клеток: скелетные миоциты, кардиомиоциты, перипортальные гепатоциты, макрофаги Купфера и β -клетки островков.

Биологическая роль и диагностическое значение апоС-III. Остаются непоколебимыми положения теории Э. Геккеля и высказанные нами ранее представления, что постгепариновая ЛПЛ + апоС-II оптимально гидролизуют только поздние в филогенезе олеиновые ТГ в составе одноименных ЛПОИП [14]. Гидролиз же более ранних в филогенезе пальмитиновых, линолевых и линоленовых ТГ в одноименных ЛПОИП активирует иная липаза – печёночная глицеролгидролаза (ГЛГ) + апоС-III [15]. Печёночная ГЛГ + апоС-III сформировались на ступенях филогенеза существенно раньше постгепариновой ЛПЛ + апоС-II. Когда действие ЛПЛ + апоС-II блокировано *in vivo* по причине неоптимального субстрата (пальмитиновых ТГ в одноименных ЛПОИП), формируется ГЛП, происходит активация биологической функции адаптации, биологической реакции компенсации. Экспрессия синтеза печеночной ГЛГ + апоС-III в онтогенезе, мы полагаем, компенсаторно возрастает с целью нормализовать по сути гидролиз пальмитиновых ТГ в одноименных ЛПОИП и восстановить нарушенный перенос и поглощение клетками ЛПОИП, ТГ и ЖК и наработку митохондриями энергии, синтеза АТФ. И если реакция компенсации при нарушении функции трофологии доходит до синтеза ХМ, в них тоже высоко содержание апоС-III [16].

В то же время авторы рассматривают апоС-III чуть ли не как функциональный ингибитор липолиза ТГ в олеиновых ЛПОИП [17, 18]. Полагают, что апоС-III – блокатор поглощения клетками ЖК в форме ТГ в составе ЛПОИП и фактор риска ИБС [19]. Представления о физиологичных ингибиторах на путях переноса и поглощения клетками ЖК мы считаем не реальными; так можно договориться и до функциональной атрезии пищевода. Малыми, плотными, химически инертными, неоптимальным субстратом для гидролиза ТГ при действии постгепариновой ЛПЛ + апоС-II являются пальмитиновые ЛПНП [20]. АпоС-III рассматривают как предвестник неблагоприятного исхода в условиях острого коронарного синдрома [21]; физиологичный уровень апоС-III в плазме крови составляет ≈ 10 мг/дл.

Наличие: а) повышенного содержания ТГ в плазме крови; б) повышенного ХС-ЛПНП; в) формирование ГЛП типа Пб и повышенного содержания апоС-III отражают выраженное злоупотребление пациента мясной пищи. Результатом этого станет формирование атеросклероза, далее присоединение атероматоза и развитие острого коронарного синдрома. Содержание в плазме крови апоС-III вдвое увеличено у пациентов с ГЛП и при диабете 2-го типа [22], как и отношение апоС-III/апоС-II в пальмитиновом составе ЛПОИП [23]. Если в системе липолиза при действии постгепариновой ЛПЛ апоС-II заменить на апоС-III, активность липолиза будет ингибирована [24]. В ассоциации же печеночная ГЛГ + апоС-III, активность липолиза активирована [25].

При усиленном переедании мясной пищи, пальмитиновой НЖК, всасывание НЖК в энтероцитах, синтез клетками *in situ* апоВ-48 и формирование ХМ происходит в период нескольких часов при постпрандиальной гиперлипидемии после еды. При неумеренном злоупотреблении пациентом плотоядной пищей циркуляция в кровотоке повышенного количества апоВ-48 ХМ становится постоянной. В плазме крови повышена концентрация ТГ, уровень ХС-ЛПНП, содержание апоС-III, апоВ-48 и формирование при электрофорезе липопротеинов ГЛП типа V. При избытке мясной пищи и пальмитиновой НЖК перенос в

составе апоВ-100 ЛП избытка пальмитиновых ТГ происходит так, как это было миллионы лет до начала действия инсулина, соответственно биогенетическому постулату Э. Геккеля. Как это описано выше, при формировании на ступенях филогенеза травоядных и вида *Homo sapiens*, из переноса к клеткам ЖК в ЛП вначале были исключены ХМ, позднее – и ЛПНП. У травоядного *Homo sapiens* физиологично перенос к клеткам эндогенно синтезированных МЖК и НЖК осуществляют только олеиновые ЛПОИП, экспрессированные инсулином. Когда же в пище афизиологично увеличено содержание пальмитиновой НЖК, для переноса её к клеткам в онтогенезе (у пациента) происходит вначале возвращение функции ЛПНП; позже к переносу большого количества пальмитиновой НЖК в форме пальмитиновых ТГ в одноименных ЛПОИП оказываются возвращены апоВ-48 и формируемые ими в энтероцитах ХМ.

Физико-химические, биологические параметры пальмитиновой НЖК. В пальмитиновой С16 : 0 НЖК нет ДС; НЖК в малой мере вступает в физико-химические и биохимические реакции и формирует плотную упаковку молекул. Митохондрии с трудом вводят пальмитиновую НЖК через внутреннюю мембрану клеточных органелл в матрикс митохондрий, в котором её и медленно окисляют, нарабатывая малые, порой не оптимальные острой ситуации количества АТФ [26]. Безлигандные пальмитиновые ЛПНП конкурентно блокируют поглощение клетками ПНЖК в составе физиологичных линолевых ЛПНП в форме поли-ЭХС (ПНЖК этерифицированных спиртом ХС) путём апоВ-100-эндоцитоза. Это формирует дефицит ПНЖК во всех клетках *in vivo* и является основой патогенеза такой метаболической пандемии, как атеросклероз.

Почти 30 лет мы рассматриваем атеросклероз как дефицит в клетках ПНЖК и компенсаторный синтез афизиологичных эйкозаноидов, который происходит при реализации функции трофологии, реакции экзотрофии, формируя одновременно и нарушение функции эндоэкологии – «чистоты» межклеточной среды *in vivo*. Депонированные в инсулин-независимых ВЖК сальника и в ИПА пальмитиновые ТГ с низкой константой скорости реакции гидролизует и освобождает в кровоток гормонозависимая липаза. Это не может в полной мере удовлетворить потребности клеток в субстратах энергии в период реализации биологической реакции эндотрофии, вне приёма пищи.

Миллионы лет *in vivo* (до синтеза инсулина) доминировал оптимальный, но потенциально невысокоэффективный пальмитиновый вариант метаболизма ЖК, нарабатки клетками энергии. Миллионы лет, пока клетки не начали реализовывать биологическую функцию локомоции, образованного митохондриями количества АТФ при окислении пальмитиновой НЖК было, вероятно, достаточно. Со становлением функции локомоции, движения за счёт сокращения скелетных, поперечнополосатых миоцитов, нарабатываемой *in vivo* энергии стало явно мало. По этой причине среди регуляторов метаболизма *in vivo* ЖК на 1-м месте оказался вновь синтезированный, поздний в филогенезе гуморальный медиатор инсулин. Его постоянно синтезируют β -клетки поджелудочной железы; секретируют же клетки инсулин только при реализации биологической функции трофологии (питания), биологической реакции экзотрофии (внешнего питания) во время и после приёма пищи.

Основная причина повышения ХС-ЛПНП: а) избыточное количество *in vivo* экзогенной пальмитиновой НЖК в форме пальмитиновых ТГ; б) формирование большого числа пальмитиновых ЛПОИП → ЛПНП, которые в крови не формируют апоЕ/В-100 лиганд, их не могут поглотить клетки. В крови происходит накопление безлигандных пальмитиновых ЛПОИП → ЛПНП и увеличение содержания неэтерифицированного спирта ХС в составе полярного монослоя в пальмитиновых ЛПОИП → ЛПНП – ХС-ЛПНП.

Объективный метод оценки степени переедания паци-

ентом плотоядной (мясной) пищи. Мы изложили иную теорию этиологии атеросклероза, которая восходит к 1908 г., когда русские учёные А. Игнатовский и С. Салтыков в экспериментах на кроликах воспроизвели атероматоз аорты при скормлении травоядным животным мяса. Мы полагаем, что атеросклероз как афизиологичный процесс *in vivo* начинает формироваться тогда, когда травоядный в филогенезе *Homo sapiens* начинает злоупотреблять плотоядной (мясной) пищей. В онтогенезе начинается и годами продолжается становление процесса, который можно оценить, используя разработанный нами подход к диагностике и профилактике атеросклероза, методы клинической биохимии.

Можно проследить, как *Homo* не очень-то *sapiens*, будучи травоядным на ступенях филогенеза и в онтогенезе, постепенно начинает превращаться в плотоядного. Это – основа патогенеза атеросклероза, за которым облигатно следует атероматоз. Вместе с тем это два этиологически разных процесса, нарушения *in vivo* разных биологических функций: а) атеросклероз – нарушение биологической функции трофологии (питания) и б) атероматоз – биологической функции эндоэкологии – поддержание «чистоты» межклеточной среды *in vivo*.

Мы предлагаем применить в клинической практике, в диагностике приём, который позволяет объективно, по 4 степеням и при качественном различии, оценивать переедание травоядным *Homo sapiens* (пациентом) мясной пищи. Мы хотели бы не спрашивать пациента о количестве поедаемой им плотоядной пищи, а объективно указывать ему на степень нарушения им физиологичного питания, что обязательно приведёт к формированию *in vivo* вначале атеросклероза, а далее и атероматоза, объективно приближая время клинической картины острого коронарного синдрома [27].

Тесты объективного контроля афизиологичного переедания мясной пищи, экзогенной пальмитиновой НЖК: 1-я степень – увеличение в плазме крови натошак содержания ТГ в форме ПОП; 2-я – гипертриглицеридемия + повышение ХС-ЛПНП в составе пальмитиновых ЛПНП; 3-я – увеличение в плазме крови содержания еще и апоС-III; 4-я степень – в дополнение к тому, что уже нарушено, ещё и увеличение концентрации апоВ-48 [28].

Если же эти параметры проследить у пациентов на основании оценки электрофореграмм ЛП и использовать метод фенотипирования (типирования) ГЛП по классификации ВОЗ: первая степень переедания при типировании ГЛП не информативна; 2-я степень – гиперлипопротеинемия типа IV; 3-я – ГЛП типа IIб и 4-я степень – ГЛП типа V; это почти что плотоядное питание *Homo* ну совсем не *sapiens*. И вне сомнения, все типы ГЛП сопровождается синдромом резистентности к инсулину, основу которого составляет повышение в плазме крови содержания ЖК в форме НЭЖК [29]. Согласно филогенетической теории общей патологии, ни одна из клеток *in vivo* не начнет пассивно (активированно) поглощать глюкозу, пока есть возможность из межклеточной среды поглощать ЖК в форме полярных НЭЖК при действии филогенетически более поздней, более совершенной CD-транслоказы ЖК. И все ГЛП сопровождается активация биологической функции эндоэкологии, биологической реакции воспаления [30].

Подобная профилактическая направленность клинического обследования служит диагностическим подходом, который на основании объективных результатов позволяет характеризовать степень нарушения биологической функции питания, функции трофологии и объяснить это пациенту. Многофакторный же метод помогает длительно проводить мониторинг диетотерапии при разной степени нарушений биологической функции трофологии в процессе её нормализации. Суммирование функционально разных методических приёмов, подходов к оценке нарушения функции трофологии позволяет у каждого пациента отслеживать эффективность диетотерапии с того уровня нарушений, на

котором мы начали его наблюдать. Применение же гиполипидемических фармпрепаратов (фибраты, глитазоны, никотиновая кислота) относится в первую очередь к наследуемым фенотипам ГЛП; это ГЛП фенотипа I – семейная гипертриглицеридемия [31], семейная гиперхолестеринемия – ГЛП фенотипа IIа; ГЛП фенотипа III – семейная дислипопротеинемия [32].

Если поедаемую пациентом пищу можно детально охарактеризовать как «сдвиг вправо», как это приведено выше, профилактика атеросклероза и атероматоза никогда не будет лёгкой, но всегда окончится успешно. И чем больше реализация биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии будет соответствовать сдвигу влево, тем выше риск становления атеросклероза, присоединения атероматоза, короче время до возникновения симптомов ИБС, поражения атероматозом коронарных артерий и инцидентов инфаркта миокарда.

Тесты нарушенного метаболизма ЖК, формирование атеросклероза, атероматоза и ишемической болезни сердца. Предложение наше, мы полагаем, биологически, филогенетически и онтогенетически обоснованно, клинически значимо и достоверно; основу его составляет индивидуальная оценка степени нарушения биологической функции трофологии. Предложенный метод даёт возможность составить полное представление о том, как с согласия самого пациента формируется нарушение биологической функции трофологии, метаболизма ЖК и формирование ИБС [33]. Мнение этих авторов наиболее близко к предложенному нами способу оценки всех сторон алиментарной ГЛП. И успешно устранить содеянное пациентом можно не с согласия пациента, а только при больших усилиях с его стороны, при активации когнитивной биологической функции пациента и даже его интеллекта. Такие метаболические пандемии, как атеросклероз, атероматоз и ожирение, – патология несомненно соматическая, однако с когнитивной, интеллектуальной основой и с особой долей противоречия на ступенях филогенеза. Предложенный нами диагностический приём полностью соответствует филогенетической теории общей патологии. Тактика мониторингирования не содержит новых тестов, необходимости в них нет; она в полной мере соответствует биологическому постулату Э. Геккеля – каждая особь в онтогенезе своём повторяет основные этапы филогенеза всего живого.

Всеядным человек не является и биологически (в полном смысле) это невозможно. Ни одно животное не может утром оторвать от туши кусок мяса и, не жуя, проглотить его; а к вечеру длительно, часам собирать и часами пережевывать сено или сырые овощи. Все животные являются плотоядными, рыбающими в океане, или травоядными на суше. Медведь может длительно питаться только кашей; человек же не может питаться свежим, сырым мясом; потребляет он его в жареном и вареном виде. И медведю значительно проще при действии биологического принципа «голод не тетка» временно (филогенетически) адаптироваться под травоядного. Никакие отсроченные нарушения метаболизма ЖК при этом не разовьются. Если же человек станет адаптироваться к поеданию большого количества мясной пищи (афилогенетическая) адаптация, результатом этого станет атеросклероз, атероматоз и острый коронарный синдром [34].

Новый метод мониторингирования наиболее частых в клинике эпигенетически обусловленных типов ГЛП не исключает того, что возможны и врождённые нарушения ГЛП фенотипа IIб, фенотипа IV и фенотипа V [35]. Формирование ГЛП типа IV может быть и следствием нарушения секреции гуморальных медиаторов (гормонов) железами внутренней секреции [36]. Вместе с тем можно и при эпигенетических типах ГЛП констатировать изменения в генах [37], которые формируют процессы компенсации нарушенной биологической функции питания, учитывая первостепенную роль её *in vivo*. К тому

же, референсные интервалы для всех анализов, которые мы использовали в многофакторной оценке ГЛП, установлены в многоцентровых кооперативных протоколах и проверены при использовании мета-анализа [38, 39].

Экзогенным фактором ГЛП наиболее часто служит пища, богатая пальмитиновой ЖК; наиболее афизиологична говядина, в которой содержание пальмитиновой НЖК достигает 60%. Хотя в sn-2 ТГ говядины чаще этерифицирована пальмитиновая НЖК, в меньшей мере олеиновая МЖК, в sn-1 и sn-3 часто этерифицирована и олеиновая МЖК. То же можно видеть и в коровьем молоке, сливках, сметане и в сырах, в которых, в отличие от говядины, в sn-2 ТГ всегда этерифицирована пальмитиновая ЖК. Вторым фактором формирования ТГ как ПОП оказывается избыток в пище углеводов, которые гепатоциты в целях депонирования в адипоцитах превращают в пальмитиновую ЖК; формально пальмитиновую ЖК мы рассматриваем как «гидрофобную форму» глюкозы, оптимальную для депонирования в жировых клетках. Функционально важно, чтобы вся синтезированная гепатоцитами травоядных из экзогенной глюкозы пальмитиновая НЖК была вся при действии инсулина превращена в олеиновую НЖК. Только окисляя олеиновую МЖК, митохондрии в полной мере высокоэффективно нарабатывают энергию в форме макроэргического АТФ в количестве, которого достаточно для удовлетворения обеспечения реализации всех биологических функций *in vivo* [40]. В этом состоит один из важных аспектов биологического действия инсулина, в превращении плотоядных (рыбоядных) в океан в травоядных на суше, которым является и вид *Homo sapiens*.

Возвращение *Homo sapiens* (пациента) к филогенетическому травоядному питанию – основа профилактики атеросклероза, атероматоза, острого коронарного синдрома и инфаркта миокарда. Это мнение отражено во многих клинических наблюдениях, кооперативных, эпидемиологических исследованиях и подтверждено данными мета-анализа [41-43]. Оценивая в динамике параметры постпрандиальной ГЛП, можно получать достоверную информацию относительно того, становится ли питание пациента более травоядным или диета все в большей мере сдвигается в сторону плотоядного питания. Дельная оценка даже короткого периода секреции энтероцитами ХМ, учёт особенностей гипертриглицеридемии в постпрандиальном периоде и увеличение ХС-ЛПНП, включая и содержание поли-ЭХС, даёт возможность комплексно оценить необходимые профилактические мероприятия, включая и метод электрофореза ЛП [Su]. Однако авторы не формируют из многих диагностических методов какие-то логические последовательности, тем более не принимают во внимание различия и единение филогенеза. Это предстоит сделать, по большому счёту учитывая характер питания, особенности абсорбции экзогенных и синтеза эндогенных ЖК из глюкозы, а также функцию микробиоты толстого кишечника [44].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-10, 12, 15-39, 41-44 см. REFERENCES)

1. Титов В.Н. Биологическая функция трофологии (питания) и патогенез метаболического синдрома – физиологического передатчика. *Филогенетическая теория общей патологии, лептин и адипонектин. Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2014; 2: 68 – 79.
2. Титов В.Н., Амелюшкина В.А., Рожкова Т.А. Конформация apoB-100 в филогенетически и функционально разных липопротеинах низкой и очень низкой плотности. Алгоритм формирования фенотипов гиперлипидемии. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2014; 1: 27-38.

11. Титов В.Н., Лисицын Д.М. *Жирные кислоты. Физическая химия, биология и медицина.* М.- Тверь: ООО «Издательство «Трида». 2006.
13. Титов В.Н. *Первичный и вторичный атеросклероз, атероматоз и атеротромбоз.* М.- Тверь: ООО «Издательство «Трида»; 2008.
14. Рожкова Т.А., Титов В.Н., Амелюшкина В.А., Каба С.И., Кухарчук В.В. Липолиз в филогенетически ранних липопротеинах низкой плотности и более поздних липопротеинах очень низкой плотности; функция и диагностическое значение apoE и apoC-III. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2015; 60(12): 4 – 14.
40. Шноль С.Э. *Физико-химические факторы биологической эволюции.* М.: Издательство «Наука»; 1979.

REFERENCES

1. Titov V.N. Biological function of trophology (nutrition) and pathogenesis of metabolic syndrome - physiological overeating. *Phylogenetic theory of general pathology, leptin and adiponectin. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2014; 2: 68 – 79. (in Russian)
2. Titov V.N., Amelyushkina V.A., Rozhkova T.A. Conformation of apoB-100 in phylogenetically and functionally different lipoproteins of low and very low density. Algorithm for the formation of phenotypes of hyperlipoproteinemia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2014; 1: 27 - 38. (in Russian)
3. Mahalle N., Kulkarni M.V., Naik S.S., Garg M.K. Association of dietary factors with insulin resistance and inflammatory markers in subjects with diabetes mellitus and coronary artery disease in Indian population. *J. Diabetes. Complications.* 2014 Jul-Aug;28(4):536.
4. Kinoshita M., Kojima M., Matsushima T., Teramoto T. Determination of apolipoprotein B-48 in serum by a sandwich ELISA. *Clin. Chim. Acta.* 2005 Jan;351(1-2):115-20.
5. Ramasamy I., Update on the molecular biology of dyslipidemias. *Clin. Chim. Acta.* 2016;454:143 - 185.
6. Battula S.B., Fitzsimons O., Moreno S., Owens D., Collins P., Johnson A., Tomkin G.H. Postprandial apolipoprotein B48-and B100-containing lipoproteins in type 2 diabetes: do statins have a specific effect on triglyceride metabolism? *Metabolism.* 2000; 49(8): 1049 - 54.
7. Zheng C., Khoo C., Furtado J., Ikewaki K., Sacks FM. Dietary monounsaturated fat activates metabolic pathways for triglyceride-rich lipoproteins that involve apolipoproteins E and C-III. *Am J Clin Nutr.* 2008 Aug;88(2):272-81.
8. Drouin-Chatier J.P., Hogue J.C., Tremblay A.J., Bergeron J., Lamarche B., Couture P. The elevation of plasma concentrations of apoB-48-containing lipoproteins in familial hypercholesterolemia is independent of PCSK9 levels. *Lipids. Health. Dis.* 2017; 16(1): 119 - 26.
9. März W., Grammer T.B., Delgado G., Kleber M.E. Congenital disorders of lipoprotein metabolism. *Herz.* 2017; 42(5): 449 - 58.
10. Lewis G.F., Xiao C., Hegele R.A. Hypertriglyceridemia in the genomic era: a new paradigm. *Endocr. Rev.* 2015; 36(1): 131 - 47.
11. Titov V.N., Lisitsyn D.M. *Fatty acid. Physical chemistry, biology and medicine.* [Zhirmye kisloty: Fizicheskaya khimiya, biologiya i meditsina]. Moscow-Tver': ООО «Izdatel'stvo «Triada»; 2006. (in Russian)
12. Sahin N., Akoh C.C., Karaali A. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes. *J. Agric. Food. Chem.* 2005; 53(14): 5779 - 83.
13. Titov V.N. *Primary and secondary atherosclerosis, atheromatosis and atherothrombosis.* [Pervichnyi i vtorichnyi ateroskleroz, atheromatosis i atherotromboz]. Moscow-Tver': ООО «Izdatel'stvo «Triada»; 2008. (in Russian)
14. Rozhkova T.A., Titov V.N., Amelushkina V.A., Kaba S.I., Kukharchuk V.V. Lipolysis in phylogenetically early low-density lipoproteins and later very low density lipoproteins; Function and diagnostic value of apoE and apo-III. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2015; 60(12): 4 -14. (in Russian)
15. Gaudet D., Alexander V.J., Baker B.F., Brisson D., Tremblay

- K. Antisense Inhibition of apolipoprotein C-III in patients with hypertriglyceridemia. *N. Engl. J. Med.* 2015; 373(5): 438 - 47.
16. Yamamoto M., Yamamoto M., Ohashi T., Katoh N., Oikawa S. Increased serum concentration of apolipoprotein C-III and its greater distribution to chylomicrons than to the high-density lipoprotein fraction in a calf with hyperlipidemia. *J. Vet. Med. Sci.* 2000 Oct; 62(10): 1033-9.
17. Takahashi T., Hirano T., Okada K., Adachi M. Apolipoprotein CIII deficiency prevents the development of hypertriglyceridemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Metabolism.* 2003; 52(10): 1354 - 9.
18. Gordts P., Nock R., Son N.H., Ramms B., Lew I., Gonzales J.C. ApoC-III inhibits clearance of triglyceride-rich lipoproteins through LDL family receptors. *J. Clin. Invest.* 2016; 126(8): 2855 - 66.
19. Klein R.L., McHenry M.B., Lok K.H., Hunter S.J., Le N.A., Jenkins A.J., Zheng D., Apolipoprotein C-III protein concentrations and gene polymorphisms in type 1 diabetes: associations with lipoprotein subclasses. *Metabolism.* 2004; 53(10): 1296 - 1304.
20. Ai M., Otokozawa S., Asztalos B.F., Ito Y., Nakajima K., White C.C., Small dense LDL cholesterol and coronary heart disease: results from the Framingham Offspring Study. *Clin. Chem.* 2010; 56(6): 967 - 76.
21. Olivieri O., Martinelli N., Girelli D., Pizzolo F., Friso S., Beltrame F. Apolipoprotein C-III predicts cardiovascular mortality in severe coronary artery disease and is associated with an enhanced plasma thrombin generation. *J. Thromb. Haemost.* 2010; 8(3): 463 - 71.
22. Hiukka A., Fruchart-Najib J., Leinonen E., Hilden H., Fruchart J.C., Taskinen M.R. Alterations of lipids and apolipoprotein CIII in very low density lipoprotein subspecies in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2005; 48(6): 1207 - 15.
23. Ikeda H., Ikeda T. The ratios of apoC-III/apoC-II in normal full-term maternal bloods and their umbilical cord bloods. *Rinsho Byori.* 2001; 49(1): 45 - 50.
24. Larsson M., Vörresjö E., Talmud P., Lookene A., Olivecrona G. Apolipoproteins C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(47): 33997 - 40008.
25. Gracham M.J., Lee R.G., Bell T.A. 3rd, Fu W., Mullick A.E., Alexander V.J., Singleton W. Antisense oligonucleotide inhibition of apolipoprotein C-III reduces plasma triglycerides in rodents, nonhuman primates, and humans. *Circ. Res.* 2013 May 24; 112(11): 1479-90.
26. Hommelberg P.P., Plat J., Sparks L.M., Schols A.M., van Essen A.L. Palmitate-induced skeletal muscle insulin resistance does not require NF- κ B activation. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2011; 68(7): 1215 - 25.
27. Mihos C., Kolovou G.D., Mikhailidis D.P., Kovar J., Lairon D., Nordestgaard B.G. Diagnostic value of postprandial triglyceride testing in healthy subjects: a meta-analysis. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2011; 9(3): 271 - 80.
28. Otokozawa S., Ai M., Diffenderfer M.R., Asztalos B.F., Tanaka A. Fasting and postprandial apolipoprotein B-48 levels in healthy, obese, and hyperlipidemic subjects. *Metabolism.* 2009; 58(11): 1536 - 42.
29. Mahalle N.P., Garg M.K., Kulkarni M.V., Naik S.S. Differences in traditional and non-traditional risk factors with special reference to nutritional factors in patients with coronary artery disease with or without diabetes mellitus. *Indian. J. Endocrinol. Metab.* 2013; 17(5): 844 - 50.
30. Serhan C.N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 2007; 25: 101 - 37.
31. Stroes E., Moulin P., Parhofer K.G., Rebours V., Löhr J.M., Averna M. Diagnostic algorithm for familial chylomicronemia syndrome. *Atheroscler. Suppl.* 2017; 23: 1 - 7.
32. Johansen C.T., Kathiresan S., Hegele R.A. Genetic determinants of plasma triglycerides. *J. Lipid. Res.* 2011; 52(2): 189 - 206.
33. Tani S., Matsumoto M., Nagao K., Hirayama A. Association of triglyceride-rich lipoproteins-related markers and low-density lipoprotein heterogeneity with cardiovascular risk: effectiveness of polyacrylamide-gel electrophoresis as a method of determining low-density lipoprotein particle size. *J. Cardiol.* 2014; 63(1): 60 - 8.
34. Gaudet D., Brisson D., Tremblay K., Alexander V.J., Singleton W., Hughes S.G. Targeting APOC3 in the familial chylomicronemia syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(23): 2200 - 6.
35. Pavlidis A.N., Kolovou G.D., Anagnostopoulou K.K., Petrou P.C., Cokkinos D.V. Postprandial metabolic heterogeneity in men with primary dyslipidaemia. *Arch. Med. Sci.* 2010; 6(6): 879 - 86.
36. Kolovou G.D., Anagnostopoulou K.K., Kostakou P.M., Bilianou H., Mikhailidis D.P. Primary and secondary hypertriglyceridaemia. *Curr. Drug. Targets.* 2009; 10(4): 336 - 43.
37. Ribalta J., Vallvé J.C., Girona J., Masana L. Apolipoprotein and apolipoprotein receptor genes, blood lipids and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2003; 6(2): 177 - 87.
38. Ashavaid T.F., Kondkar A.A., Todur S.P., Dherai A.J., More J., Raghavan R. Lipid, lipoprotein, apolipoprotein and lipoprotein(a) levels: reference intervals in a healthy Indian population. *J. Atheroscler. Thromb.* 2005; 12(5): 251 - 9.
39. Sakurabayashi I., Saito Y., Kita T., Matsuzawa Y., Goto Y. Reference intervals for serum apolipoproteins A-I, A-II, B, C-II, C-III, and E in healthy Japanese determined with a commercial immunoturbidimetric assay and effects of sex, age, smoking, drinking, and Lp(a) level. *Clin. Chim. Acta.* 2001; 312(1-2): 87 - 95.
40. Shnol' S.E. *Physicochemical factors of biological evolution. [Fiziko-khimicheskiye faktory biologicheskoy evolyutsii]*. Moscow: Izdatel'stvo "Nauka"; 1979. (in Russian)
41. O'Keefe J.H., Carter M.D., Lavie C.J. Primary and secondary prevention of cardiovascular diseases: a practical evidence-based approach. *Mayo Clin. Proc.* 2009; 84(8): 741 - 57.
42. Kones R., Rumana U. Cardiovascular prevention: components, levels, early origins, and metrics. *Hosp. Pract (1995)*. 2014; 42(3): 84 - 95.
43. Mihos C., Kolovou G.D., Mikhailidis D.P., Kovar J., Lairon D. Diagnostic value of postprandial triglyceride testing in healthy subjects: a meta-analysis. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2011; 9(3): 271 - 80.
44. Jumpertz R., Le D.S., Turnbaugh P.J., Trinidad C., Bogardus C., Gordon J.I., Krakoff J. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011; 94(1): 58 - 65.

Поступила 01.08.17

Принята к печати 15.08.17

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.24-06:616.131-008.331.1+616.141-008.331.4-074

Авдеев С.Н.^{1,2}, Гайнитдинова В.В.¹, Царева Н.А.^{1,2}, Мерзоева З.М.^{1,2}

НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ КАК МАРКЁРЫ РАЗВИТИЯ И ПРОГНОЗА ТЯЖЕСТИ ЛЁГочНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЁГКИХ

¹ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава РФ, 119991, Москва, Россия;

²ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА, 115682, Москва, Россия

Изучена диагностическая и прогностическая значимость N-концевого предшественника натрийуретического пептида C-типа (NT-proCNP) и мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP) у больных хронической обструктивной болезнью лёгких (ХОБЛ) с лёгочной гипертензией (ЛГ). В исследование включено 47 пациентов с ХОБЛ (II–IV степени тяжести, GOLD 2016), мужчин было 44, женщин – 3, средний возраст составил $59,3 \pm 9,12$ года, длительность заболевания – $13,7 \pm 5,93$ лет, индекс курения – $23,1 \pm 10,93$ пачка-лет, индекс массы тела – $27,2 \pm 12,06$ м/кг². Критерием ЛГ с учётом параметров доплер-эхокардиографии было повышение систолического давления в лёгочной артерии (СДЛА) > 40 мм рт.ст. в покое. В зависимости от наличия и степени повышения СДЛА пациенты были разделены на три группы: 1-я – без ЛГ (СДЛА < 40 мм рт.ст., $n = 168$), 2-я – с умеренной ЛГ (СДЛА $40–55$ мм рт.ст., $n = 101$), 3-я группа – с тяжёлой ЛГ (СДЛА > 55 мм рт.ст., $n = 19$). Отмечены статистически значимые межгрупповые различия ($p_{1-2} = 0,001$, $p_{2-3} = 0,001$, $p_{1-3} < 0,001$) значений NT-proCNP и NT-proBNP. Выявлена значимая корреляционная взаимосвязь СДЛА с концентрацией NT-proCNP ($r = 0,53$, $p < 0,05$) и NT-proBNP ($r = 0,67$; $p = 0,05$). Установлена высокая диагностическая значимость определения NT-proCNP и NT-proBNP для прогнозирования развития и тяжести ЛГ у больных ХОБЛ. Регрессионный анализ Кокса показал, что повышенные уровни NT-proCNP и NT-proBNP у больных ХОБЛ с ЛГ являются предикторами госпитальной летальности.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь лёгких; лёгочная гипертензия; N-концевой предшественник натрийуретического пептида C-типа; N-концевой предшественник мозгового натрийуретического пептида.

Для цитирования: Авдеев С.Н., Гайнитдинова В.В., Царева Н.А., Мерзоева З.М. Натрийуретические пептиды как маркеры развития и прогноза тяжести легочной гипертензии у больных хронической обструктивной болезнью. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (6): 333–337. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-333-337>
Avdeev S.N.^{1,2}, Gaynitdinova V.V.¹, Tsareva N.A.^{1,2}, Merzhoeva Z.M.^{1,2}

NATRIURETIC PEPTIDES AS MARKERS OF DEVELOPMENT AND PROGNOSIS OF THE SEVERITY OF PULMONARY HYPERTENSION IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

¹First Moscow State Medical University named after I. M. Sechenov, 119991, Moscow, Russia;

²Research Institute of pulmonology, 115682, Moscow, Russia

Studied the diagnostic and prognostic significance of N-terminal precursor of natriuretic peptide C-type (NT-proCNP) and brain natriuretic peptide (NT-proBNP) in patients with COPD with pulmonary hypertension (PH). The study included 47 patients with COPD (II - IV degrees of severity, 2016 GOLD, men - 44, women - 3, mean age $59,3 \pm 9,12$ years, disease duration of $13,7 \pm 5,93$ years, the index of Smoking at $23,1 \pm 10,93$ pack-years, BMI of $27,2 \pm 12,06$ m/kg²). Criteria of pulmonary hypertension on the basis of the doppler-echocardiography was an increase of pulmonary artery systolic pressure (PASP) > 40 mmHg alone. Depending on the presence and degree of enhancement PASP patients were divided into three groups: 1 - without pulmonary hypertension (PASP < 40 mmHg, $n = 168$), 2 - moderate pulmonary hypertension (PASP $40 - 55$ mmHg, $n = 101$), 3-group with severe pulmonary hypertension (PASP > 55 mmHg, $n = 19$). There was a statistically significant intergroup differences ($p_{1-2} = 0,001$, $p_{2-3} = 0,001$, $p_{1-3} < 0,001$) values of NT-proCNP and NT-proBNP. There was a significant correlation relationship SDLA with the concentration of NT-proCNP ($r = 0,53$, $p < 0,05$) and NT-proBNP ($r = 0,67$; $p = 0,05$). A high diagnostic value of determination of NT-proCNP and NT-proBNP to predict the development and severity of PH in patients with COPD. Cox regression analysis showed that elevated levels of NT-proCNP and NT-proBNP in COPD patients of PH are the predictors of hospital mortality.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease; pulmonary hypertension; N-terminal natriuretic precursor peptide C-type; N-terminal precursor of brain natriuretic peptide.

For citation: Avdeev S.N., Gaynitdinova V.V., Tsareva N.A., Merzhoeva Z.M. Natriuretic peptides as markers of development and prognosis of pulmonary hypertension severity in patients with chronic obstructive disease. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (6): 333–337 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-333-337>

For correspondence: Gaynitdinova V.V., Doctor of Medicine, professor department of pulmonology; e-mail: ivv_08@mail.ru

Information about authors:

Avdeev S.N., <https://orcid.org/0000-0002-5999-2150>

Gaynitdinova V.V., <https://orcid.org/0000-0001-9928-926X>

Tsareva N.A., <https://orcid.org/0000-0001-9357-4924>

Merzhoeva Z.M., <https://orcid.org/0000-0002-3174-5000>

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

Acknowledment. The study had no sponsor support.

Received 07.02.2018

Accepted 14.02.2018

Для корреспонденции: Гайнитдинова Вилия Вилевна, д-р мед. наук, проф. каф. пульмонологии; e-mail: ivv_08@mail.ru

Хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ) является одной из основных причин смертности и заболеваемости во всем мире и часто осложняется развитием лёгочной гипертензии (ЛГ) [1, 2]. Наличие ЛГ при ХОБЛ ассоциируется с повышением смертности, риском повторных госпитализаций, увеличением затрат здравоохранения на лечение данной категории пациентов [3].

Перспективным является исследование ранних маркёров ЛГ. Одними из них являются биомаркеры эндотелиальной и сердечной дисфункции: натрийуретический пептид С-типа (CNP) и мозговой натрийуретический пептид (BNP) [4].

В настоящее время известно, что CNP широко экспрессируется в различных тканях, в частности, с высокой концентрацией в сосудистом эндотелии [5], в норме циркулирует в низкой концентрации. N-концевой фрагмент-предшественник натрийуретического пептида С-типа (NT-proCNP) в плазме крови человека циркулирует в эквимольных концентрациях с CNP и считается более надёжным маркёром степени его биосинтеза [6, 7]. Другим и одним из наиболее ценных биомаркёров при ЛГ является мозговой натрийуретический пептид (BNP) и его NT-концевой предшественник - NTproBNP. Он секретируется миоцитами желудочков сердца, и его высвобождение в системный кровоток прямо пропорционально степени перегрузки желудочков объёмом или давлением [8].

В связи с этим целью работы стало определение концентрации NT-proCNP, NT-proBNP у больных ХОБЛ и их диагностической ценности для прогнозирования развития и степени тяжести ЛГ у этой категории больных.

Материал и методы. В исследование включены 47 пациентов с ХОБЛ (II–IV степени тяжести спирометрической классификации, GOLD 2016), мужчин было 44, женщин – 3, средний возраст составлял $59,3 \pm 9,12$ года, длительность заболевания – $13,7 \pm 5,93$ года, индекс курения – $23,1 \pm 10,93$ пачка-лет, индекс массы тела (ИМТ) – $27,2 \pm 12,06$ м/кг². В зависимости от наличия и степени повышения систолического давления в лёгочной артерии (СДЛА) пациенты были разделены на 3 группы: 1-я – без ЛГ ($n = 21$), 2-я – с умеренной ЛГ ($n = 16$), 3-я группа – с тяжёлой ЛГ ($n = 10$). Критерием ЛГ с учётом параметров доплер-эхокардиографии было увеличение СДЛА > 40 мм рт.ст. в покое [9].

Критериями исключения из исследования были: хроническая сердечная недостаточность (с фракцией выброса левого желудочка $< 50\%$), портальная гипертензия, тромбоэмболия лёгочной артерии, заболевания соединительной ткани, ВИЧ-инфекция.

Для оценки нутритивного статуса пациентов использовался индекс массы тела (ИМТ), который рассчитывался по общепринятой формуле: $\text{ИМТ} = \text{масса тела (кг)} / \text{рост (м)}^2$. Для оценки выраженности симптомов использовался модифицированный вопросник Британского медицинского исследовательского совета (Modified British Medical Research Council (mMRC) questionnaire) и тест оценки ХОБЛ (COPD Assessment Test (CAT)), переносимость физической нагрузки оценивалась с помощью теста с 6-минутной ходьбой (Т6МХ) с последующим определением тяжести одышки по шкале Borg [GOLD, 2013].

Пульсоксиметрия (SpO₂) проводилась с помощью напалечного пульсоксиметра MD 300 С до и после Т6МХ.

Комплексная оценка функции внешнего дыхания включала бодиплетизмографию по следующим показателям: общая ёмкость лёгких (ОЁЛ), остаточный объём лёгких (ООЛ), функциональная остаточная ёмкость, внутригрудной объём, ООЛ/ОЁЛ; компьютерную спирометрию по показателям: ФЖЁЛ, ОФВ₁, ОФВ₁/ФЖЁЛ; определение бронхиального сопротивления (Росс), бронхиальной проводимости (Госс), альвеолярного давления (Ралв); исследование диффузионной способности лёгких (ДСЛ) «одиночный вдох» по показате-

лям диффузионной способности лёгких при задержке дыхания (ДСЛ_{зд}), объёма альвеолярной вентиляции (АВ), отношения ДСЛ_{зд}/АВ. Измерения проводились на оборудовании «Master Screen Body» (Erich Jaeger, Германия).

Эхокардиографическое исследование сердца проводилось на аппарате «Philips En Visor CHD» (Голландия), изучались стандартные параметры гемодинамики, СДЛА определяли с помощью непрерывно-волновой доплерографии. Систолический градиент давления между правым желудочком (ПЖ) и правым предсердием (ПП) рассчитывали по формуле Бернулли с использованием пиковой скорости потока трикуспидальной регургитации. Сумму транстрикуспидального градиента и давления в ПП принимали равной СДЛА (в отсутствие стеноза клапана лёгочной артерии). Давление в ПП оценивали эмпирически, используя метод В. Kircher.

Плазменный уровень N-концевого натрийуретического пептида С-типа (NT-proCNP) (набор Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co KG, A-1210, Австрия) и N-концевого мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP) (набор ЗАО «Вектор-Бест», Россия) определяли иммуноферментным методом.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA V.7.0 («StatsoftInc», США). Для всех имеющихся выборок проводили анализ соответствия вида распределения количественных признаков закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Поскольку распределение признаков в группах не являлось нормальным, сравнительный анализ групп проводился с помощью непараметрических методов. Для сравнения трёх групп использовался ранговый анализ вариаций по Краскеллу–Уоллису. В случае если нулевая гипотеза об отсутствии различий отклонялась, проводили парное сравнение групп с использованием непараметрического теста Манна–Уитни. Количественные данные представлены в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее, m – стандартная ошибка средней. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для анализа чувствительности диагностического теста использовали пакет прикладных программ SPSS for Windows, Release 22. Для определения предикторов госпитальной летальности рассчитывалась модель пропорциональных рисков (Cox regression). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Зависимость количественных показателей оценивалась с помощью корреляционного анализа.

Результаты. Группы пациентов не различались по возрасту, длительности заболевания. Средние спирометрические показатели согласно классификации (GOLD, 2016) в группах больных без ЛГ и с умеренной ЛГ соответствовали III (тяжёлой) степени тяжести, но бронхиальная обструкция в группе больных с умеренной ЛГ была сильнее по сравнению с группой больных без ЛГ. В то же время у пациентов с тяжёлой ЛГ отмечались более значимые нарушения функции внешнего дыхания по сравнению с пациентами без ЛГ и с умеренной ЛГ ($p_{2-3} = 0,05$, $p_{1-3} = 0,001$) и соответствовали IV (крайне тяжёлой) степени тяжести ХОБЛ.

Концентрация сосудистых маркёров NT-proCNP, NT-proBNP в крови больных ХОБЛ была статистически значимо выше контрольных значений ($p = 0,001$, $p = 0,001$).

Выявлены статистически высокосignальные межгрупповые различия в концентрации NT-proCNP у больных ХОБЛ без ЛГ, с умеренной и тяжёлой ЛГ ($p_{1-2} = 0,001$, $p_{2-3} = 0,001$, $p_{1-3} = 0,001$ соответственно).

Медианные значения концентрации NT-proCNP у больных ХОБЛ без ЛГ в среднем составили $1,44 (1,09–1,68)$ пг/мл, у больных с умеренной ЛГ – $3,14 (2,4–5,48)$ пг/мл, а наибольшее содержание NT-proCNP – $5,14 (3,7–6,96)$ пг/мл наблюдалось в группе больных с тяжёлой ЛГ.

Предикторы госпитальной летальности у больных ХОБЛ с лёгочной гипертензией

Предикторная переменная	Коэффициент β	Стандартная ошибка	Статистика Вальда χ^2	p	Отношение рисков	95% ДИ
САГ, баллы	0,30	0,06	22,60	0,001	1,36	1,2–1,5
Borg, баллы	1,31	0,32	16,38	0,001	3,69	1,9–0,1
частота обострений / год	1,47	0,24	16,56	0,001	4,37	2,1–8,9
СДЛА, мм рт. ст.	0,04	0,01	6,71	0,009	1,34	1,0–1,1
СРБ, мг/л	0,16	0,024	43,48	0,001	1,18	1,1–1,2
Фибриноген, г/л	0,22	0,09	6,78	0,009	1,25	1,1–1,5
NT-proCNP, пг/мл	1,24	0,32	6,9	0,001	1,32	1,2–2,6
NT-proBNP, пг/мл	1,28	0,31	15,18	0,001	1,6	1,7–6,9

Показана статистически значимая корреляционная взаимосвязь между концентрацией NT-proCNP и уровнем СДЛА ($r = +0,53$, $p = 0,03$), концентрацией СРБ ($r = +0,50$, $p = 0,02$), размером ПП ($r = +0,38$, $p = 0,02$), толщиной передней стенки правого желудочка (ТПСПЖ) ($r = +0,35$, $p = 0,04$), конечно-диастолическим размером правого желудочка (КДРПЖ) ($r = +0,39$, $p = 0,05$), SpO_2 ($r = -0,45$, $p = 0,05$).

Установлены также статистически высокосignимые межгрупповые различия концентраций другого натрийуретического пептида – NT-proBNP у больных ХОБЛ без повышения систолического давления в лёгочной артерии, с умеренной и тяжёлой ЛГ ($p_{1,2} = 0,001$, $p_{2,3} = 0,001$, $p_{1,3} = 0,001$).

Так, концентрация NT-proBNP у больных без ЛГ составила 356,6 (267,2–429,4) пг/мл, у больных с умеренной ЛГ – 429,4 (345,0–625,0) пг/мл и у больных с тяжёлой ЛГ – 861,8(670,0–908,8) пг/мл, т.е. повышение концентрации данного пептида было прямо пропорционально повышению СДЛА (рис. 1).

Повышение концентрации NT-proBNP в крови больных ХОБЛ статистически значимо прямо коррелировало с уровнем СДЛА ($r = 0,67$; $p = 0,05$), СРБ ($r = 0,51$, $p = 0,04$), ТПСПЖ ($r = 0,51$, $p = 0,03$), размером ПП ($r = 0,42$, $p = 0,03$), КДРПЖ ($r = 0,38$, $p = 0,02$), ЧСС ($r = 0,29$, $p = 0,04$). Обратная корреляционная взаимосвязь выявлена между концентрацией NT-proBNP и SpO_2 ($r = -0,48$, $p = 0,05$), SpO_2 после физической нагрузки (Т6МХ) ($r = -0,46$, $p = 0,04$) и результатом Т6МХ ($r = -0,37$, $p = 0,04$).

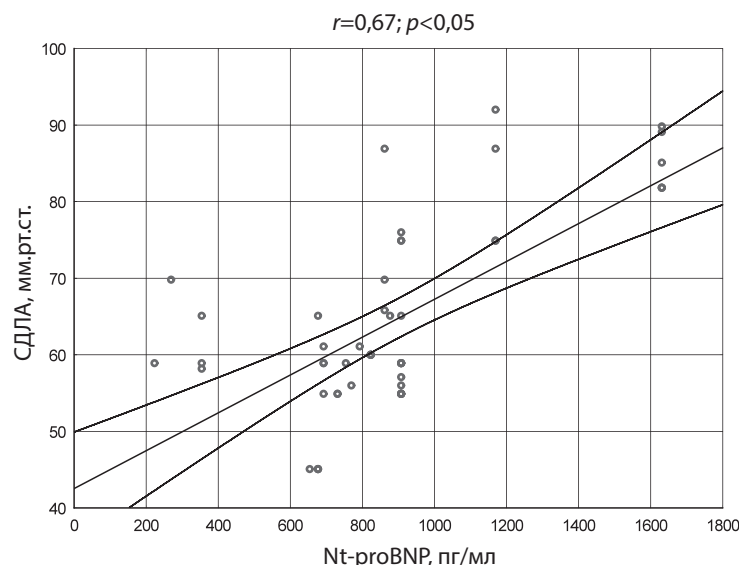


Рис. 1. Корреляционная взаимосвязь систолического давления в лёгочной артерии и концентрации NT-proBNP у больных ХОБЛ.

Анализ ROC-кривых для NT-proCNP и NT-proBNP выявил высокую диагностическую значимость их определения для прогнозирования ЛГ у больных ХОБЛ.

Для прогнозирования умеренной ЛГ у больных ХОБЛ AUC ROC для NT-proCNP составила 0,928 ($p < 0,05$; 95%, ДИ 0,856–0,977), для NT-proBNP – 0,808 ($p < 0,05$; 95%, ДИ 0,738–0,877, рис. 2, а); пороговыми стали значения NT-proCNP $>2,16$ (чувствительность 86%, специфичность 97%), NT-proBNP $>404,00$ пг/мл (чувствительность 78%, специфичность 76%).

Для прогнозирования тяжёлой ЛГ у больных ХОБЛ AUC ROC для NT-proCNP составила 0,932 ($p < 0,05$; 95%, ДИ 0,886–0,977), для NT-proBNP – 0,996 ($p < 0,05$; 95% ДИ 0,988–1,000, рис. 2, б); пороговыми стали значения NT-proCNP $>3,62$ (чувствительность 96%, специфичность 98%), NT-proBNP $>631,5$ пг/мл (чувствительность 88%, специфичность 96%).

Регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса показал, что повышение концентрации NT-proCNP и NT-proBNP наряду с выраженностью одышки по оценочному тесту САГ, по шкале Borg, частоте обострений в год, содержанием СРБ и фибриногена являются независимыми предикторами госпитальной летальности больных ХОБЛ с ЛГ (см. таблицу).

Обсуждение. В настоящем исследовании изучались концентрации NT-proCNP и NT-proBNP у больных ХОБЛ, их диагностическая ценность для прогнозирования развития и степени тяжести ЛГ у этой категории больных.

Патогенез сосудистых нарушений, связанных с ХОБЛ, до конца не изучен, но предполагается, что имеет значение совокупное воздействие гипоксии [10], нарушения лёгочной функции с формированием воздушных ловушек [11], токсического влияния курения [12], сосудистого воспаления [13], дисфункции эндотелия [14] и неоангиогенеза [11]. Эндотелиальные клетки лёгочных сосудов обладают паракринной, метаболической активностью, способностью выделять вазоактивные соединения, действующие на тонус сосудов и вызывающие гипоксическую вазоконстрикцию.

Содержание CNP изучалось при хронической почечной недостаточности, при сепсисе [12], в человеческой неоинтимальной ГМК после ангиопластики [15], при атеросклеротическом стенозе аортального клапана [16], при хронической сердечной недостаточности, при диабетической кардиомиопатии в генетической мышиной модели заболевания [17]. На животных моделях показано, что воспалительные цитокины, такие как ИЛ-1, TNF α , и эндотоксины вызывают высвобождение CNP из эндотелиальных клеток [6].

В исследовании R. Cargill и соавт.[18] показано значительное (в 3,2 раза) повышение плазменного уровня CNP у больных с лёгочным сердцем по сравнению с пациентами с хронической сердечной недостаточностью. Авторы предположили, что причиной повреждения эндотелия, при котором CNP может просачиваться в плазму в большем количестве, является хроническая артериальная гипоксемия.

В настоящем исследовании показано, что концентрации NT-proCNP повышаются по мере увеличения степени ЛГ. У больных ХОБЛ с тяжёлой ЛГ выявлено повышение плазменного уровня NT-proCNP в 1,3 и 3,7 раза по сравнению с группами больных ХОБЛ с умеренной ЛГ и без ЛГ, соответственно.

Анализ ROC-кривой в настоящем исследовании показал высокую диагностическую значимость определения NT-proCNP у больных ХОБЛ для прогнозирования

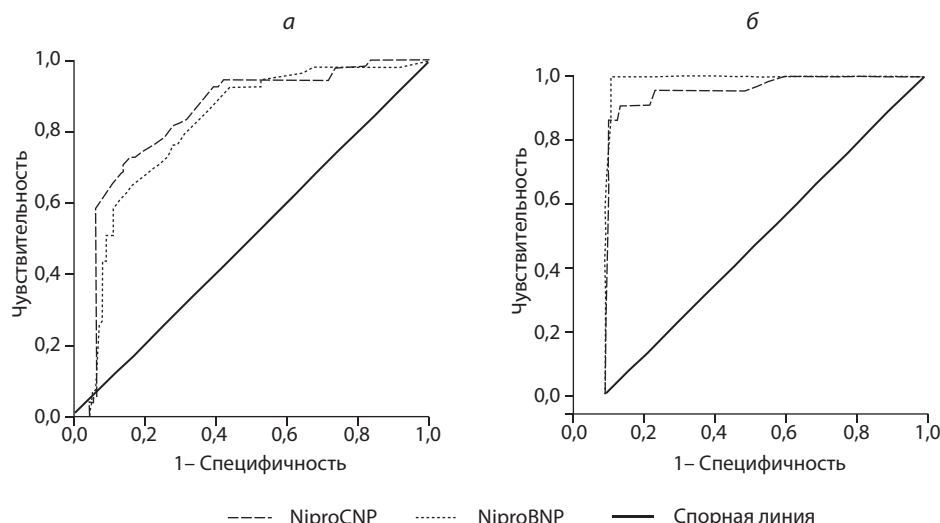


Рис. 2. ROC-кривые определения NT-proCNP и NT-proBNP для прогнозирования степени тяжести ЛГ у больных ХОБЛ.

а – умеренная ЛГ, б – тяжёлая ЛГ.

развития и тяжести ЛГ. В других исследованиях для прогнозирования ЛГ у больных ХОБЛ показана диагностическая и прогностическая ценность BNP [19]. Установлены значимые корреляционные взаимосвязи концентрации NT-proCNP с уровнем СДЛА, концентрацией С-реактивного белка, гипоксемией.

Хорошо известно, что определение концентрации BNP и NT-proBNP является необходимым для диагностики пациентов с подозрением на сердечную недостаточность [20]. В то же время известно, что уровень BNP в плазме крови повышен и у пациентов с вторичной ЛГ и хроническими заболеваниями лёгких с перегрузкой ПЖ [21]. Значимое увеличение (в несколько раз) концентрации циркулирующих в крови ANP и BNP у больных с лёгочным сердцем наблюдается даже при отсутствии нарушенной функции левого желудочка [22]. Предположительно, их высвобождение стимулирует увеличение размеров или гиперактивности правого предсердия в ответ на повышение постнагрузки ПЖ. Кроме того, BNP является преобладающим из натрийуретических пептидов, который модулирует реакции лёгочных сосудов к гипоксии [23].

S. Chi и соавт. [20] продемонстрировали существенное увеличение содержания NT-proBNP при тяжёлой ХОБЛ, прогрессировании хронической дыхательной недостаточности и наличии ЛГ у больных со стабильной ХОБЛ [24]. Хроническая гипоксия, вызванная прогрессированием ХОБЛ, может привести к сужению легочных артериол, увеличению систолического давления в лёгочной артерии и повышению уровня NT-proBNP.

В проведённом нами исследовании определение концентраций NT-proBNP у больных ХОБЛ показало наибольшую концентрацию NT-proBNP у больных с тяжёлой ЛГ, т.е. повышение концентрации данного пептида было прямо пропорционально повышению СДЛА. Кроме того, повышение концентрации NT-proBNP в крови больных ХОБЛ значимо коррелировало с уровнем СРБ, размерами ПП и ПЖ. Умеренная обратная корреляционная взаимосвязь концентрации NT-proBNP была выявлена с гипоксемией (SpO_2) и результатом Т6МХ.

ROC-анализ для NT-proBNP показал высокую диагностическую значимость определения концентрации этого пептида для прогнозирования развития и тяжести ЛГ у больных ХОБЛ.

Регрессионный анализ Кокса показал, что повышенные уровни NT-proCNP и NT-proBNP у больных ХОБЛ с ЛГ являются предикторами госпитальной летальности. Полученные данные согласуются с результатами ранее проведённых исследований [25].

Таким образом, у больных ХОБЛ выявлено коррелирующее со степенью тяжести ЛГ повышение концентрации NT-proCNP и NT-proBNP в крови, что позволяет рассматривать эти маркеры как чувствительные и специфичные тесты для прогнозирования ЛГ при ХОБЛ. Повышение уровня исследуемых пептидов является предиктором летальности больных ХОБЛ с ЛГ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-2, 5-19, 20-25 см. REFERENCES)

3. Авдеев С.Н. *Легочная гипертензия, ассоциированная с заболеваниями легких. Легочная гипертензия*. Чазова И.Е., Мартынюк Т.В., ред. М.: Практика; 2015.
4. Попова, К.А. Значение натрийуретических пептидов в диагностике сердечной недостаточности и других заболеваний. *Пульмонология*. 2006; 4: 106–11.
19. Неклюдова Г.В., Авдеев С.Н., Баймаканова Г.Е. Хроническая обструктивная болезнь легких и легочная гипертензия: мозговой натрийуретический пептид как маркер легочной гипертензии. *Пульмонология*. 2013; 3: 31–5.

REFERENCES

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 2016. <http://goldcopd.org>
2. Chuchalin A.G., Khaltaev N., Antonov N.S. et al. Chronic respiratory diseases and risk factors in 12 regions of the Russian Federation. *Int. J. COPD*. 2014; 9 (12): 963–74.
3. Avdeev S. N. *Pulmonary hypertension associated with lung diseases [Lyogochhnaya gipertenziya]*. Chasova I. E., Martynyuk T. V., eds. Pulmonary hypertension. Moscow: Praktika; 2015. (in Russian)
4. Popova K.A. The importance of natriuretic peptides in the diagnosis of heart failure and other diseases. *Pulmonologiya*. 2006; 4: 106–11. (in Russian)
5. Scotland R.S. C-type natriuretic peptide in vascular physiology and disease. *Pharmacol. Ther.* 2005; 105:85–93.
6. Suga S., Itoh H., Komatsu Y. et al. Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells—evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. *Endokrinologiya*. 1993; 133: 3038–41.
7. Sellitti D.F. Regulation of C-type natriuretic peptide expression. *Peptides*. 2011; 32: 1964–71.
8. Yoshimura M., Yasue H., Okumura K. et al. Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 1993; 87: 464–9.
9. Galiè N., Humbert M., Vachiery J.-L. et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS); Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur. Heart J.* 2016; 37 (1): 67–119.
10. Burrows B. Arterial oxygenation and pulmonary hemodynamics in patients with chronic airways obstruction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1974; 110: 64–70.

11. Santos S., Peinado V.I., Ramirez J. et al. Characterization of pulmonary vascular remodeling in smokers and patients with mild COPD. *Eur. Respir. J.* 2002; 19: 632–8.
12. Hales C.A. The site and mechanism of oxygen sensing for the pulmonary vessel. *Chest.* 1985; 88 (suppl.): 235S–40.
13. Domínguez-Fandos D., Peinado V.I., Puig-Pey R. et al. Pulmonary inflammatory reaction and structural changes induced by cigarette smoke exposure in the guinea pig. *COPD.* 2012; 9: 473–84.
14. Peinado V.I., Barbera J.A., Ramirez J. et al. Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with COPD. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: L 908–13.
15. Naruko T., Itoh A., Haze K. et al. C-type natriuretic peptide and natriuretic peptide receptors are expressed by smooth muscle cells in the neointima after percutaneous coronary intervention. *Atherosclerosis.* 2005; 181:241–50.
16. Peltonen T.O., Taskinen P., Soini Y. et al. Distinct downregulation of C-type natriuretic peptide system in human aortic valve stenosis. *Circulation.* 2007; 116: 1283–9.
17. Christoffersen C., Bartels E.D., Nielsen L.B. Heart specific up-regulation of genes for B-type and C-type natriuretic peptide receptors in diabetic mice. *Eur. J. Clin. Invest.* 2006; 36: 69–75.
18. Cargill R.I., Barr Craig S., Coutie Wendy J. et al. C-type natriuretic peptide levels in cor pulmonale and in congestive heart failure. *Thorax.* 1994; 49: 1247–9.
19. Neklyudova G. V., Avdeev S. N., Baymakhanova G. E. Chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary hypertension: brain natriuretic peptide as a marker of pulmonary hypertension. *Pulmonologiya.* 2013; 3: 31–5. (in Russian)
20. Stolz D., Breidhardt T., Christ-Crain M. et al. Use of B-type natriuretic peptide in the risk stratification of acute exacerbations of COPD. *Chest.* 2008; 133(5): 1088–94.
21. Leuchte H.H., Baumgartner R.A., Nounou M.E. et al. Brain natriuretic peptide is a prognostic parameter in chronic lung disease. *Am. J. Respir.* 2006; 173: 744–50.
22. Lang C.C., Coutie W.J., Struther A.D. et al. Elevated levels of brain natriuretic peptide in acute hypoxaemic chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Sci. (Lond).* 1992; 83 (5): 529–33.
23. Aronson D., Burger A. Diabetes and the occurrence of ventricular arrhythmic events in patients with severe left ventricular dysfunction. *Diabetologia* 2002; 45:1440–5.
24. Chi S.Y., Kim E.Y., Ban H.J. et al. Plasma N-terminal Pro-brain Natriuretic Peptide: A Prognostic Marker in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Lung.* 2012; 190: 271–6.
25. Moreno A., Monton C., Belmonte Y. et al. Causes of death and risk factors for mortality in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Arch. Bronconeumol.* 2009; 45 (4): 181–6.

Поступила 07.02.18

Принята к печати 14.02.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.12-008.331.1-018.7-002-074

Чукаева И.И., Спирякина Я.Г., Орлова Н.В., Глибко К.В., Орлов Д.А.

ОЦЕНКА МАРКЁРОВ ВОСПАЛЕНИЯ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ НА ФОНЕ ДОСТИЖЕНИЯ ЦЕЛЕВОГО УРОВНЯ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ

ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия

Поражение органов-мишеней при артериальной гипертензии в основном реализуется через нарушение функции эндотелия. В настоящем исследовании изучены маркёры воспаления и эндотелиальной дисфункции у пациентов с артериальной гипертензией до и после достижения целевого уровня артериального давления (АД). Проведено клинко-лабораторное обследование 44 пациентов (17 мужчин, 27 женщин; средний возраст пациентов 58,59±10,57 года) с гипертонической болезнью II стадии, 2–3-й степени, высокого и очень высокого риска сердечно-сосудистых осложнений, не достигших целевого уровня АД на фоне предшествующей терапии. Всем пациентам назначалась стандартизированная терапия фиксированной комбинацией амлодипина/индапамида/периндоприла в индивидуально подобранной дозировке. Продолжительность наблюдения составила 6 мес. Измерялся уровень провоспалительного интерлейкина-6 (ИЛ-6), противовоспалительного интерлейкина-10 (ИЛ-10), молекулы адгезии сосудов эндотелия типа 1 (sVCAM-1) и васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF). Все пациенты достигли целевого уровня АД к моменту окончания исследования (систолическое АД составило 125,1±6,9 мм рт.ст., диастолическое – 82,2±5 мм рт.ст., $p < 0,001$). Через 6 мес не отмечено достоверной динамики маркёров воспаления. Уровень sVCAM-1 как показатель эндотелиальной дисфункции на фоне достижения целевого уровня АД снизился (898,67±433,5 нг/мл против 1063,5±442,4 нг/мл на старте лечения; $p < 0,001$). Таким образом, молекула адгезии sVCAM-1 может служить маркёром дисфункции эндотелия у пациентов с артериальной гипертензией. Адекватная терапия артериальной гипертензии с достижением целевого уровня АД улучшает функции эндотелия сосудов, достоверно снижая экспрессию sVCAM-1.

Ключевые слова: артериальная гипертензия; дисфункция эндотелия; факторы воспаления.

Для цитирования: Чукаева И.И., Спирякина Я.Г., Орлова Н.В., Глибко К.В., Орлов Д.А. Оценка маркеров воспаления и эндотелиальной дисфункции у пациентов с артериальной гипертензией на фоне достижения целевых цифр артериального давления. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (6): 337–340. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-337-340>

Chukaeva I.I., Spiryakina Ya.G., Orlova N.V., Glibko K.V., Orlov D.A.

EVALUATION OF INFLAMMATORY AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION'S BIOMARKERS IN PATIENTS WITH HYPERTENSION AT ACHIEVING THE TARGET BLOOD PRESSURE

Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, Russia

Для корреспонденции: Спирякина Яна Геннадьевна, канд. мед. наук, доц. каф. поликлинической терапии лечебного факультета; e-mail: janezo@yandex.ru

The target organs damage in hypertension is mainly realized through an endothelial dysfunction. The present study investigated the inflammatory and endothelial dysfunction's biomarkers in patients with hypertension before and after the achieving the target level of blood pressure. We've performed clinical and laboratory study of 44 patients (17 men, 27 women, mean age 58.59 ± 10.57 years) with the hypertension stage II, degrees 2-3, high and very high risk of cardiovascular complications, not reaching the target level of blood pressure at the previous therapy. All patients received standardized therapy with a fixed combination of amlodipine / indapamide / perindopril in an individually selected dosage. The duration of the follow-up was 6 months. The levels of pro-inflammatory interleukin-6 (IL-6), anti-inflammatory interleukin-10 (IL-10), vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) and vasculoendothelial growth factor (VEGF) were measured. All patients achieved the target blood pressure level at the end of the study (systolic blood pressure was 125.1 ± 6.9 mm Hg, diastolic - 82.2 ± 5 mm Hg, $p < 0.001$). After 6 months, there was no significant dynamics of inflammatory biomarkers. The level of sVCAM-1, as an indicator of endothelial dysfunction, decreased (898.67 ± 433.5 ng / ml vs. 1063.5 ± 442.4 ng / ml at the start of treatment, $p < 0.001$). Thus, it is possible to use vascular cell adhesion molecule-1 as a biomarker of endothelial dysfunction in patients with hypertension. Adequate therapy of hypertension with achievement of target blood pressure levels improves vascular endothelial function, significantly reducing sVCAM-1 expression.

Key words: hypertension; endothelial dysfunction; inflammatory biomarkers, sVCAM-1.

For citation: Chukaeva I.I., Spiryakina Ya.G., Orlova N.V., Glibko K.V., Orlov D.A. Evaluation of inflammatory and endothelial dysfunction's biomarkers in patients with hypertension at achieving the target blood pressure. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (6): 337-340 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-337-340>

For correspondence: Spiryakina Ya.G., Candidate of Medical Science, Associate Professor of Outpatient Therapy Department; e-mail: janezo@yandex.ru

Information about authors:

Spiryakina Ya.G., <https://orcid.org/0000-0002-1006-4118>

Orlova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-4293-3285>

Glibko K.V., <https://orcid.org/0000-0001-7331-2791>

Orlov D.A., <https://orcid.org/0000-0002-0994-8880>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 06.02.2018
Accepted 15.02.2018

Артериальная гипертензия (АГ) - наиболее значимый фактор риска сердечно-сосудистой смертности в современном мире [1]. По данным ВОЗ неконтролируемая АГ до 9 раз увеличивает риск инсульта и до 5 раз риск инфаркта миокарда. Большинство механизмов поражения органов-мишеней при АГ реализуется через нарушение функции эндотелия. Эндотелиальная дисфункция характеризуется уменьшением продукции важнейшего вазодилатирующего агента - оксида азота и как следствие активацией ядерного фактора транскрипции, под влиянием которого эндотелиоциты экспрессируют молекулы сосудистой адгезии, притягивающие макрофаги. Кроме того, повышается проницаемость эндотелия как для лейкоцитов, так и для липидов, что в конечном итоге реализуется в развитие ремоделирования сосуда, формирование атеросклеротической бляшки. Таким образом, эндотелиальная дисфункция может рассматриваться в качестве раннего маркера возникновения и прогрессирования атеросклероза у пациентов с АГ [2-4].

Эндотелий сосудов - самый большой эндокринный орган, продуцирующий большое количество биологически активных веществ, в том числе цитокинов. Дисбаланс цитокинов, вызванный эндотелиальной дисфункцией, способствует развитию системной воспалительной реакции, что наряду с изменением тромбогенных свойств эндотелия (усиления агрегации лейкоцитов и тромбоцитов), потенцированием гиперкоагуляции, нарушением перекисного окисления липидов и угнетением антиоксидантной защиты приводит к развитию и прогрессированию атеросклероза. В клинических исследованиях, проводившихся в целях изучения уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у пациентов с АГ до лечения и через 6-12 мес после лечения антигипертензивными препаратами, показано снижение активности показателей воспаления на фоне лечения АГ [5, 6].

В современной клинической практике большое значение придаётся достижению целевого уровня артериального

давления (АД), при котором, как показывает ряд рандомизированных клинических исследований, уменьшается частота сердечно-сосудистых осложнений и замедляется прогрессирование поражения органов-мишеней [7-9].

Цель настоящего исследования - оценка влияния достижения целевого АД на уровень маркеров системного воспаления и эндотелиальной дисфункции.

Материал и методы. В открытое проспективное исследование были включены 44 пациента (17 мужчин, 27 женщин) с гипертонической болезнью II стадии, 2-3-й степени, высокого и очень высокого риска сердечно-сосудистых осложнений (ССО), не достигшие на момент включения целевого уровня АД на фоне предшествующей терапии. Средний возраст пациентов составил $58,59 \pm 10,57$ года. Среди пациентов, принявших участие в исследовании, у 9% длительность АГ составила менее 5 лет, у 23% - 5-10 лет, 68% обследуемых пациентов страдали АГ более 10 лет.

Пациенты с вторичной АГ в исследование не включались; наличие любых острых заболеваний или хронических в стадии обострения или декомпенсации, аутоиммунных и онкологических заболеваний также являлось критерием не включения в исследование.

Всем пациентам для достижения целевого уровня АД назначалась терапия фиксированной комбинацией амлодипина/индапамид/периндоприла без периода вымывания, в индивидуально подобранной дозировке 5/0,625/2,5/1,25/4, 5/2,5/8 или 10/2,5/8 мг с возможностью дальнейшей титрации дозы. Продолжительность наблюдения 6 мес.

Пациенты обследованы на базе поликлинического отделения городской клинической больницы №13. Всем пациентам проводилось общеклиническое обследование, включавшее сбор анамнеза, проведение физикального осмотра, оценку антропометрических данных, измерение АД. Ожирением страдали 59% пациентов, дислипидемия выявлена у 80%. Стратификация риска ССО проводилась на основании реко-

Таблица 1

Динамика систолического АД (САД), диастолического АД (ДАД) и пульсового АД (ПАД) у пациентов исходно и на фоне лечения

Показатель, мм рт.ст.	Исходно	Через 6 мес	Δ 6 мес, %
САД	153±11	125,1±6,9	-18,3*
ДАД	91±6,7	82,2±5	-9,6*
ПАД	61,7±9,1	43±7,9	-30,3*

Примечание. * – $p < 0,001$ при сравнении с исходными значениями.

Таблица 2

Динамика концентраций ИЛ-6 и ИЛ-10 в сыворотке крови на фоне лечения

Показатель, пг/мл	Исходно (n = 44)	Через 6 мес терапии (n = 44)
ИЛ-6	1,9±0,5	1,8±0,8
ИЛ-10	8,29±7,5	6,38±2,7

Таблица 3

Уровень маркёров эндотелиальной дисфункции до лечения и на фоне терапии АГ с достижением целевых значений АД

Показатель	Исходно	Через 6 мес терапии
sVCAM, нг/мл	1063,5±442,4	898,67±433,5*
VEGF, пг/мл	583,14±393,2	570,0±468,7

Примечание. * – $p < 0,001$ в сравнении с исходными значениями.

мендаций Российского медицинского общества артериальной гипертензии. Все пациенты вели дневник самоконтроля АД с обязательным ежедневным измерением. Осмотры пациентов врачом и коррекция дозы препарата (при необходимости) проводились ежемесячно.

Всем больным для исследования цитокинов и маркёров эндотелиальной дисфункции производили забор венозной крови с помощью пункции v. Cubitalis в 1-й день и через 6 мес. Для оценки реакций воспаления измерялись уровни провоспалительного интерлейкина-6 (ИЛ-6) и противовоспалительного интерлейкина-10 (ИЛ-10). Концентрацию ИЛ-6 и ИЛ-10 в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа при использовании одноимённых наборов реагентов фирмы e-Biosciences (США).

Изменение функции эндотелия оценивалось по динамике концентрации молекулы адгезии сосудистого эндотелия типа 1 (sVCAM-1) и васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF). Концентрация sVCAM-1 и VEGF в сыворотке крови определялась методом иммуноферментного анализа при использовании наборов реагентов фирмы e-Biosciences (США).

Статистическую обработку результатов проводили с применением программы Statistica 13.2. Для описания количественных показателей использовано среднее значение и стандартное отклонение. О достоверности различий показателей судили по величине t -критерия Стьюдента с предварительной проверкой распределения на нормальность. Результаты исследования рассматривали как статистически значимые при $p \leq 0,05$.

Результаты. Все пациенты, принимавшие участие в исследовании, достигли целевого уровня АД к моменту окончания исследования (табл. 1). При этом 93% пациентов достигли целевого АД уже через 3 мес после перевода на фиксированную комбинацию амлодипина/индапамида/периндоприла. Пульсовое артериальное давление (ПАД), являющееся маркёром жёсткости сосудистой стенки, достоверно снизилось и к моменту завершения исследования составило $43 \pm 7,9$ мм рт.ст. (против $61,7 \pm 9,1$ мм рт.ст.).

На фоне терапии через 6 мес не отмечено достоверной динамики маркёров воспаления (табл. 2).

Уровень растворимой молекулы сосудистой адгезии как показателя эндотелиальной дисфункции снизился ($p < 0,001$) на фоне достижения целевого уровня АД, отмечена также тенденция к снижению уровня sVEGF (табл. 3).

Обсуждение. Длительно существующая АГ патогенетически связана с возникающими иммуновоспалительными внутрисосудистыми изменениями. Ряд авторов связывают степень выраженности воспалительных реакций с длительностью и тяжестью заболевания [5]. В текущем исследовании исходные уровни провоспалительного ИЛ-6 и противовоспалительного ИЛ-10 у пациентов с АГ, не достигших целевого уровня АД, получавших при этом какую-либо антигипертензивную терапию, оказались в пределах общепринятой лабораторной нормы ($< 6,4$ пг/мл для ИЛ-6, $< 9,1$ пг/мл для ИЛ-10). Исходно низкие значения маркёров воспаления, вероятно, можно объяснить предшествующим лечением и средним уровнем АД на момент включения в исследование, соответствующим 1-2-й степени повышения АД.

Изменение экспрессии растворимой формы молекулы VCAM-1 может служить маркёром изменения функции эндотелия, так как концентрация её в периферической крови имеет прямую положительную связь с наличием патологической активации эндотелия [10]. Эндотелиальная дисфункция, проявляясь как нарушенная эндотелийзависимая вазодилатация артериол, гиперфилтрация в капиллярах и экссудация белка в венулах, приводит к различным сосудистым патологиям – атеросклерозу, ишемии, сосудистому воспалению. В различных исследованиях показана роль повышенной концентрации sVCAM-1 в прогрессировании АГ, атеросклероза, когнитивных нарушений [11]. Снижение концентрации sVCAM-1 в периферической крови на фоне адекватной терапии АГ свидетельствует об обратимости патологического изменения эндотелия, а также о возможном органопротективном действии применяемой терапии.

Заключение. Молекула адгезии сосудистого эндотелия типа 1 – sVCAM-1 может служить маркёром дисфункции эндотелия у пациентов с артериальной гипертензией. Адекватная терапия артериальной гипертензии с достижением целевого уровня артериального давления улучшает функции эндотелия сосудов, достоверно снижая экспрессию растворимой молекулы адгезии сосудистого эндотелия типа 1 – sVCAM-1.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–4, 7–11 см. REFERENCES)

- Волошина И.Н. Динамика цитокинового профиля у больных артериальной гипертензией на фоне применения карведилола. *Таврический медико-биологический вестник*. 2011; 14(1): 31–5.
- Бычков О.А., Бычкова Н.Г. Особенности иммунного и цитокинового статуса в динамике лечения больных артериальной гипертензией с сопутствующим остеоартрозом. *Современная медицина: актуальные вопросы*. 2015; 44–45: 11–7.

REFERENCES

- Ford E.S., Capewell S. Proportion of the decline in cardiovascular mortality disease due to prevention versus treatment: public health versus clinical care. *Annu. Rev. Public Health*. 2011; 32: 5–22.
- Perticone F., Maio R., Perticone M., Miceli S., Sciacqua A., Tassone E.J. et al. Endothelial dysfunction predicts regression of hypertensive cardiac mass. *International Journal of Cardiology*. 2013; 167(4): 1188–92.
- Davignon J., Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109 (suppl 1): 27–32.

4. Oliveira G.H. Novel serologic markers of cardiovascular risk. *Current Atherosclerosis Reports* 2005; 7: 148-54.
5. Voloshina I.N. The dynamics of cytokine's serum profile in hypertensive patients treated with carvedilol. *Tavrisheskiy mediko-biologicheskii vestnik*. 2011; 14 (1): 31-5. (in Russian)
6. Bychkov O.A., Bychkova N.G. Features of immune and cytokine status during the treatment of patients with arterial hypertension and concomitant osteoarthritis. *Sovremennaya meditsina: aktual'nye voprosy*. 2015; 44-45: 11-7. (in Russian)
7. Okin P.M., Oikarinen L., Viitasalo M., Toivonen L., Kjeldsen S.E., Nieminen M.S., et al. Serial assessment of the electrocardiographic strain pattern for prediction of new-onset heart failure during antihypertensive treatment: the LIFE study. *Eur. J. Heart Fail* 2011; 13:384-91.
8. Schmieder R.E., Mann J.F., Schumacher H., Gao P., Mancia G., Weber M.A., et al. Changes in albuminuria predict mortality and morbidity in patients with vascular disease. *J. Am. Soc. Nephrol* 2011; 22:1353-64.
9. Goldberger Z.D., Valle J.A., Dandekar V.K., Chan P.S., Ko D.T., Nallamothu B.K. Are changes in carotid intima-media thickness related to risk of nonfatal myocardial infarction? A critical review and meta-regression analysis. *Am. Heart J.* 2010; 160:701-14.
10. Kriegelstein C.F., Granger D.N. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am. J. Hypertens.* 2001; 14(6 Pt 2):44S-54S.
11. Uiterwijk R., Huijts M., Staals J., Rouhl R.P., De Leeuw P.W., Kroon A.A. et al. Endothelial activation is associated with cognitive performance in patients with hypertension. *Am. J. Hypertens.* 2016; 29(4):464-9.

Поступила 06.02.18

Принята к печати 15.02.18

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.5-002.525.2-031.81-092:612.017.1

Александрова Е.Н.¹, Новиков А.А.¹, Верижникова Ж.Г.², Лукина Г.В.^{1,2}

СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА ПРОБЛЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИНУКЛЕАРНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы», 111123, Москва;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», 115522, Москва, Российская Федерация

В обзоре рассматриваются актуальные аспекты исследования антинуклеарных антител (АНА) при системной красной волчанке (СКВ). АНА – основной серологический маркер СКВ. В пробах сыворотки больных СКВ обнаруживаются антитела к ДНК, гистонам, нуклеосомам, экстрагируемым ядерным антигенам (Sm, U1 рибонуклеопротеину, Ro/SSA, La/SSB, рибосомальному белку Р), ядерным антигенам и другим клеточным структурам. Исследование АНА с помощью непрямой реакции иммунофлюоресценции на HEp-2 клетках (НРИФ-HEp-2) рекомендуется в качестве стандартного скринингового теста для диагностики СКВ. Применение автоматизированных систем интерпретации клеточных флуоресцентных тестов способствует стандартизации и улучшению воспроизводимости НРИФ. Разработана новая международная номенклатура типов ядерного, ядерного (нуклеолярного), цитоплазматического и митотического свечения АНА в НРИФ-HEp-2, включающая 28 вариантов анти-клеточных ("Anti-cell" – AC) паттернов. В практике клинико-диагностических лабораторий широкое распространение получили высокопроизводительные автоматизированные методы определения АНА на основе иммуноферментного анализа, иммуноблота, флуоресцентного, хемилюминесцентного и мультиплексного иммунного анализа. Новые моно- и мультиплексные методы твердофазного анализа целесообразно использовать как подтверждающие рефлекс-тесты для обнаружения разновидностей антиген-специфических АНА у больных СКВ с положительными результатами НРИФ-HEp-2. Идентификация профилей АНА с помощью мультиплексных технологий – важный инструмент для реализации персонализированного подхода к диагностике, оценке активности, прогноза, клинико-иммунологических субтипов и эффективности терапии СКВ. Обсуждается необходимость исследования АНА не только с целью подтверждения диагноза СКВ, но и для выявления заболевания на ранней и доклинической стадиях с намерением предотвратить развитие патологического процесса. Обнаружение моноспецифических антител к DFS70 позволяет исключить диагноз СКВ у лиц с положительными результатами определения АНА в НРИФ-HEp-2. Представлен современный алгоритм тестирования АНА при СКВ.

Ключевые слова: системная красная волчанка; антинуклеарные антитела; клиническое значение; моно- и мультиплексные методы иммунного анализа; скрининговые и подтверждающие тесты; антитела к DFS70; алгоритм тестирования антинуклеарных антител при СКВ.

Для цитирования: Александрова Е.Н., Новиков А.А., Верижникова Ж.Г., Лукина Г.В. Современный взгляд на проблемы исследования антинуклеарных антител при системной красной волчанке (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(6): 340-348. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-340-348>

Aleksandrova E.N.¹, Verizhnikova Zh.G.¹, Novikov A.A.¹, Lukina G.V.^{1,2}

MODERN LOOK AT THE PROBLEMS OF INVESTIGATION OF ANTI-NUCLEAR ANTIBODIES IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS (LITERATURE REVIEW)

¹A.S. Loginov Moscow Clinical Research and Practical Center, Moscow Healthcare Department, 111123, Moscow, Russia;

²V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, 115522, Moscow, Russia

In the review, topical aspects of the study of antinuclear antibodies (ANA) in systemic lupus erythematosus (SLE) are considered. ANA is the main serological marker of SLE. In the sera of patients with SLE, antibodies to DNA, histones, nucleosomes, extractable nuclear antigens (Sm, U1 ribonucleoprotein, Ro / SSA, La / SSB, ribosomal protein P), nucleolar antigens and other cellular structures are detected. The ANA study using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells (IIF-HEp-2) is recommended as a standard screening test for the diagnosis of SLE. The use of automated systems for the interpretation of cellular fluorescent tests contributes to the standardization and improvement of the reproducibility of the IIF. A new international nomenclature of types of nuclear, nucleolar (nucleolar), cytoplasmic and mitotic luminescence of ANA in IIF-HEp-2, including 28 variants of anti-cell ("Anti-cell" - AC) patterns was developed. In the practice of clinical diagnostic laboratories, high-performance automated methods for the determination of ANA based on ELISA, immunoblot, fluorescent, chemiluminescent and multiplex immunoassay are widely used. New mono- and multiplex methods of solid-phase analysis are expediently used as confirmatory reflex tests for the detection of varieties of antigen-specific ANA in patients with SLE with positive results of IIF-HEp-2. Identification of ANA profiles using multiplex technologies is a useful tool for implementing a personalized approach to diagnosis, evaluation of activity, prognosis, clinical and immunological subtypes, and the effectiveness of SLE therapy. The need for an ANA study not only to confirm the diagnosis of SLE, but also to identify the disease in the early and preclinical stages with the intention to prevent the development of the pathological process is discussed. Detection of monospecific anti-DFS70 antibodies allows to exclude the diagnosis of SLE in ANA IIF-HEp-2 positive subjects. Presented is a modern algorithm for testing ANA with SLE.

Key words: systemic lupus erythematosus; antinuclear antibodies; clinical significance; mono- and multiplex immunoassays; screening and confirmatory tests; anti-DFS70 antibodies; algorithm for testing antinuclear antibodies in SLE.

For citation: Aleksandrova E.N., Verizhnikova Zh.G., Novikov A.A., Lukina G.V. Modern look at the problems of investigation of anti-nuclear antibodies in systemic lupus erythematosus (literature review). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63(6): 340-348 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-340-348>

For correspondence: Aleksandrova E.N., Dr. Sci. Med., lead researcher of the laboratory for the diagnosis of autoimmune diseases of the ; e-mail: aleksandrovaen2015@yandex.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 05.02.2018
Accepted 13.02.2018

Системная красная волчанка (СКВ) – системное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся поликлональной активацией В-клеток и гиперпродукцией широкого спектра органонеспецифических аутоантител к различным компонентам клеточного ядра и цитоплазмы, вызывающих иммуновоспалительное повреждение тканей и внутренних органов [1]. Антиядерные антитела (АНА) являются основным серологическим маркером СКВ. В пробах сыворотки больных СКВ обнаруживаются антитела к ДНК, гистонам, нуклеосомам, экстрагируемому ядерным антигенам (ЭЯА) (Sm, U1 рибонуклеопротеину – РНП, Ro/SSA, La/SSB, рибосомальному белку Р - RibP), ядрышковым антигенам и другим клеточным структурам [2-6]. Положительные результаты определения АНА входят в число диагностических критериев СКВ [7]; применяются для оценки активности, прогноза и характеристики клинико-лабораторных субтипов заболевания [2, 4-6, 8-12]; служат предикторами развития СКВ на доклинической стадии (табл. 1) [13].

Для выявления АНА используют как моноплексные технологии (непрямая реакция иммунофлюоресценции – НРИФ, двойная иммунодиффузия – ДИД, контриммуноэлектрофорез – КИЭФ, радиоиммуноанализ – РИА, иммуноферментный анализ – ИФА, иммуноблот - ИБ, флюоресцентный иммунный анализ – ФИА, хемилуминесцентный иммунный анализ – ХЛИА), так и мультиплексные диагностические платформы [3, 14]. В последние годы при исследовании АНА широко применяются высокопроизводительные автоматизированные системы на основе ИФА, ФИА, ХЛИА, ИБ и мультиплексного иммунного анализа (МИА) (табл. 2) [3, 9, 14]. Сравнительная характеристика различных методов определения АНА, их преимущества и ограничения представлены в табл. 3. Актуальными проблемами диагностики СКВ являются стандартизация и гармонизация новых методов выявления АНА, включая оценку их диагности-

ческой значимости, разработку алгоритмов тестирования аутоантител, создание международных референтных материалов для калибровки и внешней оценки качества иммунологических тестов [9, 14].

Согласно рекомендациям ACR и EULAR, стандартным скрининговым методом определения АНА в сыворотке крови служит НРИФ с использованием в качестве субстрата клеток HEp-2 (эпителиальные клетки рака гортани человека – НРИФ-HEp-2) [3]. Применение стандартизованных клеток HEp-2 или варианта этой клеточной линии HEp-2000, имеющего большее количество митозов, позволяет существенно повысить чувствительность метода и достоверно описать различные типы свечения ядра. При тестировании АНА методом НРИФ их традиционно обозначают как антиядерный фактор (АНФ). Оценка результатов НРИФ проводится с указанием максимального конечного титра обнаружения АНФ в исследуемых сыворотках, а также интенсивности и типа флюоресценции. Нормальные титры АНФ в сыворотке крови при использовании НРИФ-HEp-2 составляют менее 1:160 [3, 4, 10]. Данные значения отражают оптимальное соотношение диагностической чувствительности (ДЧ) и диагностической специфичности (ДС) определения АНА с помощью НРИФ-HEp-2, позволяя идентифицировать 95% больных СКВ и 95% здоровых. Характер ядерного/цитоплазматического свечения при тестировании АНФ методом НРИФ-HEp-2 отражает присутствие разновидностей антигенспецифических АНА, ассоциирующихся с СКВ [3, 15]. Для стандартизации НРИФ-HEp-2 Международный консенсус по паттернам АНА (International consensus on ANA patterns – ICAP) разработал новую номенклатуру типов ядерного, ядрышкового (нуклеолярного), цитоплазматического и митотического свечения, включающую 28 вариантов антиклеточных (Anti-cell – AC) паттернов [15]. Типы свечения клеточных структур, регистрируемые в НРИФ-

Клиническое значение антинуклеарных антител при СКВ [2, 4–6, 8–12]

Антитела	Метод определения	Диагностическое и прогностическое значение*	Ассоциация с субтипами СКВ (частота обнаружения)	Ассоциация с другими заболеваниями
Антинуклеарные антитела (АНА)	НРИФ ИФА ИБ ФИА ХЛИА МИА	ДЧ 93–98%, ДС 49–78% Диагностический критерий СКВ	Волчаночный нефрит (100%) Лекарственная волчанка (50–100%) Дискоидная волчанка (35%)	ССД, СШ, ПМ/ДМ, СЗСТ, аутоиммунный гепатит, ЮХА, синдром Рейно, РА, заболевания щитовидной железы, злокачественные новообразования, хронические инфекции, фибромиалгия и др.
Антитела к двуспиральной ДНК (дсДНК)	ИФА НРИФ РИА (тест Farr) ИБ ФИА ХЛИА МИА	ДЧ 57%, ДС 97% Диагностический критерий СКВ Связь с активностью заболевания	Волчаночный нефрит (65–70%) Нейропсихические проявления (4–81%)	Вирусные инфекции (ВИЧ, парвовирус В19), миелома, аутоиммунный гепатит, РА
Антитела к гистонам	ИФА ИБ МИА	ДЧ 50–80%, ДС 86%	Лекарственная волчанка (50–100%) Волчаночный нефрит (37%)	РА, ССД, ПБЦ, болезнь Альцгеймера, деменция, инфекции
Антитела к нуклеосомам	ЛЕ-клеточный тест ИФА ИБ МИА	ДЧ 46–81%, ДС 95–100% Связь с активностью заболевания	Волчаночный нефрит (60–90%) Лекарственная волчанка (77%)	РА, ССД, СШ, СЗСТ, аутоиммунный гепатит
Антитела к Sm	ДИД КИЭФ ИФА ИБ ФИА ХЛИА МИА	ДЧ 10–30%, ДС 90–99% Диагностический критерий СКВ	–	СЗСТ Вирусная инфекция Эпштейна–Барр
Антитела к U1RNP	ДИД КИЭФ ИФА ИБ ФИА ХЛИА МИА	ДЧ 20–30% ДС низкая Предиктор неблагоприятного течения СКВ с развитием синдрома Рейно и тяжёлого поражения внутренних органов	СЗСТ/перекрестный синдром (100%)	ССД, СШ, ПМ, РА
Антитела к SSA/Ro (60/52 kDa)	ДИД КИЭФ ИФА ИБ ФИА ХЛИА МИА	ДЧ 22–50% ДС 99% Предиктор развития неонатальной волчанки и врождённой полной поперечной блокады сердца	Фотосенсибилизация, подострая кожная красная волчанка (70–80%) Неонатальная волчанка и полная поперечная блокада сердца (90%) Гематологические нарушения Волчаночный нефрит (31%)	СШ, ССД, ДМ, ПМ, РА, ПБЦ
Антитела к SSB/La	ДИД КИЭФ ИФА ИБ ФИА ХЛИА МИА	ДЧ 10–20% ДС 99% Предиктор развития неонатальной волчанки новорождённых и врождённой полной поперечной блокады сердца	Низкая частота развития волчаночного нефрита (14%) Неонатальная волчанка, полная поперечная блокада сердца (90%) Подострая кожная красная волчанка (30%)	СШ, ССД, ДМ, ПМ, РА, ПБЦ, аутоиммунный гепатит
Антитела к RibP	ИФА ИБ ФИА ХЛИА МИА	ДЧ 13–40% ДС высокая	Нейропсихические проявления (психозы, депрессия) (21%)	РА, злокачественные новообразования, заболевания печени
Антитела к PCNA	НРИФ ФИА ХЛИА МИА	ДЧ 5–10% ДС 95%	Артрит, гипокомплементемия	Хронический гепатит В и С
Антитела к Ku	ИБ ХЛИА МИА	ДЧ 5–20%	СКВ/ ПМ/ССД Перекрёстный синдром Миозит, артрит	ССД, ПМ, ДМ

Примечание. В табл. 1 оценка клинического значения аутоантител проводилась с учётом различных методов определения АНА. ССД – системная склеродермия, СШ – синдром Шегрена, ПМ/ДМ – полимиозит/дерматомиозит, СЗСТ – смешанное заболевание соединительной ткани, ЮХА – ювенильный хронический артрит, РА – ревматоидный артрит, ПБЦ – первичный билиарный цирроз.

Таблица 2

Высокопроизводительные технологии определения АНА в сыворотке крови

Антиген	ФИА	ХЛИА	ИФА	Линейный иммуноблот/дот-блот						МИА (суспензионные микро-чипы, технология xMAP)		
	EliA CTD Screen (Thermo Fisher, Германия)	QUANTA Flash CTD Screen Plus (INOVA Diagnostics, США)	Alegria ANA Detect (Orgen-tec, Германия)	ANA Profile (Euroimmun, Германия)	Im-mcoStripe ANA Advanced (IMMCO Diagnostics, США)	ANA-12 Pro (BLOT) (AESKU Diagnostics, Германия)	ANA Lia MAX (HUMAN Diagnostics, Германия)	Blue Diver Quatrix ANA (D-Tec, Бельгия)	recomLine ANA/ENA IgG (MIK-ROGEN, Германия)	FIDIS Connective 10 (The-radiag, Франция)	AtheNA Multi-Lyte Anti-Nuclear Antibodies (ANA) (ZEUS, США)	BioPlex 2200 ANA ALBIA (BIO-RAD, США)
U1PHП	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
U1PHП/Sm	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
SS-A/Ro60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ro52/ TRIM21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
SS-B/La	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Центромеры	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Scl-70/topo I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Jo-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rib P	+	+		+	+	+	+	+	+	+	-	+
PM/Scl	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
PCNA	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Sm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
дсДНК	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Нуклеосомы	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Гистоны	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
РНК-полимераза III	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ku	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Mi-2	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-

Примечание. + данная разновидность антител определяется указанным методом; - данная разновидность антител не может быть определена указанным методом.

HEp-2 при СКВ, представлены в табл. 4 [3, 15]. Появление автоматизированных систем интерпретации клеточных флюоресцентных тестов создаёт предпосылки для стандартизации и улучшения воспроизводимости НРИФ при определении АНА и других аутоантител у больных с системными аутоиммунными ревматическими заболеваниями (САРЗ) [16]. Среди коммерческих технологических платформ, осуществляющих анализ АНА путём автоматической визуализации и объективного распознавания образцов флюоресценции, одни аналитические системы дают возможность проводить только скрининг положительных и отрицательных результатов НРИФ-HEp-2 (Helios, Aesku Diagnostics, Германия; Image Navigator, Immuno Concept, США; Cytospot, Autoimmun Diagnostika, Германия), в то время как другие позволяют классифицировать основные типы свечения клеточных структур (AKLIDES, Medipan, Германия; NovaView, Inova, США; Zenit G-Sight, A. Menarini Diagnostics, Италия; Europattern, Euroimmun, Германия).

Скрининговое определение АНА методом НРИФ-HEp-2 обладает высокой чувствительностью (93%), но низкой специфичностью (57%) и предсказательной ценностью положительных результатов теста (3%) для диагностики СКВ [4, 10, 17]. Снижение пре- и посттестовой вероятности наличия СКВ у АНФ-положительных лиц связано с обнаружением АНА при многих патологических состояниях (САРЗ, ювенильный артрит, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, воспалительные заболевания кишечника, васкулиты, фибромиалгия, рассеянный склероз, заболевания щитовидной железы, хронические инфекции, злокачественные новообразования) на фоне увеличения количества исследований АНФ, назначаемых не ревматологами, а врачами других специальностей – терапевтами, дерматологами, нефрологами, онкологами, кардиологами, неврологами, гастро-

энтерологами, отоларингологами, офтальмологами, гематологами, гинекологами [17-19]. Согласно данным литературы, до 20% здоровых людей могут быть серопозитивными по АНА в НРИФ-HEp-2, что наиболее часто обусловлено наличием антител, индуцирующих плотное мелкокрапчатое свечение при взаимодействии с ядерным антигеном DFS70 (dense fine speckled), имеющим мол. массу 70 кДа [20, 21]. Анализ белковых последовательностей показал идентичность антигена DFS70 и транскрипционного коактиватора p75, называемого также фактором роста эпителия хрусталика (lens epithelium derived growth factor - LEDGF) [22]. DFS70 - уникальный паттерн (AC-2), который характеризуется гетерогенным мелкокрапчатым свечением нуклеоплазмы интерфазного ядра клетки и хроматина в зоне митоза. Использование субстрата (HEp-2 ELITE/DFS70-KO, Immco Diagnostic-Trinity Biotech, США), состоящего из смеси стандартных клеток HEp-2 и генно-инженерных клеток DFS70-KO HEp-2, не экспрессирующих антиген DFS70/LEDGF/p75, что препятствует связыванию антител к DFS с таргетным антигеном, позволяет чётко дифференцировать DFS от классических типов ядерного свечения [23]. Для подтверждения наличия антител к DFS70 в АНФ-положительных сыворотках применяются также методы ИФА, ХЛИА, ИБ и НРИФ-HEp-2 с селективной адсорбцией антител [20, 21, 23]. Среди здоровых людей частота обнаружения моноспецифических антител к DFS70 составляет в целом 2–22%, а у АНФ-положительных доноров варьирует от 24 до 54% [20, 21]. Отмечена негативная ассоциация моноспецифических антител к DFS70 с СКВ и другими САРЗ, при которых данные аутоантитела встречаются менее чем у 1% больных [21]. В рамках четырёхлетнего наблюдательного исследования не зарегистрировано ни одного случая САРЗ среди 40 здоровых лиц с перманентно высоким уровнем моноспецифических

Сравнительная характеристика методов определения АНА в сыворотке крови при СКВ

Метод	Преимущества	Недостатки
НРИФ-НЕР-2	Стандартный первичный скрининговый метод определения АНА. Наиболее высокая ДЧ при СКВ и др. САРЗ (выявление антител к 100–150 аутоантигенам клеточного ядра и цитоплазмы). Некоторые типы АНА (PCNA и др.) хорошо обнаруживаются методом НРИФ на клетках НЕР-2, что исключает необходимость их дальнейшего исследования с помощью подтверждающих тестов. Наличие автоматизированных систем визуализации и интерпретации результатов НРИФ - НЕР-2	Рутинная техника флюоресцентной микроскопии Субъективная оценка результатов теста. Необходимость интенсивного обучения для дифференцировки типов свечения. Отсутствие квалифицированной экспертной оценки. Полуколичественная оценка результатов свечения в титрах. Отсутствие стандартизации субстратов, реагентов, микроскопа. Фотообесцвечивание препаратов. Низкая чувствительность при определении антител к SS-A/Ro и RibP в сыворотке крови. Низкая специфичность для диагностики СКВ и др. САРЗ. Автоматизированные системы визуализации и распознавания клеточных флюоресцентных тестов Возможны различия в идентификации типов ядерного свечения
ИФА	Подтверждающий метод определения антигенспецифических АНА в сыворотке крови. Более высокая ДС для диагностики СКВ и др. САРЗ по сравнению с НРИФ-НЕР-2. Относительно высокий уровень аналитической чувствительности в сочетании со скоростью получения результатов. Количественная оценка результатов. Минимальное количество образца (5–10 мкл). Возможность тестировать одновременно большое количество образцов. Удобство в работе, простота проведения реакции. Возможность автоматизации всех этапов исследования. Объективность за счёт автоматизации учёта результатов. Относительно низкая стоимость диагностических наборов	В качестве первичного скринингового теста не может полностью заменить исследование АНА с помощью НРИФ-НЕР-2 из-за более низкой ДЧ, связанной с выявлением ограниченного спектра АНА (к смеси из 8–10 антигенов) по сравнению с НРИФ - НЕР-2. Изменение структуры и биохимических свойств ядерных антигенов при их синтезе и очистке. Блокировка одних антигенов, присутствующих в смеси, другими; перекрестное связывание АНА с различными мишенями. Выявление низкоаффинных аутоантител. Отсутствие стандартизации антигенных субстратов. Отсутствие наборов реагентов для определения редких АНА. Больше ложноотрицательных результатов выявления АНА по сравнению с НРИФ
ХЛИА, ФИА	Подтверждающие методы определения антиген-специфических АНА в сыворотке крови. Более высокая ДС для диагностики СКВ и др. САРЗ по сравнению с НРИФ-НЕР-2. Высокая аналитическая чувствительность. Высокая скорость получения результатов. Более точное количественное определение уровня антител в сыворотке крови по сравнению с ИФА за счёт расширения диапазона измеряемых концентраций аналитов. Стабильная калибровочная кривая. Минимальное количество образца (5–10 мкл). Возможность тестировать одновременно большое количество образцов. Удобство в работе, простота проведения реакции. Возможность автоматизации всех этапов исследования. Объективность за счёт автоматизации учёта результатов	В качестве первичных скрининговых тестов не могут полностью заменить исследование АНА с помощью НРИФ-НЕР-2 из-за более низкой ДЧ, связанной с выявлением ограниченного спектра АНА по сравнению с НРИФ - НЕР-2. Отсутствие стандартизации антигенных субстратов. Выявление низкоаффинных аутоантител. Отсутствие наборов реагентов для определения редких АНА. Больше ложноотрицательных результатов выявления АНА по сравнению с НРИФ
ИБ	Подтверждающий метод определения антигенспецифических АНА в сыворотке крови. Одновременное тестирование антигенспецифических АНА в сыворотке крови. Удобство в работе, простота проведения реакции. Возможность автоматизации отдельных этапов исследования	В качестве первичного скринингового теста не может полностью заменить исследование АНА с помощью НРИФ-НЕР-2 из-за более низкой ДЧ, связанной с выявлением ограниченного спектра АНА по сравнению с НРИФ - НЕР-2. Отсутствие наборов реагентов для определения редких АНА. Полуколичественная оценка результатов исследования. Низкая чувствительность и специфичность при определении антител к нелинейным эпитопам.
МИА	Подтверждающий метод определения антигенспецифических АНА в сыворотке крови. Одновременное тестирование множества антигенспецифических АНА в сыворотке крови. Максимум информации за минимум времени в минимальном количестве образца (50–100 мкл). Более высокая аналитическая чувствительность по сравнению с рутинными методами иммунного анализа. Количественная оценка результатов. Выявление индивидуальных профилей АНА, ассоциирующихся с особенностями заболевания или органного поражения. Повышение производительности исследования. Увеличение экономической эффективности (снижение стоимости анализа за счёт уменьшения трудовых затрат и затрат на реагенты). Улучшение внутри- и межлабораторной сопоставимости результатов	При использовании в качестве первичного скринингового теста не может полностью заменить исследование АНА с помощью НРИФ-НЕР-2 из-за более низкой ДЧ, связанной с выявлением ограниченного спектра АНА по сравнению с НРИФ - НЕР-2. Отсутствие наборов реагентов для определения редких АНА. Больше ложноотрицательных результатов выявления АНА по сравнению с НРИФ. Клиническая информативность недостаточно изучена

Таблица 4

Типы свечения внутриклеточных структур при определении АНА в сыворотках больных СКВ методом НРИФ-НЕР-2 и рекомендуемые рефлекс тесты [3, 15, 26]

Тип свечения	Аутоантигены	Рефлекс тесты
<i>Частые типы свечения</i>		
<i>Ядерное свечение</i>		
Гомогенное (АС-1)	Двуспиральная (дс) ДНК, гистоны, хроматин/нуклеосомы, HMG (high mobility group)	Исследование антител к дсДНК, экстрагируемым ядерным антигенам (ЭЯА) (Sm, U1RNP, Ro/SSA, La/SSB), гистонам, нуклеосомам
Крупное крапчатое (АС-5)	Sm, U1 – рибонуклеопротеин (РНП), ядерный матрикс	Исследование антител к ЭЯА, дсДНК
Мелкое крапчатое (АС-4)	SS-A/Ro, SS-B/La, многие ядерные антигены	Исследование антител к ЭЯА, дсДНК
<i>Цитоплазматическое свечение</i>		
Плотное мелко-крапчатое свечение (АС-19)	Рибосомальный белок Р (RibP)	Исследование антител к ЭЯА, включая RibP
<i>Редкие типы свечения</i>		
<i>Ядерное свечение</i>		
Точечное (1–6 точек) (АС-7)	p80-colin, SMN	Отсутствуют
Периферическое/краевое или оболочки ядра (АС-11)	Ламинины (А, В, С), комплексные антигены ядерной оболочки	Отсутствуют
Плейоморфное крапчатое клеточного цикла (PCNA) (АС-13)	Вспомогательный белок ядерного антигена клеточной пролиферации: фактор элонгации ДНК-полимеразы дельта	Исследование антител к PCNA
<i>Цитоплазматическое свечение</i>		
Дискретное крапчатое (АС-18)	Эндосома (ранний эндосомальный антиген -1), глицин-триптофан (GW)/процессирующие тельца, мультивезикулярные тельца/лизосомы	Отсутствуют
Комплекс Гольджи (АС-22)	Белки Гольджи/гольджины: гиантин, гольджин 245, гольджин 110, гольджин 97, гольджин 95 и др.	Отсутствуют

антител к DFS70 и отсутствием других аутоантител в сыворотке крови [24]. Выявление моноспецифических антител к DFS70 может рассматриваться в качестве потенциального лабораторного критерия для исключения диагноза СКВ и других САРЗ у АНФ-позитивных лиц [20-22].

По мнению большинства экспертов, полуколичественное измерение АНФ в титрах, рекомендованное в качестве скринингового теста для диагностики СКВ, не позволяет осуществлять мониторинг активности и прогнозирование обострений заболевания (за исключением гомогенного типа свечения, интенсивность которого четко ассоциируется с уровнем антител к двуспиральной (дс) ДНК в крови) [3, 4, 10]. В то же время высокие титры АНФ наряду с увеличением концентрации антител к дсДНК и снижением уровня С3, С4 в крови служат предикторами эффективного ответа на терапию белимумабом (моноклональными антителами, ингибирующими В-лимфоцитарный стимулятор BLyS) [25].

При двухэтапной стратегии иммунодиагностики СКВ пациентам с положительными результатами скринингового обнаружения АНА методом НРИФ-НЕР-2 рекомендуется проведение каскада подтверждающих («рефлекс») тестов для выявления специфических антител к отдельным ядерным антигенам (дсДНК, нуклеосомам, гистонам, ЭЯА – Sm, U1RNP, Ro/SSA, La/SSB, RibP) с помощью ИФА, ИБ, ХЛИА, МИА и других технологий (см. табл. 4) [3, 9, 14, 26]. Выбор спектра подтверждающих исследований АНА зависит от типа и титров ядерного/цитоплазматического свечения в НРИФ-НЕР-2, совокупности клинических факторов [3, 26]. Имеются данные о недостаточной чувствительности метода НРИФ-НЕР-2 при тестировании антител к SS-A/Ro60, Ro52/TRIM21, Rib P и Jo-1 [10]. В случае отрицательных результатов определения антител к SS-A/Ro и RibP в НРИФ-НЕР-2, но высокой вероятности наличия у больного СКВ следует использовать альтернативные методы идентификации антител к данным ЭЯА (ИФА, ИБ,

ХЛИА и др.) [3]. Современный алгоритм тестирования АНА для диагностики СКВ представлен на рисунке.

В практике клинко-диагностических лабораторий широкое распространение получили скрининговые методы определения АНА на основе ИФА, ХЛИА, ФИА, ИБ и мультиплексных биоаналитических технологий [3, 9, 14]. По мнению экспертов EULAR и ACR, новые методы твёрдофазного анализа не могут полностью заменить первичный скрининг АНА с помощью НРИФ-НЕР-2, так как идентифицируют антитела к ограниченному количеству антигенов с изменёнными либо утраченными эпитопами, что приводит к увеличению числа ложноотрицательных результатов до 35% (см. табл. 3) [10, 27]. Данные литературы, касающиеся сравнительного изучения клинической информативности различных скрининговых методов выявления АНА при СКВ, немногочисленны и весьма противоречивы, что обусловлено различиями в тест-системах, значениях «cutoff» и подборе групп больных (табл. 5) [14, 28–37]. Как следует из табл. 5, ДЧ ИФА(75,2%) [28–30, 35], ФИА (74,0%) [36], ХЛИА (80,6%) [37] и суспензионных мультиплексных технологий (74%) [14, 28–33, 35] при скрининговом выявлении АНА ниже, чем у НРИФ-НЕР-2 (90,7%) [14, 31–33, 35–37]. Высокая ДЧ новой мультиплексной системы CytoBeadANA на платформе AKLIDES объясняется размещением микросфер, кодированных флюорофорами и покрытых различными ядерными антигенами, в одной пробе с клетками НЕР-2, что позволяет совместить скрининг и дифференцировку АНА в сыворотках больных СКВ [34]. Общая ДС различных скрининговых методов определения АНА при СКВ имеет невысокие значения (64,5%) [14, 28, 31, 32, 34–37]. Показано, что исследование АНА с помощью НРИФ-НЕР-2 обладает наибольшей информативностью для исключения диагноза СКВ по уровню отношения правдоподобия отрицательных результатов (ОПОР) теста (< 0,2). Результаты, касающиеся сравнительной оценки рангов отношения правдо-

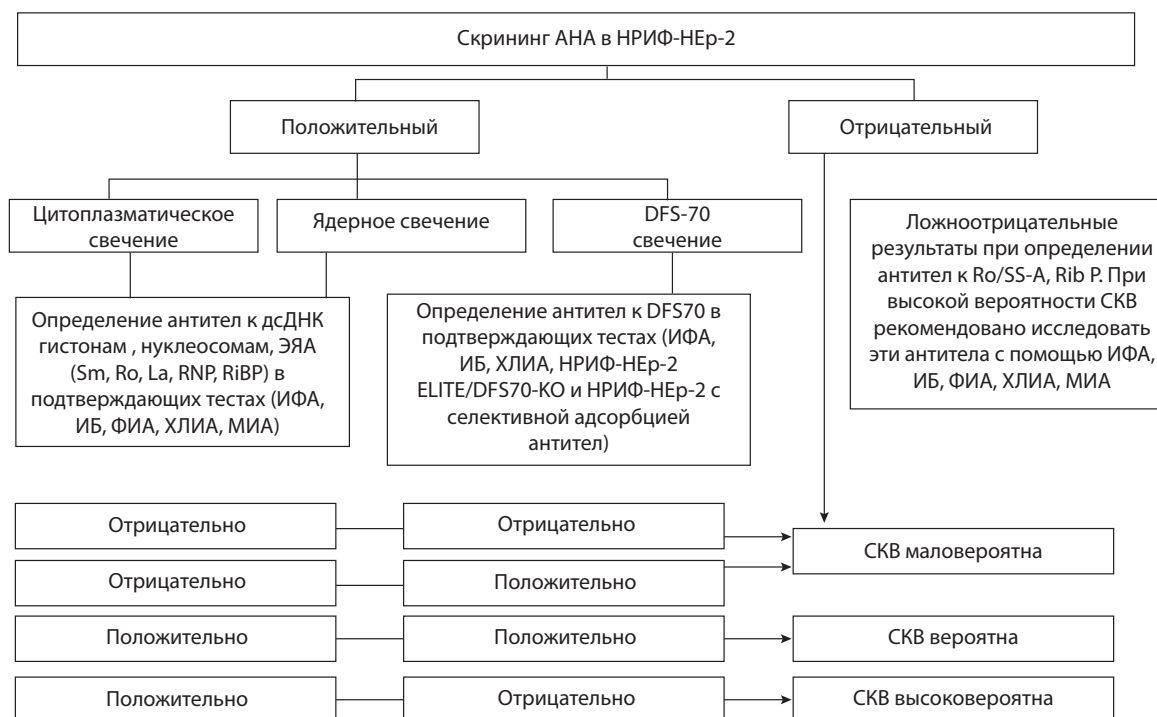
Таблица 5

Диагностическое значение скрининговых методов определения АНА в сыворотках больных СКВ

Автор, год	n	Метод	ДЧ, %	ДС, %				ОП	
				САРЗ	РЗ	ЗД	Общая	ПР	ОР
Shovman O. и соавт., 2005 [28]	113	ИФА	93,0	18,3	71,0	93,0	60,8	2,37	0,12
		МИА (AthenaMultiLyte)	91,0	17,0	73,0	94,0	61,3	2,35	0,15
Moder K. и соавт., 2007 [29]	332	ИФА	81,4	20,6	-	-	-	1,03	0,89
		МИА (BioPlex 2200)	66,3	37,1	-	-	-	1,05	0,91
Hanly J. и соавт., 2010 [30]	192	НРИФ-НЕр-2 (>1:160)	81,3	-	-	-	-	-	-
		ИФА	46,6	-	-	-	-	-	-
		МИА (BioPlex 2200)	75,5	-	-	-	-	-	-
Bonilla E., 2007 [31]	35	НРИФ-НЕр-2 (>1:50)	90,6	-	-	-	76,0	3,78	0,12
		МИА (AthenaMultiLyte)	49,1	-	-	-	87,0	3,78	0,59
Op de Beeck K. и соавт., 2012 [32]	80	НРИФ-НЕр-2000 (>1:80)	90,0	28,8	-	94,0	61,4	2,33	0,16
		МИА (BioPlex 2200)	79,0	25,7	-	94,6	60,2	1,98	0,35
Bruner B. и соавт., 2012 [33]	1540	НРИФ-НЕр-2 (>1:120)	85,6	-	-	81,7	-	4,67	0,18
		МИА (BioPlex 2200)	67,4	-	-	90,5	-	7,10	0,36
Tozzoli R. и соавт., 2013 [14]	95	НРИФ-НЕр-2 (>1:80)	89,5	38,4	-	95,0	66,7	2,69	0,16
		МИА BioPlex 2200	81,1	29,5	-	94,2	61,9	2,13	0,31
Scholz J. и соавт., 2015 [34]	174	НРИФ-НЕр-2 AKLIDES (>1:80)	98,9	8,4	-	83,2	45,8	1,82	0,02
		МИА (CytoBeadANA)	100	2,5	-	80,2	41,4	1,71	∞
Верижникова Ж.Г. и соавт., 2017 [35]	94	НРИФ-НЕр-2 (>1:160)	96,8	10,0	35,0	93,3	40,0	1,61	0,08
		ИФА (Alegria)	79,8	42,0	100,0	96,7	70,0	2,66	0,29
		МИА (BioPlex 2200)	82,9	34,0	80,0	80,0	57,0	1,93	0,30
Bossuyt X., Fieuws S., 2013 [36]	80	НРИФ-НЕр-2 (>1:160)	90,0	-	89,0	94,0	90,7	9,9	0,11
		ФИА (EliA CTD Screen)	74,0	-	96,5	97,0	96,7	23,9	0,27
Bentow C. и соавт., 2015 [37]	98	НРИФ-НЕр-2 (>1:80)	93,9	34,6	-	67,1	50,9	1,91	0,12
		ХЛИА (QUANTA Flash CTD Screen Plus)	80,6	40,3	-	95,9	68,1	2,53	0,28

подобия положительных результатов (ОППР) скринингового исследования АНА на основе ИФА, ФИА, ХЛИА и МИА, не позволяют сделать однозначные выводы о диагностическом значении этих тестов при СКВ. Преимущества и ограничения ИФА, ФИА, ХЛИА и МИА по сравнению с «классическим»

скрининговым методом определения АНА при СКВ на основе НРИФ-НЕр-2 нуждаются в дальнейшем изучении. В рекомендациях EULAR и ACR подчеркивается, что лаборатории, проводящие скрининговое определение АНА с использованием альтернативных методов твердофазного анализа (ИФА, ИБ,



Новый алгоритм тестирования антинуклеарных антител при СКВ [21 в модификации].

ФИА, ХЛИА, МИА) должны предоставить данные о такой же или более высокой чувствительности и специфичности этих техник по сравнению с НРИФ-НЕР-2. Международными рекомендациями 2013 г. допускается применение новых иммунологических методов для скрининга АНА при условии обязательного проведения их повторного исследования с помощью НРИФ-НЕР-2 в случае расхождении результатов измерения АНА с клиническими данными [3]. В работе X. Bossuyt и S. Fieuws [36] отмечено, что наиболее эффективной стратегией скринингового определения АНА в сыворотках больных СКВ является комбинация двух тестов: НРИФ-НЕР-2 и ФИА (EliACTDScreen, ThermoFisher, Германия) (AUC – площадь под ROC-кривой – 0,957 vs 0,894 и 0,853 при использовании только НРИФ или ФИА, $p < 0,0001$).

Перспективным направлением в диагностике СКВ и других САРЗ служит МИА аутоантител [10, 14, 27, 38]. В отличие от моноплексных методов иммунодиагностики, мультиплексные технологии позволяют одновременно определять до 100 различных биомаркеров и более в небольшом объёме биологической жидкости (50 мкл), что наряду с резким увеличением производительности и экономической эффективности исследования значительно улучшает внутри- и межлабораторную сопоставимость полученных результатов (см. табл. 3). Для выявления профилей АНА в сыворотках больных разработаны коммерческие тест-системы на основе планарных и суспензионных микрочипов [10, 27, 38]. Планарные микрочипы характеризуются упорядоченным расположением ядерных аутоантигенов (захватывающих лигандов) на двухмерной твердой подложке (поверхности стекла, лунок полистироловых микроплат, нитроцеллюлозной мембраны) в виде микропятен или линейного блота и детекцией связавшихся антител методами флуоресценции, люминесценции, масс-спектрометрии, колориметрии. В клинико-диагностических лабораториях для идентификации профилей АНА чаще применяется суспензионная микрочиповая технология xMAP (Luminex, Austin, США) с использованием в качестве твердой фазы набора полистироловых микросфер, содержащих внутри разные сочетания красных и инфракрасных флуорофоров и покрытых снаружи различными ядерными антигенами. После захвата соответствующих антиген-специфических АНА из образцов сывороток интенсивность флуоресценции измеряют с помощью проточного цитофлуориметра (Luminex или Bio-Plex 2200): одним лазером (630 нм) идентифицируют тип микросферы с адсорбированным на её поверхности антигеном, а другим (532 нм) – количество связавшихся аутоантител, соединённых с флуоресцентными репортерами (вторичными антителами). В системе Ultrplex используются микросферы с нанобаркодами [10, 38]. Профилирование АНА посредством мультиплексных технологий обладает высокой аналитической чувствительностью и возможностью определения широкого спектра аутоантител к новым ядерным/цитоплазматическим антигенам, что создаёт предпосылки для обнаружения АНА у ранее «серонегативных» больных СКВ [10, 14, 27, 38]. Мультиплексные диагностические системы позволяют уточнить кластеры АНА, ассоциированные с клинико-лабораторными субтипами СКВ, активностью заболевания, особенностями органного поражения, эффективностью терапии, а также способствуют расширению представлений о патогенетическом и предиктивном значении АНА при СКВ [39, 40]. С помощью МИА установлено, что совокупность АНА у больных неполным волчаночным синдромом отличается от таковой при достоверной СКВ преобладанием аутоантител класса IgM [41]. В группах больных активной формой СКВ и неполным волчаночным синдромом с риском прогрессирования заболевания регистрировался высокий уровень экспрессии генов, индуцируемых интерфероном I типа (type I IFN gen signature), который коррелировал с увеличением концентрации антител

IgG к дсДНК, нуклеосомам, U1 РНП, Ro/SSA, La/SSB, Scl-70, в то время как низкий уровень экспрессии данных генов сопровождался продукцией менее патогенных АНА класса IgM [42]. Недавно были разработаны биочипы, содержащие около 200 аутоантигенов и олигонуклеотидов, предназначенные для идентификации специфического профиля антител, исключающего диагноз СКВ (чувствительность 94%, специфичность 75%, предсказательная ценность отрицательных результатов 93%) [43]. Однако в целом клиническая информативность МИА АНА в сыворотках больных СКВ менее изучена по сравнению со стандартными методами исследования данных антител.

Как известно, АНА прямо или через формирование иммунных комплексов с ядерными антигенами, образующимися в процессе некроза, апоптоза и некроза клеток, индуцируют персистирующую стимуляцию мембранных рецепторов (Toll-подобных рецепторов – TLR, FcγRIIa) плазмоцитоидных дендритных клеток, моноцитов/макрофагов, нейтрофилов, Т- и В-лимфоцитов, усиливают продукцию интерферона альфа, факторов активации В-клеток BAFF/BLyS и других цитокинов, активируют систему комплемента, а также механизмы комплементзависимой и антителозависимой клеточной цитотоксичности, что приводит к воспалению и деструкции тканей организма [44, 45]. Учитывая важную роль АНА в патогенезе СКВ, большинство исследователей ставят под сомнение существование серонегативной по антиядерным антителам формы данного заболевания. Отрицательные результаты определения АНА, регистрирующиеся у 5–20% больных СКВ, связывают с недостаточной чувствительностью лабораторных тестов [46]. В таких случаях рекомендуется повторное тестирование АНА с применением нескольких методов иммунного анализа (НРИФ-НЕР-2, ИФА, ИБ, ФИА, ХЛИА и МИА).

Диагностическая значимость тестирования АНА входит в число наиболее обсуждаемых ревматологами и терапевтами вопросов. В настоящее время активно обсуждается необходимость исследования АНА в скрининговых и «каскадных» тестах не только с целью подтверждения диагноза СКВ («намерение лечить»), но и для выявления случаев заболевания на ранней (возможно, доклинической) стадии («намерение предотвратить» развитие патологического процесса) [19, 38]. Исследование АНА на доклинической и ранней стадии СКВ, характеризующейся нечётко выраженными клиническими признаками и «обратимыми» нарушениями аутоиммунитета, способствует предупреждению заболевания за счёт модификации факторов риска (защита от УФ-облучения, приём витамина D и др.) и позволяет своевременно начать адекватную противовоспалительную и иммуносупрессивную терапию в дебюте болезни, что увеличивает вероятность достижения ремиссии и снижает риск прогрессирующего деструктивного поражения органов и тканей.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–11, 13–34, 36–46 см. REFERENCES)

1. Соловьев С.К., Клюквина Н.Г. Системная красная волчанка. В кн.: Насонов Е.Л., ред. *Ревматология: Клинические рекомендации*. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010: 429–81.
2. Александрова Е.Н., Новиков А.А., Насонов Е.Л. Лабораторная диагностика ревматических заболеваний. В кн.: Насонов Е.Л., ред. *Российские клинические рекомендации. Ревматология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017: 300–18.
12. Клюквина Н.Г. Клиническое значение лабораторных нарушений при системной красной волчанке. *Современная ревматология*. 2014;8(2):41–7.
35. Верижникова Ж.Г., Александрова Е.Н., Новиков А.А., Панафидина Т.А., Середавкина Н.В., Попкова Т.В., Айзина Н.Л., Насонов Е.Л.

Клиническая информативность о методах скринингового определения антинуклеарных антител с использованием непрямой реакции иммунофлюоресценции, иммуноферментного анализа и мультитеплексной технологии ХМАР при системной красной волчанке. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(3):173-7.

REFERENCES

- Solov'ev S.K., Klyukvina N.G. Systemic lupus erythematosus. In: Nasonov E.L., ed. *Rheumatology: Clinical Guidelines [Revmatologiya: Klinicheskie Rekomendatsii]*. 2nd ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2010: 429-81. (in Russian)
- Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Nasonov E.L. Laboratory diagnosis of rheumatic diseases. In: Nasonov E.L., ed. *Russian Clinical Guidelines. Rheumatology. [Rossiyskie klinicheskie rekomendatsii. Revmatologiya.]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2017: 300-18. (in Russian)
- Agmon-Levin N., Damoiseaux J., Kallenberg C., Sack U., Witte T., Herold M. et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73 (1): 17-23.
- Solomon D.H., Kavanaugh A.J., Schur P.H. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum.* 2002; 47 (4): 434-44.
- Kavanaugh A.F., Solomon D.H. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. *Arthritis Rheum.* 2002; 47: 546-55.
- Kavanaugh A., Tomar R., Reveille J., Solomon D.H., Homburger H.A. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000; 124 (1): 71-81.
- Petri M., Orbai A.M., Alarcón G.S., Gordon C., Merrill J.T., Fortin P.R. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012; 64 (8): 2677-86.
- Tozzoli R., Bizzaro N., Tonutti E., Villalta D., Bassetti D., Manoni F. et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002; 117: 316-24.
- Meroni P.L., Biggoggero M., Pierangeli S.S., Sheldon J., Zegers I., Borghi M.O. Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2014; 10(1): 35-43.
- Mahler M., Meroni P.L., Bossuyt X., Fritzler M.J. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *J. Immunol. Res.* 2014; 2014: 315179.
- Cozzani E., Drosara M., Gasparini G., Parodi A. Serology of lupus erythematosus: correlation between immunopathological features and clinical aspects. *Autoimmune Dis.* 2014; 2014: 321359.
- Klyukvina N.G. Clinical significance of laboratory errors in patients with systemic lupus erythematosus. *Sovremennaya revmatologiya*. 2014; 8(2): 41-7. (in Russian)
- Bizzaro N., Tozzoli R., Shoenfeld Y. Are we at a stage to predict autoimmune rheumatic diseases? *Arthr. Rheum.* 2007; 56:1736-44.
- Tozzoli R., Bonaguri C., Melegari A., Antico A., Bassetti D., Bizzaro N. Current state of diagnostic technologies in the autoimmunology laboratory. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013; 51:129-38.
- Chan E.K., Damoiseaux J., Carballo O.G., Conrad K., de Melo Cruvinel W., Francescantonio P.L. et al. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014-2015. *Front Immunol.* 2015; 6: 412.
- Willitzki A., Hiemann R., Peters V., Sack U., Schierack P., Rödiger S. et al. New platform technology for comprehensive serological diagnostics of autoimmune diseases. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012: 284740.
- Abeles A.M., Abeles M. The clinical utility of a positive antinuclear antibody test result. *Am. J. Med.* 2013; 126(4): 342-8.
- Fitch-Rogalsky C., Steber W., Mahler M., Lupton T., Martin L., Barr S.G. et al. Clinical and serological features of patients referred through a rheumatology triage system because of positive antinuclear antibodies. *PLoS One*. 2014; 9(4): e93812.
- Fritzler M.J. Choosing wisely: Review and commentary on anti-nuclear antibody (ANA) testing. *Autoimmun. Rev.* 2016; 15 (3): 272-80.
- Mahler M., Fritzler M.J. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on HEp-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012: 494356.
- Conrad K., Röber N., Andrade L.E., Mahler M. The clinical relevance of anti-DFS70 autoantibodies. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2017; 52(2): 202-16.
- Ochs R.L., Mahler M., Basu A., Rios-Colon L., Sanchez T.W., Andrade L.E. et al. The significance of autoantibodies to DFS70/LEDGFp75 in health and disease: integrating basic science with clinical understanding. *Clin. Exp. Med.* 2016; 16(3): 273-93.
- Malyavantham K., Suresh L. Analysis of DFS70 pattern and impact on ANA screening using a novel HEp-2 ELITE/DFS70 knockout substrate. *Auto Immun. Highlights*. 2017 Dec; 8(1):3.
- Mariz H.A., Sato E.I., Barbosa S.H., Rodrigues S.H., Dellavance A., Andrade L.E. et al. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(1):191-200.
- van Vollenhoven R.F., Petri M.A., Cervera R., Roth D.A., Ji B.N., Kleoudis C.S. et al. Belimumab in the treatment of systemic lupus erythematosus: high disease activity predictors of response. *Ann. Rheum. Dis.* 2012; 71:1343-9.
- Tonutti E., Bizzaro N., Morozzi G., Radice A., Cinquanta L., Villalta D. et al. Study Group on Autoimmune Diseases of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine. The ANA-reflex test as a model for improving clinical appropriateness in autoimmune diagnostics. *Auto Immun. Highlights*. 2016 D; 7(1): 9.
- Satoh M., Tanaka S., Chan E.K.L. The uses and misuses of multiplex autoantibody assays in systemic autoimmune rheumatic diseases. *Front. Immunol.* 2015; 6:181.
- Shovman O., Gilburd B., Zandman-Goddard G., Yehiely A., Langevitz P., Shoenfeld Y. Multiplexed AtheNA multi-lyte immunoassay for ANA screening in autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 2005; 38 (1): 105-9.
- Moder K.G., Wener M.H., Weisman M.H., Ishimori M.L., Wallace D.J., Buckeridge D.L. et al. Measurement of antinuclear antibodies by multiplex immunoassay: a prospective, multicenter clinical evaluation. *J. Rheumatol.* 2007; 34 (5): 978-86.
- Hanly J.G., Thompson K., McCurdy G., Fougere L., Theriault C., Wilton K. Measurement of autoantibodies using multiplex methodology in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Methods*. 2010; 352 (1-2): 147-52.
- Bonilla E., Francis L., Allam F., Ogrinc M., Neupane H., Phillips P.E. et al. Immunofluorescence microscopy is superior to fluorescent beads for detection of antinuclear antibody reactivity in systemic lupus erythematosus patients. *Clin. Immunol.* 2007; 124 (1): 18-21.
- Op De Beeck K., Vermeersch P., Verschuerec P., Westhoven R., Marien G., Blockmans D. et al. Antinuclear antibody detection by automated multiplex immunoassay in untreated patients at the time of diagnosis. *Autoimmun. Rev.* 2012; 12 (2): 137-43.
- Bruner B.F., Guthridge J.M., Lu R., Vidal G., Kelly J.A., Robertson J.M. et al. Comparison of autoantibody specificities between traditional and bead-based assays in a large, diverse collection of patients with systemic lupus erythematosus and family members. *Arthritis Rheum.* 2012; 64 (11): 3677-86.
- Scholz J., Grossmann K., Knütter I., Hiemann R., Sowa M., Röber N. et al. Second generation analysis of antinuclear antibody (ANA) by combination of screening and confirmatory testing. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015; 53 (12): 1991-2002.
- Verzhnikova Zh.G., Aleksandrova E.N., Novikov A.A., Panafidina T.A., Seredavkina N.V., Popkova T.V. et al. Comparison of indirect immunofluorescence on HEp-2 cells, enzyme-linked immunosorbent assay and multiplex bead-based immunoassay for detection of antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(3):173-7. (in Russian)
- Bossuyt X., Fieus S. detection of antinuclear antibodies: added value of solid phase assay? *Ann. Rheum. Dis.* 2013; 73: e10.
- Bentow C., Lakos G., Rosenblum R., Bryant C., Seaman A., Mahler M. Clinical performance evaluation of a novel, automated chemiluminescent immunoassay, QUANTA Flash CTD Screen Plus. *Immunol. Res.* 2015; 61(1-2):110-6.
- Olsen N.J., Choi M.Y., Fritzler M.J. Emerging technologies in autoantibody testing for rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* 2017; 19(1):172.
- Zhu H., Luo H., Yan M., Zuo X., Li Q.Z. Autoantigen microarray for high-throughput autoantibody profiling in Systemic Lupus Erythematosus. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015; 13(4):210-8.
- Wang L., Mohan C., Li Q.Z. Arraying autoantibodies in SLE - Lessons Learned. *Curr. Mol. Med.* 2015; 15(5):456-61.
- Li Q.Z., Zhou J., Wandstrat A.E., Carr-Johnson F., Branch V., Karp D.R. et al. Protein array autoantibody profiles for insights into systemic lupus erythematosus and incomplete lupus syndromes. *Clin. Exp. Immunol.* 2007; 147(1): 60-70.
- Li Q.Z., Zhou J., Lian Y., Zhang B., Branch V.K., Carr-Johnson F. et al. Interferon signature gene expression is correlated with autoantibody profiles in patients with incomplete lupus syndromes. *Clin. Exp. Immunol.* 2010; 159(3): 281-91.
- Putterman C., Wu A., Reiner-Benaim A., Batty D.S. Jr., Sanz I., Oates J. et al. SLE-key® rule-out serologic test for excluding the diagnosis of systemic lupus erythematosus: Developing the ImmunoArrayiCHIP®. *J. Immunol. Methods*. 2016; 429:1-6.
- Dorner T. Deciphering the role of NETs and networks in SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2012; 8: 68-70.
- Liu C.C., Kao A.H., Manzi S., Ahearn J.M. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. *Ther. Adv. Musculoskeletal Dis.* 2013; 5: 210-33.
- Pisetsky D.S. Antinuclear antibody testing - misunderstood or misbegotten? *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017; 13(8): 495-502.

Поступила 05.02.18

Принята к печати 13.02.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.155.3.92:06:616.31-018.73]:577.2.083

Селезнева И.А., Свечникова М.В., Гильмияров Э.М., Гусякова О.А., Гильмиярова Ф.Н., Кузнецова О.Ю.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЁРЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕЙКОЗАМИ

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия

Выделены критерии ранних проявлений поражения слизистой оболочки полости рта у пациентов с острыми и хроническими лейкозами: при отсутствии жалоб и изменений индексной оценки состояния полости рта блок первоначальных стоматологических признаков в виде отёчности языка и сглаженности его сосочков, бледности слизистой оболочки полости рта. В ротовой жидкости пациентов с первоначальными признаками стоматологических изменений при острых лейкозах установлен специфический спектр нарушений в виде наименьшего содержания антител иммуноглобулинов класса А к трансклутаминазе в сочетании с высоким количеством IgG-антител к трансклутаминазе – $8,73 \pm 0,92$ Ед/мл, максимальный уровень которых превышает референтный предел практически в 4 раза ($38,80$ Ед/мл), что свидетельствует о происходящих структурных изменениях в соединительной ткани полости рта. Под влиянием химиотерапии у данных пациентов происходит инверсия клинических проявлений стоматологических нарушений: формируется стоматит II (средней) степени тяжести, минуя I степень, сопровождающийся приростом в 4 раза в ротовой жидкости пациентов с острыми лейкозами содержания IgA-антител к трансклутаминазе ($4,03 \pm 0,77$ Ед/мл; $p < 0,05$) и в 2,5 раза при хронических лейкозах ($3,24 \pm 0,47$ Ед/мл; $p < 0,05$) по сравнению с показателями до начала лечения. В связи с этим рекомендуется определять содержание в ротовой жидкости антител к трансклутаминазе у пациентов с лейкозами для верификации степени воспалительно-деструктивного процесса и своевременного его устранения. Особенностью иммунологических сдвигов при стоматите I степени тяжести является наиболее высокое значение IgG-антител к трансклутаминазе ($9,98 \pm 1,50$ Ед/мл) в ротовой жидкости, а при II–III степени молекулярные проявления повреждения более сглажены, что свидетельствует о депрессии иммунных процессов.

Ключевые слова: острые и хронические лейкозы; стоматит; IgA-антитела к трансклутаминазе и глиадину; IgG-антитела к трансклутаминазе и глиадину; ротовая жидкость.

Для цитирования: Селезнева И.А., Свечникова М.В., Гильмияров Э.М., Гусякова О.А., Гильмиярова Ф.Н., Кузнецова О.Ю. Молекулярные маркеры повреждений слизистой оболочки полости рта у пациентов с лейкозами. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (6): 349-352. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-349-352>

Selezneva I.A., Svechnikova M.V., Gilmiyarov E.M., Gusiakova O.A., Gilmiyarova F.N., Kuznetsova O.Yu.

MOLECULAR MARKERS OF THE ORAL MUCOSA DAMAGE IN PATIENTS WITH LEUKEMIA

Samara State Medical University, 443099, Samara, Russia

The criteria for early manifestations of mucosal lesions in patients with acute and chronic leukemia are distinguished: in the absence of complaints and changes in the index assessment of the oral cavity, a block of initial dental signs in the form of edema of the tongue and the smoothness of its papillae, pallor of the oral mucosa in patients with leukemia. In the oral fluid of patients with the initial signs of dental pathology in acute leukemia, a specific spectrum of disorders was established in the form of the lowest antibody level of immunoglobulin A class to transglutaminase in combination with a high amount of Ig G antibodies to transglutaminase - 8.73 ± 0.92 U / ml, which maximal level exceeds the reference limits by almost 4 times (38.80 U / ml) – that indicates structural changes in the connective tissues of the oral cavity. Under the influence of chemotherapy in these patients, the inversion of clinical manifestations of dental pathology was noted: stomatitis II (medium) severity is formed, bypassing I degree, accompanied by a 4-fold increase of IgA antibodies to transglutaminase (4.03 ± 0.77 U / ml, $p < 0.05$) in the oral fluid of patients with acute leukemia and 2.5 times for chronic leukemias (3.24 ± 0.47 U / ml, $p < 0.05$) compared to pre-treatment period. In this regard, it is recommended to determine the content in the oral fluid for antibodies to transglutaminase in patients with leukemia for verification of the degree of inflammatory-destructive process and its recovery. The peculiarity of immunological shifts in stomatitis of the 1st degree of severity is the highest level of IgG antibodies to transglutaminase (9.98 ± 1.50 U / ml) in the oral fluid, and at II-III degree the molecular manifestations of damage are smoother, which indicates the depression of immune processes.

Key words: acute and chronic leukemia; stomatitis, IgA antibodies to transglutaminase and gliadin; IgG antibodies to transglutaminase and gliadin; oral fluid.

For citation: Selezneva I.A., Svechnikova M.V., Gilmiyarov E.M., Gusiakova O.A., Gilmiyarova F.N., Kuznetsova O.Yu. Molecular markers of the oral mucosa damage in patients with leukemia. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (6): 349-352 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-349-352>

For correspondence: Selezneva I.A., PhD, associate professor of the chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics; e-mail: bio-sam@yandex.ru

Information about authors:

Selezneva I.A., <https://orcid.org/000-0001-6647-5330>

Gilmiyarov E.M. <https://orcid.org/0000-0003-4761-4379>

Gusiakova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5619-4583>

Gilmiyarova F.N., <http://orcid.org/0000-0001-5992-3609>

Kuznetsova O.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-3509-5965>

Для корреспонденции: Селезнева Инна Александровна, доц. каф. фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой; e-mail: bio-sam@yandex.ru

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 30.01.2018
Accepted 06.02.2018

Введение. В настоящее время наблюдается значительный рост частоты таких онкогематологических заболеваний, как острые и хронические лейкозы, занимающих 4–5-е место среди причин смертности от злокачественных новообразований. Доминирующим ключом успешной и своевременной их диагностики, как и многих других заболеваний внутренних органов, может стать изучение ранних симптомов-маркёров сочетанных поражений [1, 2]. Общность происхождения кроветворной ткани и тканей ротовой полости объясняет частое возникновение стоматитов на фоне снижения иммунологической реактивности организма [3–5], являющихся одной из причин недостаточной безопасности используемой программной цитостатической терапии. Применяемые при этом препараты в высоких концентрациях обладают выраженными токсическими свойствами, негативно влияя на качество жизни пациентов с лейкозами. Чрезвычайно чувствительна к их разрушающему действию именно слизистая оболочка полости рта [6–8], которая может служить фактически индикатором и мерой повреждающего действия химиотерапии [9, 10]. В связи с этим актуально изучение состояния слизистой оболочки полости рта у пациентов с лейкозами с помощью таких показателей, которые, во-первых, фундаментально отражают на молекулярном уровне спектр клинических изменений и, во-вторых, находятся в среде, наиболее доступной и достаточно легко получаемой в результате несложных диагностических процедур. Подобным критериям отвечает ротовая жидкость, а к числу «молекулярных рецепторов» состояния слизистой полости рта можно отнести, во-первых, транслугтаминазу – полифункциональный тканевой фермент [11–13], показатель формирования фибронектинколлагеновых трёхмерных структур на ранних стадиях образования коллагена, и, во-вторых, белок глиадин, состоящий на 60% из аминокислоты глутамина, которая подвергается дезаминированию под действием транслугтаминазы.

Цель работы – выяснить характер поражений слизистой оболочки полости рта у пациентов с острыми и хроническими лейкозами путём определения специфических показателей – антител к транслугтаминазе и глиадину иммуноглобулинов (Ig) классов А и G в ротовой жидкости до и после проведения химиотерапевтического лечения.

Материал и методы. Исследования проводились на кафедрах фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой, терапевтической стоматологии и госпитальной терапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. С 2009 по 2014 г. проведено обследование 125 пациентов, разделённых на три группы: 1-я – 45 больных гематологического отделения с острым лейкозом (45% мужчин, 55% женщин), средний возраст $45 \pm 0,5$ года, 31 пациент с острым миелобластным лейкозом (M1 и M2 по FAB-классификации) и 14 больных с острым лимфобластным лейкозом (пре-пре В (Common)); 2-я группа – 45 пациентов с хроническим лейкозом (47% мужчин, 53% женщин), средний возраст в данной группе $62 \pm 0,3$ года, 15 больных хроническим миелолейкозом (Ph- позитивным или bcr-abl–позитивным) и 30 больных хроническим лимфолейкозом (В-клеточным); 3-я группа – 35 практически здоровых лиц, из которых мужчины составили 36%, женщины – 64%, средний возраст $45 \pm 1,06$ года. Диагноз лейкоза верифицирован морфологически при микроскопическом исследовании пунктата костного мозга (микроскоп «Zeiss»), иммунологически методом проточной лазерной ци-

тофлуориметрии (проточный цитометр «FacsCalibur», Becton Dickinson) и генотипически.

Все больные с острым лейкозом были обследованы до начала химиотерапии и после её проведения в периоде постцитостатического агранулоцитоза. Пациенты с хроническим лейкозом были обследованы до начала лечения и в фазу ремиссии. Все больные острым миелобластным лейкозом получали унифицированный протокол лечения для лиц в возрасте моложе 60 лет. Пациенты с острым лимфобластным лейкозом проходили лечение в соответствии с протоколом лечения Ph-негативных острых лимфобластных лейкозов взрослых ALL-2009. Пациенты с хроническим миелолейкозом получали иматиниб или гидроксикарбамид; больных хроническим лимфолейкозом лечили по схеме RFC. В период проведения полихимиотерапии при развитии инфекционных осложнений пациенты получали массивную антибактериальную, противогрибковую, противовирусную терапию.

Клинические методы стоматологического обследования включали выявление жалоб больных; сбор анамнеза; визуальный осмотр полости рта с оценкой состояния слизистой оболочки полости рта; оценку болевой чувствительности с использованием 5-балльной вербальной шкалы оценки боли; индексную оценку: индекс кровоточивости по Мюллеману в модификации Коуэлл, определение индекса гигиены по Федорову-Володкиной, индекса КПУ.

Материалом для исследования служила ротовая жидкость, в которой определение антител к транслугтаминазе и глиадину классов IgA и IgG проводили методом иммуноферментного анализа с помощью комплекса, состоящего из вошера «Проплан» (Picon, Россия), шейкера «ElmiSkyLine» (Эстония) и спектрофотометра «Униплан» (Picon, Россия). В качестве диагностических тест-систем использовали наборы реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия): «IgA-транслугтаминаза-ИФА-Бест», «IgG-транслугтаминаза-ИФА-Бест», «IgA-Глиадин-ИФА-Бест» и «IgG-Глиадин-ИФА-Бест».

Статистическую обработку результатов проводили с помощью статистического пакета SPSS Statistics 21 (statistical package for social sciences), лицензия №20130626-3, и Microsoft Excel 2007 (Office Professional Plus 2007, номер лицензии 45754073). Были изучены формы распределения исследуемых показателей ротовой жидкости обследованных пациентов. Использовали визуальную оценку гистограмм распределения, оценивали показатели скошенности и крутизны, отражавшие асимметрию распределения, тесты на нормальность с помощью критерия Колмогорова – Смирнова с поправкой Лилиефорса и Шапиро-Уилка. Использовался непараметрический U-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферони в качестве альтернативы t-критерию Стьюдента. С учётом отклонения от нормальности различных величин дисперсий применяли непараметрический аналог дисперсионного анализа – анализ Краскела – Уоллеса.

Результаты и обсуждение. Изучение визуальных параметров и характеристик слизистой оболочки ротовой полости у обследованных с лейкозами позволило нам выделить следующие подгруппы: пациенты с классическими проявлениями стоматитов I, II, III степени тяжести и пациенты с отсутствием каких-либо жалоб на изменение состояния полости рта. Примечательно, что именно в последней подгруппе среди больных с острыми (у 79% больных с острым лимфобластным лейкозом, у 71% – с острым миелобластным

Таблица 1

Содержание антител к транслугтаминазе класса IgG (Ед/мл) в ротовой жидкости больных острыми лейкозами

Группа пациентов	M ± m	Me	Min	Max	95% интервал	Q1 – Q3
Без проявлений стоматита	8,73 ± 0,92	0,70	0,4	38,80	0–21,00	0,48–1,15
Стоматит I степени	9,98 ± 1,50	2,00	0,4	23,00	1,80–18,00	1,13–21,6
Стоматит II степени	2,94 ± 0,65	3,00	0,56	6,20	1,42–4,45	1,14–3,47
Стоматит III степени	1,27 ± 0,32*	1,15*	0,67	2,50	0,5–2,0	0,8–1,26

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: * – $p < 0,05$.

Таблица 2

Индексная оценка состояния полости рта больных лейкозами с первоначальными изменениями слизистой оболочки органов полости рта до и после химиотерапии

Пациенты с первоначальными изменениями	Гигиенический индекс	Индекс КПУ	Индекс кровоточивости по Мюллерману
После проведенной химиотерапии	2,07 ± 0,34*	12,62 ± 1,72	2,43 ± 0,26
До химиотерапии	1,61 ± 0,24	10,54 ± 1,68	1,43 ± 0,23

лейкозом) и хроническими (у 54% пациентов с хроническим миелолейкозом, у 56% - с хроническим лимфолейкозом) лейкозами обнаружены такие клинические признаки, как отечность языка, сглаженность и атрофия его нитевидных сосочков, фестончатость боковой поверхности и кончика языка, бледно-розовый цвет слизистой оболочки полости рта (у 67% больных с острым лимфобластным лейкозом и у 51% пациентов с острым миелобластным лейкозом), нередко являющийся также первым и зачастую единственным симптомом хронического лимфолейкоза (у 82% больных), особенно при наличии ангулярного хейлита. Подобные изменения позволили нам отнести их к так называемым первоначальным признакам стоматологических нарушений при лейкозах. Закономерным при наличии подобных данных оказался вопрос раннего выявления молекулярных нарушений в слизистой оболочке ротовой полости с помощью таких маркеров, которые отражали бы степень выраженности воспалительно-деструктивного процесса и показывали переход в стадию обострения болезни.

Проведенный в связи с этим количественный анализ антител к транслугтаминазе и глиадину показал наиболее низкое содержание антител класса IgA к транслугтаминазе в ротовой жидкости больных острыми лейкозами с первоначальными признаками стоматологических нарушений по сравнению с другими обследованными ($1,03 \pm 0,67$ Ед/мл); при этом IgG-антитела к транслугтаминазе, напротив, имели высокий показатель – $8,73 \pm 0,92$ Ед/мл, а максимальный уровень этих антител значительно превышал референтный – практически в 4 раза ($38,80$ Ед/мл). Данный прирост IgG-антител к транслугтаминазе можно расценить в качестве показателя повреждения соединительной ткани на молекулярном уровне и признака активной реакции иммунной системы в связи с этим, что может привести к дальнейшему прогрессированию патологических изменений слизистой оболочки полости рта

и возникновению в результате этого стоматитов различной степени тяжести.

Особенно ярко данная тенденция проявилась у пациентов с острыми лейкозами при развитии стоматита I степени тяжести, когда среднее значение IgG-антител к транслугтаминазе ($9,98 \pm 1,50$ Ед/мл) приблизилось к верхней границе, а максимальное ($23,00$ Ед/мл) превысило её в 2 раза (табл. 1).

Пациенты с хроническими лейкозами имели наибольший уровень антител к глиадину обоих классов при II степени тяжести стоматита (IgA – $2,48 \pm 0,34$ Ед/мл; IgG – $3,40 \pm 0,20$ Ед/мл) наряду с разнонаправленным содержанием антител к транслугтаминазе: IgG – при лёгкой степени стоматита ($2,44 \pm 0,44$ Ед/мл) и IgA, напротив, при выраженных проявлениях поражения слизистой рта – стоматите III степени ($1,76 \pm 0,53$ Ед/мл).

Полученные данные подтвердили предположение, что от вида гемобластоза зависит направленность изменений показателей гуморального иммунитета ротовой полости, и позволили разработать способ прогнозирования проявлений стоматита у пациентов с острыми лейкозами по изменению содержания антител к транслугтаминазе классов IgA и IgG в ротовой жидкости [14].

В ходе исследования мы установили, что в результате применения химиотерапевтических препаратов разнообразие клинико-молекулярных расстройств со стороны тканей полости рта у пациентов с лейкозами усиливается, причём особенно ярко в группе больных, изначально имевших первоначальные признаки стоматологических нарушений: у таких пациентов появилось множество жалоб, отмечался прирост значений стоматологических индексов по сравнению с показателями до начала химиотерапевтического лечения (табл. 2).

Отражением молекулярных сдвигов у таких пациентов явилось снижение в ротовой жидкости уровня антител к глиадину класса IgA на фоне значительного прироста одноимённых антител к транслугтаминазе: в 4 раза в ротовой жидкости пациентов с острыми лейкозами ($4,03 \pm 0,77$ Ед/мл; $p < 0,05$) и практически в 2,5 раза с хроническими лейкозами ($3,24 \pm 0,47$ Ед/мл; $p < 0,05$).

Таким образом, выраженный прирост антител к транслугтаминазе в результате агрессивной химиотерапии может наглядно свидетельствовать о структурных изменениях фермента транслугтаминазы, приводящих к нарастанию ауто-сенсibilизации и дезорганизации соединительной ткани. В результате у пациентов, изначально имевших минимально выраженные признаки поражения слизистой оболочки полости рта, клинически развивался стоматит II (средней) степени тяжести, минуя I степень.

Таблица 3

Содержание антител к глиадину класса IgA и IgG (в Ед/мл) в ротовой жидкости больных со стоматитом II степени тяжести после химиотерапии

Иммуноглобулины	M ± m	Me	Min	Max	95% интервал	Q1–Q3
IgA-антитела к глиадину при острых лейкозах	5,35 ± 0,35	1,23	3,70	5,10	3,50–3,20	3,70–2,3
IgG-антитела к глиадину при острых лейкозах	5,50 ± 0,23*	2,83	1,00	4,50	3,23–2,34	1,23–2,34
IgA-антитела к глиадину при хронических лейкозах	3,56 ± 0,43*	0,60	2,10	4,00	1,30–4,50	1,32–2,30
IgG-антитела к глиадину при хронических лейкозах	4,80 ± 0,50*	1,30	1,00	2,00	3,30–3,40	4,30–4,70

Что касается пациентов с диагностированными до начала полихимиотерапии стоматитами, в их ротовой жидкости в целом происходило пополнение IgA- и IgG-антител к трансклутаминазе и глиадину по сравнению с данными у этих же больных до начала лечения. Отмечено, что особенно ярко данная тенденция прослеживалась в случае диагностирования стоматита II степени тяжести, при котором наибольший уровень IgA- и IgG-антител к глиадину обнаружен в ротовой жидкости больных как с острыми, так и хроническими лейкозами (табл. 3).

Что касается содержания антител к трансклутаминазе, достоверно наибольший показатель IgG зарегистрирован при наличии у обследованных признаков стоматита I степени тяжести как при острых ($9,98 \pm 0,20$ (2,00) Ед/мл; $p < 0,05$), так и при хронических лейкозах ($2,57 \pm 0,03$ (1,10) Ед/мл; $p < 0,001$). Примечательно, что у таких больных сохранялась та же тенденция, что была до проведения химиотерапевтического лечения. Однако при стоматите III степени тяжести, сопровождающем хронические формы лейкоза, было выявлено изменение наибольшего содержания антител к трансклутаминазе класса IgA до терапии в наименьшее ($1,90 \pm 0,52$ Ед/мл; $p < 0,05$), что может свидетельствовать о снижении местного иммунного потенциала после проведенного химиотерапевтического лечения, подтверждая субъективное ухудшение состояния полости рта у больных с гемобластомами.

Заключение. Таким образом, исследование содержания антител к трансклутаминазе и глиадину в ротовой жидкости больных лейкозами позволяет рассмотреть клинические особенности стоматитов в непосредственной взаимосвязи «молекулярных рецепторов», присутствующих в соединительнотканых структурах ротовой полости, с локальными механизмами местной резистентности посредством белок-белковых взаимодействий. Использование их в качестве ранних маркеров целенаправленной диагностики поражения слизистой оболочки ротовой полости поможет обнаружить проявления гемобластозов в начальном периоде развития стоматитов, способствуя своевременной коррекции нарушенного метаболизма и тем самым улучшению качества жизни пациентов с острыми и хроническими лейкозами.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 10–13 см. REFERENCES)

1. Гажва С.И. Проявления заболеваний пародонта у больных острыми лейкозами. *Нижегородский медицинский журнал*. 2002; 3: 51–55.
2. Трухан Д.И. *Изменение органов и тканей полости рта при заболеваниях внутренних органов*. М.: Практическая медицина; 2012.
3. Иванова О.Е. Прогнозирование осложнений при санации полости рта у больных с онкологическими заболеваниями. *Клиническая стоматология*. 2007; 3: 34–6.
4. Горбачева И.А. Единство системных патогенетических механизмов при заболеваниях внутренних органов, ассоциированных с генерализованным пародонтитом. *Стоматология*. 2004; 3: 6–10.
5. Шинкевич Д.С. Клинико-морфологические проявления гемобластозов в челюстно - лицевой области. Тактика хирургической помощи больным гемобластомами. *Российская стоматология*. 2015; 2: 19–28.
6. Свечникова М.В. Исследование влияния полихимиотерапии на

слизистую оболочку полости рта. В кн.: *Материалы конференции «Аспирантские чтения»*. Самара: Книга; 2011: 270 – 2.

7. Бобров А.П. Изменения слизистой оболочки полости рта у онкологических больных на фоне проводимой химиотерапии. *Стоматология*. 2006; 6: 70–3.
8. Лузина А.А. Купирование болевого синдрома в полости рта при различных формах химиомукозита. *Проблемы паллиативной помощи в онкологии: Антология научных публикаций*. 2002; I-II: 112–3.
9. Свечникова М.В. Стоматологический статус пациентов с острыми лейкозами. *Аспирантский вестник Поволжья*. 2013; 5 – 6: 164 – 6.
14. Гильмияров Э.М., Гильмиярова Ф.Н., Селезнева И.А., Свечникова М.В. и др. Способ прогнозирования проявлений стоматита у пациентов с острыми лейкозами по изменению содержания антител к трансклутаминазеклассов иммуноглобулинов А и G в ротовой жидкости. *Патент РФ № 2572696*; 2016.

REFERENCES

1. Gajhva S.I. Manifestations of periodontal diseases in patients with acute leukemia. *Nizhegorodskiy meditsinskiy zhurnal*. 2002; 3: 51–5. (in Russian)
2. Trukhan D.I. *Change in the organs and tissues of the mouth with diseases of internal organs* [Izmenenie organov i tkaney polosti rta pri zabolevaniyakh vnutrennikh organov]. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2012. (in Russian)
3. Ivanova O.E. Prognosis of complications during oral cavity sanation in patients with oncological diseases. *Klinicheskaya stomatologiya*. 2007; 3: 34–6. (in Russian)
4. Gorbacheva I.A. Unity of systemic pathogenetic mechanisms in diseases of internal organs associated with generalized periodontitis. *Stomatologiya*. 2004; 3: 6–10. (in Russian)
5. Shinkevich D.S. Clinical and morphological manifestations of hemoblastosis in the maxillofacial area. Tactics of surgical care for patients with hemoblastoses. *Rossiyskaya stomatologiya*. 2015; 2: 19–28. (in Russian)
6. Svechnikova M.V. Investigation of the effect of polychemotherapy on the mucosa of the oral cavity. In the book: *Proceedings of the conference "Postgraduate Readings"*. Samara: Kniga 2011: 270 – 2. (in Russian)
7. Bobrov A.P. Changes in the mucous membrane of the oral cavity in cancer patients on the background of ongoing chemotherapy. *Stomatologiya*. 2006; 6: 70–3. (in Russian)
8. Luzina A.A. Pain-management in the oral cavity with various forms of chemomucositis. *Problems of palliative care in oncology: Anthology of scientific publications*. 2002; I-II: 112–3. (in Russian)
9. Svechnikova M.V. Dental status of patients with acute leukemia. *Aspirantskiy vestnik Povolzh'ya*. 2013; 5 – 6: 164 – 6. (in Russian)
10. Azher U. Oral health status of children with acute lymphoblastic leukemia undergoing chemotherapy. *Indian. J. Dent. Res*. 2013; 24(4): 523.
11. Nurminskaya M. Transglutaminases in mineralized tissues. *Front Biosci*. 2006; 11: 1591–1606.
12. Nurminskaya M. Transglutaminase factor XIIIa in developing avian long bone cartilages. *Dev. Dyn*. 2002; 223 (1): 24–32.
13. Harrison C.A. Transglutaminase inhibitors induce hyperproliferation and parakeratosis in tissue-engineered skin. *Br. J. Dermatol*. 2007; 156(2): 247–57.
14. Gilmiyarov E.M., Gilmiyarova F.N., Selezneva I.A., Svechnikova M.V. et al. Method of predicting stomatitis manifestations in acute leukaemia patients by concentration changes of antibodies to transglutaminase classes immunoglobulines A and G in an oral liquid. *Patent RF. N 2572696*; 2016. (in Russian)

Поступила 30.01.18

Принята к печати 06.02.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 613.863-07:616.316-078.33

Мельник К.Н.^{1,2}, Баишева Г.М.¹, Гильмиярова Ф.Н.¹, Алпатова Т.А.²

САЛИВАДИАГНОСТИКА КАК МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ К УЧЕБНОМУ СТРЕССУ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО ПИТЬЕВОГО ПОВЕДЕНИЯ

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Россия, 443099, Самара;
²ГБУЗ СО «Тольяттинская городская клиническая больница № 5», 445846, г. Тольятти, Россия

В рандомизированное плацебо-контролируемое двойное слепое исследование, посвящённое адаптации организма человека к изменению питьевого поведения (как по количеству, так и по качеству питьевой воды) на фоне учебного стресса, включили 85 участников, средний возраст – 18 лет. В качестве материала выбрана ротовая жидкость, поскольку саливадиагностика является предпочтительным методом при необходимости одномоментного обследования большого количества участников, неинвазивна, не требует специально обученного персонала для сбора материала, кроме того, маркеры ротовой жидкости позволяют оценить степень ответа организма на стресс. Выясняли уровень активности α -амилазы, состояние цитокинового профиля (ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-6, α -ФНО, ИНФ γ), количество общего белка. В результате разработана схема предобработки ротовой жидкости для определения цитокинов и α -амилазы, определены уровни этих маркеров у здоровых молодых людей и установлена их корреляция с психофизиологическими данными.

Ключевые слова: саливадиагностика; ротовая жидкость; слюна; цитокины; ИЛ-1; ИЛ-4; ИЛ-6; α -ФНО; ИНФ γ ; α -амилаза; питьевое поведение; адаптация; иммунитет; питьевая вода; электромагнитная доочистка воды.

Для цитирования: Мельник К.Н., Баишева Г.М., Гильмиярова Ф.Н., Алпатова Т.А. Саливадиагностика как метод определения иммунологической адаптации к учебному стрессу в условиях различного питьевого поведения. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(6): 353-357. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-353-357>

Melnik K.N.^{1,2}, Baisheva G.M.¹, Gilmiyarova F.N.¹, Alpatova T.A.²

SALIVA DIAGNOSTIC IN THE RESEARCH ABOUT HUMAN IMMUNE ADAPTATION TO STUDY STRESS AND TO DIFFERENT WATER DRINKING BEHAVIOR.

¹Samara State Medical University, 443099, Samara, Russian Federation;

²Togliatti city clinical hospital №5, 445846, Togliatti, Russian Federation

85 healthy young people were participates of a randomized placebo controlled cross-over fashion. This study tested associations between different water drinking behavior; the condition of oral immune protection and stress factors over 3 months. We examined saliva IL-1, IL-4, IL-6, TNF- α , γ -IFN, α -amylase and compared them with stress-associated psychophysiological data. As a result of our study we made a saliva pretreatment plan for cytokines and amylase assays, also we tried to understand the strategy of mechanism associations between different water drinking behavior; the condition of oral immune protection and stress factors.

Key words: saliva diagnostic; saliva; cytokines; IL-1; IL-4; IL-6; TNF- α ; IFN- γ ; amylase; behavior; adaptation; immunity; drinking water; pure water.

For citation: Melnik K.N., Baisheva G.M., Gilmiyarova F.N., Alpatova T.A. Saliva diagnostic in the research about human immune adaptation to study stress and to different water drinking behavior. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (6): 353-357 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-353-357>

For correspondence: Melnik K.N., Ph.D. student (Physiology), Clinical Laboratory Diagnostician of Laboratory of AIDS and immunology; e-mail: christina.n.melnik@gmail.com

Information about authors:

Melnik K.N., <https://orcid.org/0000-0001-5033-7056>

Baisheva G.M., https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=96469

Gilmiyarova F.N., https://elibrary.ru/author_items.asp?authorid=79654

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 06.02.2018
Accepted 15.03.2018

Коррекция питьевого поведения - популярное современное направление в формировании здорового образа жизни: адаптации к условиям стресса [1-3]; профилактики метаболических заболеваний [4-6], почечных расстройств [7] и син-

копальных состояний [8, 9], нетрудоспособности вследствие когнитивных расстройств, физического утомления, головных болей [10].

В работах, посвящённых поведению человека и адаптации к стресс-индуцированным состояниям, большое значение имеют правильный выбор дизайна исследования, чёткого протокола проведения опытов, репрезентативной группы участников и удобного материала для оценки влияния изме-

Для корреспонденции: Мельник Кристина Николаевна, аспирант каф. физиологии с курсом безопасности жизнедеятельности и медицины катастроф, врач КЛД; e-mail: christina.n.melnik@gmail.com

нений в поведении на состояние организма при соблюдении идентичности условий внешней среды.

Развитие современных биотехнологий, повышение чувствительности аналитических методик в комбинации с клиническим запросом на ориентированные на пациента и неинвазивные диагностические платформы привели к появлению тест-систем для анализа ротовой жидкости. Саливадиагностика крайне удобна при необходимости одномоментного обследования большого числа участников, неинвазивна, не требует специально обученного персонала для сбора материала, кроме того, маркеры ротовой жидкости позволяют оценить степень ответа на стресс [11–14].

В данной статье мы ставим целью подробно описать преаналитический этап работы с ротовой жидкостью для определения уровня цитокинов и α -амилазы в ротовой жидкости у здоровых молодых людей при коррекции питьевого поведения на фоне учебного стресса.

Задачи: предоставить читателю информацию о сборе, транспортировке, обработке и хранении биоматериала (ротовой жидкости) в ходе данной работы; описать режимы центрифугирования для исследования биохимических и иммунологических показателей ротовой жидкости; определить активность α -амилазы, показатели цитокинового профиля ротовой жидкости здоровых молодых добровольцев; оценить современными статистическими методами полученные данные.

Материал и методы. В рандомизированном плацебо-контролируемом двойном слепом исследовании приняли участие 192 молодых человека. В результате обработки 192 анкет отсутствовали противопоказания для участия в проекте у 146 человек. Из них 101 человека включили в процедуру рандомизации, все три этапа прошли 85 добровольцев (из них 11 юношей и 74 девушки; средний возраст 18,8 года). Этих добровольцев распределили на 3 группы:

основная группа (*trial*) – 30 человек, которые в течение 3 мес ежедневно употребляли питьевую воду, обработанную с помощью прибора для электромагнитной доочистки воды «Аквадиск» (ОАО «Аква-Система», Москва), исходя из физиологической потребности в 35 мл/кг массы тела человека в сутки;

группа сравнения (*placebo*) – 30 испытуемых, в течение 6 мес употреблявших питьевую воду из плацебо-прибора «Аквадиск» (не оказывающего эффекта физической доочистки на воду) из расчёта 35 мл/кг массы тела/сут;

контрольная группа (*control*) – 25 человек, которые придерживались обычного (привычного) питьевого поведения как по количеству, так и по качеству употребляемой жидкости.

Критерии включения участников: клинические здоровые студенты-волонтеры обоих полов 18–20 лет.

Критерии исключения: сахарный диабет, неконтролируемая гипертензия, заболевания сердца, лёгких и почек, онкологические заболевания, приём медикаментов, которые влияют на аппетит или массу тела.

Распределение по группам выполняли случайным методом (рандомизацией) после получения постановления о соответствии исследования этическим нормам (протокол № 124 от 10 октября 2012 г. Комитета по биоэтике при Самарском государственном медицинском университете), письменного информированного согласия от участников.

Для рандомизации выбрали централизованный компьютерный способ, основанный на методе случайных чисел и проводимый специалистом, непосредственно не участвующим в данной научной работе. Таким образом, ни исследователи, проводившие набор добровольцев, ни сами участники эксперимента не знали, к какой из групп относились волонтеры.

Научными базами служили кафедра нормальной физиологии с курсом безопасности жизнедеятельности и медици-

ны катастроф ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (СамГМУ) и СПИД-диагностическая и иммунологическая лаборатория ГБУЗ СО «Тольяттинская городская клиническая больница № 5».

На 3-х этапах эксперимента (20.09.2014; 08.11.2014; 20.12.2014) использовались следующие методы:

1. Анкетирование, позволяющее оценить питьевые режимы, рацион питания, состояние иммунной системы.

2. Биохимическое исследование ротовой жидкости: количественная оценка ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-6, ИНФ- γ , общего белка, уровня активности α -амилазы.

3. Психофизиологическое тестирование: определение самочувствия, активности, настроения (опросник САН); тест на стрессочувствительность; оценка функционального состояния вегетативной нервной системы с помощью индекса Кердо.

Материалом для исследования служила ротовая жидкость. Сбор, транспортировка, обработка и хранение биоматериала осуществлялись согласно рекомендациям, разработанным на базе кафедры биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики СамГМУ [1, 15, 23], протоколу международной компании «Salimetrics, LLC» (США), а также опубликованной в журналах методологии ряда крупных международных лабораторий, занимающихся саливадиагностикой [12, 13, 16].

Взятие слюны осуществлялось у испытуемых в положении сидя, натошак, в утренние часы – с 8:30 до 11:30 утра во время максимальной секреции ротовой жидкости. За 15 мин перед взятием ротовой жидкости необходимо было прополоскать рот кипячёной водой, за 12 ч до сбора слюны исключить приём алкоголя. Непосредственно перед сбором необходимо было исключить использование зубной пасты.

Собирали ротовую жидкость в одноразовые сухие мерные полипропиленовые пробирки (с полиэтиленовыми завинчивающимися крышками) на 15 мл, без стимуляции, методом сплёвывания, в количестве 5–10 мл.

Участники при сборе слюны руководствовались следующей инструкцией:

1. Важно: руки могут являться источником загрязнения слюны в процессе сбора. Перед проведением сбора слюны мойте тщательно руки мылом и водой.

2. Хорошо прополощите рот водой (как минимум дважды). Подождите 15 минут.

3. Откройте пробирку и сплёвывайте непосредственно в неё. Избегайте прикосновений пальцами к горлышку пробирки. Будьте аккуратны и держите пробирку вертикально.

4. Наполните пробирку слюной до метки. Обратите внимание, что до метки должен дойти общий объём жидкости в пробирке (без пены).

5. Плотно закрутите пробирку. Убедитесь, что не происходит протекание жидкости при переворачивании пробирки.

6. Передайте пробирку лаборанту.

N.B.! Вам может понадобиться несколько минут, чтобы выделить нужное количество слюны.

Предобработка проб не требовалась. Транспортировку до лаборатории биологического материала осуществляли в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами (при температуре +2...+4°C) в течение 6 ч, а замораживание (до -70°C для иммунологических проб, -20°C для биохимических проб) – в течение 12 ч после получения образца.

Из пробирки (15 мл) с материалом от одного пациента после 10-кратного перемешивания путём переворачивания вверх-вниз получали 2 набора пробирок:

для измерения иммунологических показателей – максимум 5 аликвот слюны (по 1 мл в полистироловых пробирках типа эппендорф на 1,5 мл), которые хранили при температуре -70°C; размораживание осуществлялось не более одного раза;

Таблица 1
Изменения количества общего белка в ротовой жидкости

Показатель	1-я группа (опытная)	2-я группа (плацебо)	3-я группа (контрольная)	p, Краскела–Уоллиса
Общий белок, г/л				
I этап	0,79 ± 0,15	0,94 ± 0,10	0,68 ± 0,07	0,036
II этап	0,69 ± 0,08	0,70 ± 0,09	0,84 ± 0,17	0,923
III этап	0,47 ± 0,11	0,36 ± 0,06	0,67 ± 0,17	0,201
Критерий Манна–Уитни–Вилкоксона				
	P_{1-2}	P_{1-3}	P_{2-3}	
I этап	0,016	0,391	0,074	
II этап	0,820	0,765	0,735	
III этап	0,414	0,301	0,068	

Таблица 2
Изменения количества ИЛ-1β в ротовой жидкости

Показатель	1-я группа (опытная)	2-я группа (плацебо)	3-я группа (контрольная)	p, Краскела–Уоллиса
ИЛ-1β, пг/мл				
I этап	131,91 ± 18,25	137,39 ± 15,31	120,10 ± 15,70	0,787
II этап	117,75 ± 17,36	129,42 ± 18,23	99,93 ± 18,61	0,457
III этап	130,35 ± 16,91	125,63 ± 16,66	113,11 ± 21,05	0,512

для определения биохимических показателей 5 мл материала в пробирке хранили при -20°C. Размораживание осуществлялось не более одного раза.

В день проведения иммунологических исследований после полного размораживания пробы тщательно перемешивали, осадок отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 10 000 g и температуре 4°C. Предварительного разведения ротовой жидкости не производили. Иммунологические тесты реализовывались методом твердофазного иммунофер-

Таблица 3
Изменения количества ИЛ-6, ИЛ-4, ИНФ-γ и ФНО-α, активности α-амилазы

Показатель	1-я группа (опытная)	2-я группа (плацебо)	3-я группа (контрольная)	p, Краскела–Уоллиса
ИЛ-6, пг/мл				
I этап	0,60 ± 0,24	1,37 ± 0,44	3,07 ± 2,13	0,457
II этап	1,76 ± 0,50	6,91 ± 5,10	1,78 ± 0,63	0,31
III этап	1,45 ± 0,71	1,02 ± 0,30	1,36 ± 0,27	0,175
ИЛ-4, пг/мл				
I этап	0,58 ± 0,28	0,48 ± 0,23	0,97 ± 0,40	0,668
II этап	0,80 ± 0,37	0,86 ± 0,42	1,12 ± 0,49	0,923
III этап	1,16 ± 0,42	0,59 ± 0,32	1,32 ± 0,59	0,313
ИНФ-γ, пг/мл				
I этап	0,14 ± 0,14	0,17 ± 0,11	0,46 ± 0,30	0,79
II этап	0,83 ± 0,62	2,28 ± 1,16	2,27 ± 0,96	0,266
III этап	1,63 ± 0,85	0,70 ± 0,50	1,92 ± 1,20	0,646
ФНО-α, пг/мл				
I этап	4,49 ± 3,03	5,32 ± 3,36	0,76 ± 0,60	0,092
II этап	5,29 ± 3,03	10,35 ± 6,45	7,10 ± 5,34	0,291
III этап	4,67 ± 2,89	1,23 ± 0,72	13,27 ± 6,75	0,096
α-амилаза, МЕ/мл				
I этап	478,59 ± 130,11	455,17 ± 70,55	591,96 ± 158,29	0,547
II этап	199,23 ± 45,44	338,34 ± 68,28	415,15 ± 129,30	0,263
III этап	312,43 ± 48,15	662,30 ± 230,62	743,59 ± 235,64	0,184

ментного анализа с применением спектрофотометра вертикального сканирования Sunrise фирмы «Тесап» (Австрия), позволяющего проводить измерения оптической плотности раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм (референсная длина волны 620–655 нм), и тест-систем фирмы «Вектор-Бест» (Россия).

В день тестирования активности α-амилазы, определения количества общего белка в ротовой жидкости пробы после полного размораживания тщательно перемешивали, осадок отделяли центрифугированием 15 мин при 1500 g. В течение получаса перед началом измерений пробы находились при комнатной температуре.

Для определения каталитической активности α-амилазы материал от участника разводили физиологическим раствором (в эмпирически подобранном титре 1:100) при комнатной температуре, активность определяли с помощью диагностических систем реагентов *in vitro* (фирма «Roche», Швейцария), предназначенных для *in vitro*-использования на анализаторах Cobas C 111 (фирма «Roche», Швейцария).

Сравнение групп выполняли с помощью непараметрического дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса, попарные сравнения групп проводились по критерию Манна–Уитни–Вилкоксона, с целью статистического изучения связи между явлениями использовали непараметрический метод – коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты. Количество общего белка в ротовой жидкости характеризовалось статистически достоверными различиями между группами на начальном этапе исследования (табл. 1).

У участников всех групп зафиксированы стабильные уровни ИЛ-1β ($p > 0,05$) на всех этапах эксперимента (табл. 2).

Перцентильный размах (25–75%) для опытной группы на I этапе находился в диапазоне 42,27–250,50 пг/мл (Ме 118,11 пг/мл), на II этапе в диапазоне 43,44–240,20 пг/мл (Ме 62,64 пг/мл), а на III этапе составил 52,27–250,25 пг/мл (Ме 82,76 пг/мл). В группе плацебо данный показатель находился на уровне 50,08–218,24 пг/мл (Ме 138,52 пг/мл) на I этапе, 49,08–251,00 пг/мл (Ме 83,24 пг/мл) – на II этапе, 40,91–232,45 пг/мл (Ме 99,29 пг/мл) – на III этапе. В контрольной группе 25–75-й перцентиль на I этапе составил 45,33–169,68 пг/мл (Ме 94,82 пг/мл), на II этапе – 31,45–132,71 пг/мл (Ме 73,61 пг/мл), на III этапе – 31,74–237,10 пг/мл (Ме 63,07 пг/мл).

У участников всех групп отмечены соответствующие норме уровни ИЛ-6, ИЛ-4, ИНФ-γ и ФНО-α, а также α-амилазы, без статистически достоверных различий между группами в ходе исследования (табл. 3).

Статистически достоверные изменения обнаружены для соотношения ИЛ-1/ИЛ-6 ($p < 0,05$), которое возможно использовать для оценки баланса между провоспалительными и противовоспалительными процессами [22] (табл. 4).

Нужно отметить, что между психофизиологическими данными и биохимическими показателями в ротовой жидкости наблюдалась достоверная корреляция, в частности, между уровнями базовой стрессочувствительности и общего белка (во всех группах вместе на всех этапах исследования: $r = -0,155$; $p = 0,022$; $n = 219$; в опытной группе: $r = -0,227$; $p = 0,040$; $n = 82$; в контрольной группе: $r = -0,354$; $p = 0,008$; $n = 55$); между уровнями динамической стрессочувствительности и общим белком (во всех группах вместе на всех этапах исследования: $r = -0,147$; $p = 0,029$; $n = 219$; в контрольной группе: $r = -0,422$; $p = 0,008$; $n = 55$); самочувствием и ИЛ-6 (во всех группах вместе на всех этапах исследования: $r = 0,133$; $p = 0,040$; $n = 239$; в опытной группе: $r = 0,227$; $p = 0,036$; $n = 86$); активностью и ФНО-α (в контрольной группе: $r = -0,375$; $p = 0,006$; $n = 52$).

Таблица 4

Изменения в соотношении ИЛ-1/ИЛ-6

Показатель	1-я группа (опытная)	2-я группа (плацебо)	3-я группа (контрольная)	p, Краскелла-Уоллиса
ИЛ-1/ИЛ-6				
I этап	2229,88 ± 1492,31	311,42 ± 125,03	126,51 ± 64,06	0,055
II этап	776,43 ± 699,64	120,93 ± 33,10	187,77 ± 85,09	0,756
III этап	802,33 ± 413,69	859,55 ± 566,25	94,66 ± 37,79	0,048
Критерий Манна-Уитни-Вилкоксона				
	P_{1-2}	P_{1-3}	P_{2-3}	
I этап	0,159	0,023	0,186	
II этап	0,916	0,492	0,531	
III этап	0,579	0,026	0,048	

Обсуждение. В литературе референсные интервалы для ИЛ-1β в ротовой жидкости разнятся, но имеют схожий с полученным нами размах [17–21]. Так, согласно данным аргентинских учёных [25], полученные нами значения ИЛ-1β свидетельствуют о стоматологическом здоровье большинства испытуемых во всех исследуемых группах и отсутствии у них воспалительных заболеваний. Показатели свыше 212 пг/мл (по данным указанных авторов) – это пороговый уровень, предсказывающий развитие периодонтита с 78% чувствительностью и 100% специфичностью, он отмечен на I этапе у 10 человек в опытной группе, у 8 человек – в группе плацебо и у 4 человек – в контрольной группе, что говорит об изначально более хорошем состоянии полости рта в группе контроля.

Отсутствие статистически достоверных различий между группами по показателям ИЛ-6, ИЛ-4, ФНО-α и ИНФ-γ подтверждает, что все участники являлись клинически здоровыми молодыми людьми.

Интересно снижение активности α-амилазы в ротовой жидкости (как маркера снижения активности симпатической нервной системы [24]) группы плацебо ($p = 0,05$) и опытной группы ($p > 0,05$) на II этапе и сохранение данной тенденции в этих группах к концу исследования, в отличие от повышения её активности у контрольной группы, что косвенно может свидетельствовать о более успешной адаптации к стрессу у лиц, употребляющих воду в соответствии с физиологической потребностью. В связи с вышесказанным в дальнейших научных работах интересной представляется градация уровней маркеров ротовой жидкости в зависимости от психофизиологического состояния участников.

Выводы

В результате проведённой работы разработана схема предобработки ротовой жидкости для выявления цитокинов и определения уровня активности α-амилазы.

При исследовании 85 молодых здоровых добровольцев получен блок иммунологических показателей ротовой жидкости, определены уровни показателей цитокинового профиля ротовой жидкости, которые, согласно литературным данным, соответствовали референсным показателям здоровых людей с отсутствием воспалительных и метаболических заболеваний.

Тенденции в изменениях уровня α-амилазы и цитокинов ротовой жидкости в основной группе и группе плацебо подтверждают гипотезу о ключевой роли неспецифического иммунитета и вегетативной нервной системы при реакции на стресс, а также о более успешной адаптации студентов к стрессовым условиям учебной среды на фоне коррективы питьевого поведения.

Корректирование питьевого поведения в течение учебного и рабочего времени и отдыха, создание чётких руководств

по восстановлению гидратации для студентов вузов, работников здравоохранения и пациентов являются эффективными средствами решения проблемы гипогидратации.

Благодарность. Авторы выражают благодарность за возможность проведения лабораторных тестирований А.Н. Кирсанову, зам. главного врача по консультативно-диагностическим вопросам ГБУЗ СО «ТГКБ № 5»; участникам студенческого научного кружка кафедры физиологии за активную помощь в координировании исследования; ОАО «Аква-Система» за безвозмездное предоставление приборов для доочистки воды.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–10, 12–21, 24

см. REFERENCES)

1. Радомская В.М., Баишева Г.М., Первова Ю.В., Мельник К.Н., Павлова И.О. Влияние питьевого режима на психоэмоциональную сферу человека. *Астраханский медицинский журнал*. 2012; 7(2): 201-3.
11. Коротыко Г.Ф. Саливадиагностика – ренессанс неинвазивных технологий. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2006; 9: 145-9.
22. Михайленко А.А., Коненков В.И., Базанов Г.А., Покровский В.И. Руководство по клинической иммунологии, аллергологии, иммуногенетике и иммунофармакологии: Учебное пособие. М.: Трида; 2005.
23. Гильмиярова Ф.Н., ред. Аналитические подходы к изучению показателей метаболизма в ротовой жидкости: Учебное пособие. М.: Известия; 2006.

REFERENCES

1. Radomskaya V.M., Baisheva G.M., Pervova Yu.V., Melnik K.N., Pavlova I.O. Effect of drinking water regime on psycho-emotional state of human. *Astrakhsanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 7(2): 201-3. (in Russian)
2. Serra-Majem L., Nissensohn M. Beverage Consumption Habits around the World: The Burden of Disease Attributable to Hydration. *Nutrients*. 2016; 18(8): 738.
3. Maughan R.J., Watson P., Shirreffs S.M. Implications of active lifestyles and environmental factors for water needs and consequences of failure to meet those needs. *Nutrition reviews*. 2016; 73 (2): 130-40.
4. Leahy M., Ratliff J.C., Riedt C.S., Fulgoni V.L. Consumption of Low-Calorie Sweetened Beverages Compared to Water Is Associated with Reduced Intake of Carbohydrates and Sugar, with No Adverse Relationships to Glycemic Responses: Results from the 2001-2012. *National Health and Nutrition Examination Surveys. Nutrients*. 2017; 9(9). Available at: <http://www.mdpi.com/2072-6643/9/9/928> (Accessed 24 August 2017).
5. Imhof A., Corwell T.B., McAlister A.R. Water could change the way we eat. *Appetite*. 2008; 5(1): 1-25.
6. Tate D.F., Lyons E., Stevens J. Replacing caloric beverages with water or diet beverages for weight loss in adults: main results of the Choose Healthy Options Consiously Everyday: randomized clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012; 95(3): 555-63.
7. Cheungpasitporn W., Rossetti S., Friend K., Erickson S.B. et al. Treatment effect, adherence, and safety of high fluid intake for the prevention of incident and recurrent kidney stones: a systematic review and meta-analysis. *Journal of nephrology*. 2016; 29(2): 211-9.
8. Lu C.-C., Diedrich A., Tung C. Water Ingestion as prophylaxis against syncope. *Circulation*. 2003; 103: 2660-5.
9. Mendonca G.V., Teodósio C., Lucena R., Pereira F.D. Sexual dimorphism in the osmopressor response following water ingestion. *Bio-science reports*. 2016; 36(3). Available at: <http://www.bioscirep.org/content/36/3/e00344.long> (Accessed 17 June 2016).
10. Benton D., Braun H., Cobo J.C., Edmonds C., Elmadfa I., El-Sharkawy A. et al. Executive summary and conclusions from the European Hydration Institute expert conference on human

- hydration, health, and performance. *Nutrition reviews*. 2015; 73: 148-50.
11. Korot'ko G.F. The salivadiagnostics - renaissance of non-invasive technologies. *Kubanskiy nauchny meditsinskiy vestnik*. 2006; 9: 145-9. (in Russian)
 12. Chiapelli F., Iribarren F.J., Prolo P. Salivary biomarkers in psychobiological medicine. *Bioinformation*. 2006; 1(8): 331-4.
 13. Sjögren E., Leanderson P., Kristenson M., Emerudh J. Interleukin-6 levels in relation to psychosocial factors: Studies on serum, saliva, and in vitro production by blood mononuclear cells. *Brain. Behav. Immun.* 2006; 20(3): 270-8.
 14. Suzuki N., Nakanishi K., Yoneda M., Hirofujii T., Hanioka T. Relationship between salivary stress biomarker levels and cigarette smoking in healthy young adults: an exploratory analysis. Available at: <https://tobaccoinduceddiseases.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12971-016-0085-8> (Accessed 6 June 2016).
 15. Baisheva G.M., Melnik K.N., Gilmiarova F.N., Gussyakova O.A., Shachnovich E.A., I.O. Pavlova et al. Drinking water as a part of healthy behavior. In: Conference Innovations in Attractive and Sustainable Food for Health, 28th European Federation of Food Science and Technology, Uppsala, Sweden; 2014: 48-9.
 16. Brandtzaeg P. Secretory immunity with special reference to the oral cavity. *Journal of oral microbiology*. 2013; 5: 20-30.
 17. Brailo V., Vucicevic-Boras V., Lukac J., Biocina-Lukenda D., Zilic-Alajbeg I., Milenovic A. et al. Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*. 2012; 17(1): 10-5.
 18. Sánchez G.A., Miozza V.A., Delgado A., Busch L. Salivary IL-1β and PGE2 as biomarkers of periodontal status, before and after periodontal treatment. *Journal of clinical periodontology*. 2013; 40(12): 1112-7.
 19. Rangbulla V., Nirola A., Gupta M., Batra P., Gupta M. Salivary IgA, Interleukin-1β and MMP-8 as Salivary Biomarkers in Chronic Periodontitis Patients. *Chin. J. Dent. Res.* 2017; 20(1): 43-51.
 20. Gursoy U.K., Könönen E., Uitto V.J., Pussinen P.J., Hyvärinen K., Suominen-Taipale L., Knuuttila M. Salivary interleukin-1beta concentration and the presence of multiple pathogens in periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2009; 36(11): 922-7.
 21. Mirrieles J., Crofford L.J., Lin Y., Kryscio R.J., Dawson D.R., Ebersole J.L. Rheumatoid Arthritis and Salivary Biomarkers of Periodontal Disease. *Journal of clinical periodontology*. 2010; 37(12): 1068-74.
 22. Mikhaylenko A.A., Konenkov V.I., Bazanov G.A., Pokrovskiy V.I. *Guidance to clinical immunology, allergology, immunogenetics and immunopharmacology [Rukovodstvo po klinicheskoy immunologii, allergologii, immunogenetike i immunofarmakologii. Uchebnoe posobie]*. Moscow: Triada; 2005. (in Russian)
 23. Gil'miyarova F.N., ed. *Analytical approaches to the study of metabolic parameters in the saliva: manual [Analiticheskie podkhody k izucheniyu pokazateley metabolizma v rotovoy polosti. Uchebnoe posobie]*. Moscow: Izvestiya; 2006. (in Russian)
 24. Strahler J., Skoluda N., Kappert M.B., Nater U.M. Simultaneous measurement of salivary cortisol and alpha-amylase: Application and recommendations. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2017; 83: 657-77.

Поступила 06.02.18
Принята к печати 15.03.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:578.825.11]-053.31.092

Кравченко Л.В., Левкович М.А., Пятикова М.В.

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНТЕРФЕРОНА γ И ИНТЕРФЕРОНОПРОДУКЦИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ГЕРПЕСА 6-ГО ТИПА У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 344012, Ростов-на-Дону, Россия

Цель работы - на основе анализа уровня полиморфизма гена IFNG интерферона γ (+874 A/T) и интерферонпродукции выявить иммунологические особенности инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа.

1-ю группу ($n = 58$) составили дети с герпесвирусной инфекцией 6-го типа, тяжёлая форма. Во 2-ю группу ($n = 31$) вошли дети с герпесвирусной инфекцией 6-го типа, среднетяжёлая форма. Контрольную группу составили 53 здоровых новорождённых. Определение аллельных вариантов генов проводили методом полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом с помощью тест-систем ГосНИИ генетики (Москва) по программе, рекомендованной производителем набора.

Уровень интерферонов α и γ в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа, используя тест-системы eBioscience (США).

Среди аллельных вариантов гена интерферона γ (IFNG) у больных с тяжёлой формой герпесвирусной инфекции 6-го типа достоверно чаще, чем у детей со среднетяжёлой формой течения заболевания и в контрольной группе, обнаруживается генотип AA полиморфизма +874 гена IFNG и достоверно реже по сравнению с контрольной группой регистрируется аллель T и генотип TT.

Уровень интерферона γ достоверно снижен у детей с тяжёлой формой инфекции по сравнению с контрольной группой. Подверженность инфекции ассоциирована с аллелем A и генотипом AA полиморфного участка +874 A/T гена IFNG.

Ключевые слова: новорожденные; герпесвирусная инфекция; интерферон.

Для цитирования: Кравченко Л.В., Левкович М.А., Пятикова М.В. Роль полиморфизма гена интерферона γ и интерферонпродукции в патогенезе инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа у детей раннего возраста. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (6): 357-361. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-357-361>

Kravchenko L.V., Levkovich M.A., Pyatikova M.V.

THE ROLE OF POLYMORPHISM OF THE INTERFERON GENE γ AND INTERFERONOPRODUCTION IN THE PATHOGENESIS OF INFECTION CAUSED BY HERPES 6 TYPE VIRUS IN CHILDREN OF EARLY AGE

«Rostov State Medical University», Rostov-on-Don, Russia

Для корреспонденции: Кравченко Лариса Вахтанговна, д-р мед.наук, вед. научн.сотр. педиатрического отдела; e-mail: larakra@list.ru

The purpose of the article is to reveal the immunological features of the infection caused by the herpesvirus type 6 virus, based on the level of the polymorphism IFNG gene (+874 A / T) and interferon production.

Group I (n = 58) consisted of children with herpetic infection of type 6, severe form. Group II (n = 31) included children with herpetic infection of type 6, medium-heavy form. The control group consisted of 53 healthy newborns born. The allelic variants of the genes were determined by the PCR method followed by restriction analysis of the GosNII Genetics test systems (Moscow)

Among the allelic variants of the interferon γ gene, patients with a severe form of herpetic infection of type 6 are significantly more likely than in children with a moderate-to-severe course of the disease, and the AA genotype of the polymorphism +874 of the IFNG gene is detected in the control group and significantly less than the control group, the allele T and the TT genotype. The level of interferon- γ had a significant decrease in children with severe infection in comparison with the control group. Exposure of the infection is associated with the A allele and the AA genotype of the polymorphic region +874 A / T of the IFNG gene.

Key words: neonatal infant; herpes virus infection; interferons.

For citation: Kravchenko L.V., Levkovich M.A., Pyatikova M.V. The role of polymorphism of the interferon gene γ and interferon production in the pathogenesis of infection caused by herpes 6 type virus in children of early age. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (6): 357-361 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-357-361>

For correspondence: Kravchenko L.V., Dr.Sci. Med., lead researcher of the department of pediatric; e-mail: larakra@list.ru

Information about authors:

Kravchenko L.V. <http://orcid.org/0000-0002-0036-4926>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 22.02.2018
Accepted 14.03.2018

Вирус-ассоциированные инфекции в структуре общей статистики инфекционной заболеваемости определяют показатели высокой перинатальной заболеваемости и смертности. Герпесвирусы (*Herpes viridae*) - это большое семейство ДНК-содержащих вирусов, вызывающих разнообразные болезни у человека и других млекопитающих. Одним из них является вирус герпеса человека 6-го типа. Развитие различных клинических форм заболевания связано не только с особенностями самого вируса и его влиянием на иммунную систему, но и с генетическим полиморфизмом распознающих систем организма хозяина [1, 2]. Публикации последних лет свидетельствуют о том, что этиологическим фактором лихорадки у новорожденных с судорожным синдромом, инфекционным мононуклеозом, энцефалитом, является герпесвирус 6-го типа [3-5]. Сочетанный вариант герпесвирусной инфекции (вирус герпеса человека 6-го типа и вирус Эпштейна - Барр) может служить активатором системного воспалительного ответа [6]. Существуют исследования, подтверждающие, что при инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа, как и при других заболеваниях с персистенцией вируса, часто развиваются иммунодефицитные состояния, обусловленные недостаточностью различных звеньев иммунной системы и её неспособностью полностью элиминировать вирус из организма. Важным свойством интерферонов (ИФН) является способность препятствовать внутриклеточной репликации вирусов, активируя ответ клетки на вирусное инфицирование. ИФН запускает в клетках каскад биохимических реакций, приводящих к подавлению синтеза вирусных белков [7-9].

В последние годы перспективным направлением является поиск маркеров восприимчивости к вирусной персистенции среди аллелей генов цитокинов, в частности, роли характера распределения аллельных вариантов гена ИФН γ . Согласно последним данным, различия в генах, контролирующих защитные реакции организма, могут влиять на уровень продукции цитокинов и тем самым на характер развития и протекания иммунного ответа. Аллельный полиморфизм генов цитокинов оказывает влияние на уровень экспрессии гена и количество продукции соответствующего белка. Один из важнейших механизмов, посредством которого иммунокомпетентные клетки участвуют в защите от инфекции, вызванной вирусом герпеса, связан с продукцией ИФН γ , который обеспечивает первую линию защиты организма от вирусов [10-15]. На сегодняшний день использу-

емые в клинической практике диагностические методы неоднозначны, это следует учитывать, особенно в тех случаях, когда речь идёт о новорожденных. Необходим поиск новых подходов к лечению инфекционной патологии с учётом особенностей иммунного статуса у детей раннего возраста. Вышеизложенное открывает перспективу для решения проблемы ранней диагностики этой грозной патологии у детей первых месяцев жизни с учётом особенностей интерфероновидного статуса.

Цель работы – на основе анализа уровня полиморфизма гена IFNG ИФН γ (+874 А/Т) и интерферонпродукции выявить иммунологические особенности инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа, с учётом степени тяжести заболевания.

Материал и методы. Для решения поставленных задач на базе отделения патологии новорожденных и отделения детей грудного возраста НИИ акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России в 2014–2016 гг. было проведено комплексное проспективное рандомизированное обследование 89 детей с герпесвирусной инфекцией 6-го типа, в том числе 53 (59,6 %) ребёнка мужского и 36 (40,4%) женского пола. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией, принятой в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2000 г. (Эдинбург, Шотландия) и одобрено локальным этическим комитетом НИИ акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России. Пациенты включались в исследование, если при поступлении в отделения соответствовали следующим критериям: имели инфекцию, вызванную вирусом герпеса 6-го типа; гестационный возраст ≥ 35 нед; массу при рождении не менее 2000 г; при поступлении не имели клинических признаков бактериального инфицирования.

Пациенты не включались в исследование в случае подтвержденного сложного порока сердца, подозреваемой или подтвержденной хромосомной аномалии или генетической аберрации.

При обследовании детей использовали общепринятые методы: сбор анамнеза, жалоб, осмотр, лабораторные исследования. Всем наблюдавшимся детям проводили иммуноферментный анализ (ИФА) крови, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) мочи и крови на вирус герпеса 6-го типа.

Формирование клинических групп проведено по степени

Таблица 1

Клинические проявления соматических заболеваний

Клиническая симптоматика соматической патологии	Герпесвирусная инфекция 6-го типа, тяжёлая форма, 1-я группа, n = 58		Герпесвирусная инфекция 6-го типа, среднетяжелая форма, 2-я группа, n = 31		p
	абс.	%	абс.	%	
Иктеричность кожи и слизистых	15	25,9	9	29	< 0,47
Гипотрофия	27*	46	4	13	< 0,001
Гепатомегалия	25*	43	5	16	< 0,008
Спленомегалия	10*	17	1	3	< 0,05
Гипертермия	10*	17	1	3	< 0,05
Лимфаденит	2	3	2	6	< 0,43
Аллергический дерматит	5	9	3	10	< 0,57

Примечание. * – $p < 0,05$ достоверность различий между 1-й и 2-й группами

Таблица 2

Клинические проявления патологии ЦНС

Клиническая симптоматика патологии ЦНС	Герпесвирусная инфекция 6-го типа, тяжёлая форма, 1-я группа, n = 58		Герпетическая инфекция 6-го типа, среднетяжелая форма, 2-я группа, n = 31		p
	абс.	%	абс.	%	
Признаки сосудистой дезадаптации	39	67	18	58	< 0,26
Мышечный гипертонус	33	57	21	68	< 0,22
Мышечный гипотонус	19*	33	4	13	< 0,03
Тремор	32	55	14	45	< 0,25
Синдром угнетения	17	29	6	19	< 0,22
Синдром возбуждения	23	40	12	39	< 0,56
Судорожный синдром	8	14	2	6	< 0,25
Гипертензионно-гидроцефальный синдром	8	14	4	13	< 0,59

изучали роль полиморфизма гена IFNG ИФН γ и интерферонпродукции для уточнения механизмов формирования указанной патологии и выявления прогностических маркёров тяжёлых форм заболевания.

Данные табл. 3 свидетельствуют о том, что среди аллельных вариантов гена IFNG ИФН γ у больных с тяжёлой формой герпесвирусной инфекции 6-го типа достоверно чаще ($p < 0,006$), чем у детей со среднетяжёлой формой течения заболевания, и в контрольной группе ($p < 0,000002$) обнаруживается генотип AA полиморфизма +874 гена IFNG и достоверно реже по сравнению с контрольной группой регистрируются аллель Т ($p < 0,0000007$) и генотип ТТ ($p < 0,0006$).

У детей со среднетяжёлой формой герпесвирусной инфекции 6-го типа не отмечено усиления с данным полиморфизмом гена IFNG, о чем свидетельствует низкая частота встречаемости генотипа AA и аллеля А. В то же время частота встречаемости генотипа ТТ у этой группы больных не отличается от таковой в контрольной группе.

В контрольной группе пациентов выявлена достоверно более высокая вероятность носительства аллели Т по сравнению с детьми с герпесвирусной инфекцией 6-го типа ($p < 0,0000007$ – 1-я группа; $p < 0,00001$ – 2-я группа) и генотипа ТТ ($p < 0,0006$) по сравнению с 1-й группой, в которой зарегистрирована тяжёлая форма герпесвирусной инфекции

тяжести заболевания, наличию маркёров герпесвирусной инфекции 6-го типа.

В 1-ю группу ($n = 58$) вошли дети с герпесвирусной инфекцией 6-го типа в тяжёлой форме, 2-ю группу ($n = 31$) составили дети с герпесвирусной инфекцией 6-го типа в среднетяжёлой форме. В контрольной группе было 53 здоровых новорождённых, родившихся у женщин с физиологическим течением беременности и родов.

В процессе выполнения работы клинико-иммунологическое обследование детей с герпесвирусной инфекцией 6-го типа проводилось в неонатальном периоде. У детей контрольной группы обследование проводилось однократно в неонатальном периоде.

Критериями постановки диагноза герпесвирусной инфекции 6-го типа явились клинические признаки инфекции, обнаружение ДНК вируса герпеса 6-го типа в лейкоцитах и моче в динамике, наличие специфических IgG антител к вирусу герпеса 6-го типа выше диагностических значений у обследуемого контингента детей. Для выявления ДНК вируса герпеса 6-го типа (HSVVI) использовали метод ПЦР. Материалом для исследования служили периферическая кровь и моча.

Определение аллельных вариантов генов проводили методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом тест-системами ГосНИИ генетика (Москва) по программе, рекомендованной производителем набора.

Уровень ИФН α и ИФН γ в сыворотке крови определяли методом ИФА тест-системами eBioscience (США).

Методы статистического анализа. Для формирования базы данных и при проведении статистического исследования эмпирических данных использовались возможности табличного процессора Excel 2003 и пакетов прикладных программ («Мегастат» и Statistica 6.0). При определении статистической обоснованности различия групп обследуемых применялся критерий Манна–Уитни для независимых групп и критерий Вилкоксона для зависимых групп при максимально допустимом уровне ошибки первого рода $p = 0,05$. Показатели описательной статистики представлены в виде выборочной средней и стандартного отклонения. Для анализа различия частот в двух независимых группах применялся точный критерий Фишера–Ирвина. С целью оценки точности, чувствительности и специфичности полученного правила использовали возможности табличного процессора Excel 2003.

Результаты. У обследованных детей были выделены и проанализированы клинические симптомы соматической патологии (табл. 1). Иктеричность кожи и слизистых, лимфаденит, аллергическая сыпь с одинаковой частотой отмечались в 1-й и 2-й группах. Гепатомегалия и спленомегалия встречались в достоверно большем количестве случаев в группе тяжёлого течения инфекции. Гипотрофия достоверно чаще отмечалась в группе тяжёлого течения заболевания.

Гипертермия, как один из симптомов инфекционного процесса, достоверно чаще отмечалась в группе тяжёлого течения заболевания.

При анализе клинических симптомов патологии центральной нервной системы (ЦНС) в группах тяжёлого и среднетяжёлого течения с одинаковой частотой встречались симптомы сосудистой дезадаптации (акроцианоз, периоральный цианоз, «мраморный» рисунок кожи), синдром мышечной гипертонии, тремор, гипертензионно-гидроцефальный синдром (табл. 2). Снижение мышечного тонуса достоверно чаще отмечалось в группе тяжёлого течения герпесвирусной инфекции 6-го типа. Синдром угнетения ЦНС, судорожный синдром отмечались в большем количестве случаев в группе тяжёлого течения герпесвирусной инфекции 6-го типа, что, однако, не имело статистически достоверного подтверждения.

Учитывая выявленные особенности клинического течения герпесвирусной инфекции 6-го типа у новорождённых,

Таблица 3

Распределение аллелей и генотипов на основе анализа полиморфизма гена IFNG ИФНγ (+874 А/Т) у детей, инфицированных герпесвирусом 6-го типа

Показатель		Герпесвирусная инфекция 6-го типа, тяжёлая форма, 1-я группа	Герпесвирусная инфекция 6-го типа, среднетяжёлая форма, 2-я группа	Контрольная группа	<i>p</i> (1-я группа и контроль)	<i>p</i> (2-я группа и контроль)	<i>p</i> (1-я и 2-я группы)
Количество обследованных		<i>n</i> = 31	<i>n</i> = 13	<i>n</i> = 59			
IFNG (+874 А/Т)	Генотипы	А-А	19 (61%)	2 (15%)	5 (8,5%)	< 0,000002	< 0,4
		Т-А	10 (32%)	6 (46%)	32 (54%)	< 0,47	< 0,3
		Т-Т	2 (7%)	5 (38%)	23 (38%)	< 0,0006	< 0,6
	Аллели	Аллель А	48	10	42	< 0,0003	< 0,48
		Аллель Т	14	16	55	< 0,0000007	< 0,00001

Таблица 4

Уровень интерферонпродукции у детей с инфекцией, вызванной вирусом герпеса 6-го типа, с учётом выраженности симптомов заболевания на 1-м месяце жизни

Параметры	1-я группа (тяжёлая форма инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа) <i>n</i> = 58	2-я группа (среднетяжёлая форма инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа) <i>n</i> = 31	Группа контроля <i>n</i> = 53
ИФН α , нг/мл	3,05 (2,8-3,21)*	3,0 (2,37-3,12) *	3,95 (3,4-5,3)
ИФН γ , нг/мл	0,8 (0,6-0,9) *	0,91 (0,79-1,31)	1,04 (0,95-1,5)

Примечание. * – *p* < 0,05, достоверность различий с контролем.

6-го типа.

Проведён анализ уровня цитокинов в сыворотке крови в зависимости от формы заболевания и возраста детей. Полученные данные представлены в табл. 4. Было выявлено достоверное снижение уровня ИФН α в 1-й группе при сравнении с группой контроля в возрасте 1 мес. Аналогичная картина отмечалась при сравнении группы со среднетяжёлой формой герпесвирусной инфекции 6-го типа с группой контроля.

Уровень ИФН γ имел достоверное снижение у детей с тяжёлой формой инфекции по сравнению с контрольной группой, при том, что в группе детей со среднетяжёлой формой заболевания уровень ИФН γ не имел существенного отличия от контрольных значений.

Обсуждение. Необходимо отметить, что выявленный полиморфизм гена IFNG, а именно, гомозиготный вариант АА полиморфного участка 874 гена IFNG, при герпесвирусной инфекции 6-го типа ассоциирован лишь с тяжёлой формой заболевания, что не регистрируется при среднетяжёлой форме данной патологии.

Продукция ИФН α и ИФН γ у детей, инфицированных вирусом герпеса 6-го типа, имеет значительно выраженное снижение уровня данных показателей по сравнению с контрольной группой. Такие изменения в иммунном статусе неизбежно приводят к значительно более низкому ответу на внедрение вирусного агента в клетку. Происходит недостаточная активация специфического противовирусного ответа, что в дальнейшем может быть одним из факторов развития тяжёлой формы заболевания, хронизации вирусной инфекции или длительной её персистенции. Необходимо отметить, что уровень ИФН γ в группе со среднетяжёлой формой инфекции не отличался от группы контроля в динамике. Снижение продукции ИФН α и ИФН γ , которое может быть и причиной и следствием острых и хронических вирусных заболеваний, свидетельствует о врождённом или приобретённом дефиците системы интерферонов и может рассматриваться как показание для длительной интерферон-заместительной терапии.

Проведённый анализ иммунных механизмов защиты организма ребенка при среднетяжёлой форме инфекции,

вызванной вирусом герпеса 6-го типа, показал, что они характеризуются более высокой продукцией ИФН γ , сопоставимой со значениями этих параметров у контрольной группы пациентов, что свидетельствует о своевременном включении системы интерферона в процесс противовирусной защиты. Полученные данные свидетельствуют о том, что у новорождённых с тяжёлой формой инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа, основная роль в патогенезе развития заболевания принадлежит сниженному уровню продукции ИФН γ .

Выводы

1. Подверженность инфекции ассоциирована с аллелем А и генотипом АА полиморфного участка +874 А/Т гена IFNG. Иммуногенетическим фактором, обладающим протективным эффектом в отношении подверженности вирусной инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа, является аллель Т и генотип ТТ полиморфизма +874 А/Т гена NG.

2. У новорождённых с тяжёлой формой инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа, основная роль в патогенезе развития заболевания принадлежит сниженному уровню продукции ИФН γ .

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4-5 см. REFERENCES)

1. Боковой А.Г., Ковалев И.В., Маккавеева Л.Ф., Володина О.В., Танина Н.Б., Полякова Ю.В. и др. Возможности современной диагностики герпесвирусных инфекций у детей. *Детские инфекции*. 2013; 12(2): 8-11.
2. Мелехина Е.В., Музыка А.Д., Калугина М.Ю. Современные представления об инфекции, вызванной вирусом герпеса 6 типа. *Архивъ внутренней медицины*. 2016; 27 (1): 13-9.
3. Крамарь Л.В., Карпухина О.А., Крамарь О.Г. Герпетическая инфекция человека 6 типа: эпидемиология, клинические проявления, современные критерии диагностики. *Лечение и профилактика*. 2014; 12 (4): 53-63.
4. Фаткуллина Г.Р., Анохин В.А., Джафарова А.Н. Диссеминированные герпетические инфекции у детей на современном этапе. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2015; 5: 174-7.
5. Никольский М.А. Инфекция, вызванная ВГЧ-6, у детей: современное состояние проблемы. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2008; 2: 93-8.
6. Кушнарева М.В., Т.В. Виноградова, Е.С. Кешисьян, В.В. Парфенов, В.Д. Кольцов, Г.С. Брагина и др. Особенности иммунного статуса и системы интерферона у детей раннего возраста. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2016; 3: 12-9.
7. Ершов Ф.И., Киселев О.И. *Интерфероны и их индукторы*. М.: ГЭОТАР; 2005.
8. Гулиев Н.Д., Рагимова Н.Д. Полиморфизм генов цитокинов у новорождённых с внутриутробными инфекциями. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2015; 6: 42-7.
9. Долгих Т.И., Белкова Т.Н., Тирская Ю.И., Нестеренко Э.В., Власенко Н.Ю., Шелев М.В. Клинико-иммунологические аспекты внутриутробных инфекций с поражением центральной нервной системы у новорождённых. *Цитокины и воспаление* 2011; 1: 12-7.
10. Хантов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. *Иммунология. Нормы и патология*. М.: Медицина; 2010.

13. Кравченко Л.В., Пятикова М.В., Левкович М.А. Роль цитокинов и их рецепторов в патогенезе инфекции, вызванной вирусом герпеса 6 типа у детей первого месяца жизни. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 1(1): 113-4.
14. Демидова М.В., Кравченко Л.В., Левкович М.А., Афонин А.А. Современное состояние проблемы герпесвирусной инфекции 6 типа у детей. *Детские инфекции*. 2013; 3: 20-3.
15. Кравченко Л.В., Афонин А.А., Демидова М.В. Нарушение иммунной системы при герпесвирусной инфекции. *Детские инфекции*. 2012; 1(11): 33-7.

REFERENCES

1. Bokovoy A.G., Kovalev I. V., Makkaveeva L. F., Volodina O. V., Tanina N. B., Polyakova Yu. V., et al. The Possibilities of Modern Diagnostics of Herpesvirus Infections in Children. *Detskie infektsii*. 2013; 12(2): 8-11. (in Russian)
2. Melehin I. E. V., Muzyka A. D., Kalugina M. Ju., Gorelov A. V., Chugunova O. L. Current concert of human Herpesvirus type 6 infection. *Arhivъ vnutrenney meditsiny*. 2016; 27 (1): 13-9. (in Russian)
3. Kramar L. V., Karpuhina O. A., Kramar O. G. Human herpetic infection of the 6-th type: epidemiology, clinical signs, modern criteria of diagnostics. *Lechenie i profilaktika*. 2014; 12 (4): 53-63. (in Russian)
4. Agut H., Bonnafous P., Gautheret-Deiean A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. *Clin. Microbiol. Rev*. 2015; 28(2): 313-35.
5. Taspinar M., Cetin N., Gerceker D. HHV-6 is ubiquitously found using Western blot in tonsils and adenoid tissues of healthy people. *Microbiologica*. 2013; 36(3): 251-6.
6. Fatkullina G. R., Anokhin V. A., Jafarova A. N. Disseminated herpetic infections in children at the present stage. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2015; 5: 174-7. (in Russian)
7. Nikolsky M. A. Type 6 human herpesvirus infection in children: state of the art. *Vestnik perinatologii i pediatrii*. 2008; 2: 93-8. (in Russian)
8. Kuchnareva M. V., Vinogradova T. V., Keshishian, Pargenon V. V., Kotlov V. D., Bragina G. S. Specific features of the immune status and interferon system of infants. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2016; 3: 12-9. (in Russian)
9. Ershov F. I., Kiselev O. I. Interferons and their inducers [Interferony i ikh induktory]. Moscow: GEOTAR; 2005. (in Russian)
10. Guliyev N. D., Ragimova N. D. Polymorphism of cytokine genes in newborns with intra uterine infections. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2015; 6: 42-7. (in Russian)
11. Dolgikh T. I., Belkova T. N., Tirskaia Yu. I., Nesterenko E. V., Vlasenko N. Yu., Shelev M. V. Clinical and immunological aspects of intrauterine infections with central nervous system damage in neonates. *Tsitokiny i vospalenie*. 2011; 1: 12-7. (in Russian)
12. Khaitov R. M., Ignatieva G. A., Sidorovich I. G. *Immunology. Norm and pathology [Immunologiya. Norma i patologiya]*. Moscow: Meditsina; 2010. (in Russian)
13. Kravchenko L. V., Pyatikova M. V., Levkovich M. A. The role of cytokines and their receptors in the pathogenesis of infection caused by the herpes simplex virus type 6 in children of the first month of life. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2015; 1(1): 113-4. (in Russian)
14. Demidova M. V., Kravchenko L. V., Levkovich M. A., Afonin A. A. Current State of Herpes Virus Type 6 in Children. *Detskie infektsii*. 2013; 3: 20-3. (in Russian)
15. Kravchenko L. V., Afonin A. A., Demidova M. V. Infringements of Immune System at Herpes Virus Infection. *Detskie infektsii*. 2012; 1(11): 33-7. (in Russian)

Поступила 22.02.18

Принята к печати 14.03.18

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 618.145-002.1-07:616.15

Агарков Н.М.¹, Головченко О.В.², Блинков Ю.А.³, Кулабухов А.С.³, Яковлев С.А.³, Будник И.В.¹, Афанасова Е.П.⁴

ДИАГНОСТИКА ОСТРОГО ЭНДОМЕТРИТА ПО ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ И С УЧЁТОМ ДИСКРИМИНАНТНЫХ МОДЕЛЕЙ

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

² Перинатальный центр ОГБУЗ «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа» 308007, Белгород, Россия;

³ ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» 305041, Курск, Россия;

⁴ ГБУЗ «Ессентукский родильный дом» 357635, г. Ессентуки, Россия

Диагностика острого эндометрита, несмотря на достижения современной медицины, из-за преобладания стёртых форм остаётся сложной. Цель исследования заключается в улучшении диагностики острого эндометрита по информативным показателям периферической крови и дискриминантным моделям. У 154 больных с послеродовым острым эндометритом и 103 пациентов с неосложнённым послеродовым периодом изучены показатели общего анализа крови с оценкой информативности, с построением корреляционных и дискриминантных моделей.

На основе математических моделей установлена высокая диагностическая значимость палочкоядерных нейтрофилов, скорости оседания эритроцитов. Данные показатели крови имеют наибольшее число достоверных корреляционных связей с другими форменными элементами. Развитие острого эндометрита сопровождается увеличением числа репрезентативных корреляционных связей между показателями крови. Дискриминантные модели безошибочно диагностируют острый эндометрит в 86,7–87,4% случаев по информативным показателям общего анализа крови.

Ключевые слова: острый эндометрит; диагностика; гематологические показатели; дискриминантные модели.

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

Для цитирования: Агарков Н.М., Головченко О.В., Блинков Ю.А., Кулабухов А.С., Яковлев С.А., Будник И.В., Афанасова Е.П. Диагностика острого эндометрита по гематологическим показателям и с учетом дискриминантных моделей. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (6): 361-364. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-361-364>

Agarkov N.M.¹, Golovchenko O.V.², Blinkov Y.A.³, Kulabukhov A.S., Yakovlev S.A.³, Budnik I.V.¹, Afanasova E.P.⁴
DIAGNOSIS OF ACUTE ENDOMETRITIS ON HEMATOLOGIC INDICATORS, AND GIVEN DISCRIMINANT MODELS

¹ FGBOU VPO "Southwest state University" 305040, Kursk, Russia;

² Perinatal center of OGBUZ "Belgorod regional clinical hospital of Prelate Ioasafa" 308007, Belgorod, Russia;

³ FGBOU VO "Kursk state medical University", 305041, Kursk, Russia;

⁴ GBUZ "Maternity hospital Essentuki" 357635, Yessentuki, Russia

Diagnosis of acute endometritis, despite advances in modern medicine due to the prevalence of erased forms remains difficult. The purpose of the study is to improve the diagnosis of acute endometritis by informative indicators of peripheral blood and discriminant models. In 154 patients with acute postpartum endometritis and 103 patients with uncomplicated post-Natal period studied, the indicators of General blood analysis with the assessment of informativeness, with the construction of the correlation and discriminant models. On the basis of mathematical models has high diagnostic significance of band neutrophils, erythrocyte sedimentation rate. These blood parameters have the largest number of reliable correlations with the other formed elements. The development of acute endometritis is accompanied by an increase in the number of representative correlations between blood parameters. The discriminant model accurately diagnose acute endometritis in to 86.7-87.4%, other cases are informative indicators of the General analysis of blood.

Key words: acute endometritis; diagnosis; hematological parameters; discriminant models.

For citation: Agarkov N.M., Golovchenko O.V., Blinkov Y.A., Kulabukhov A.S., Yakovlev S.A., Budnik I.V., Afanasova E.P. Diagnosis of acute endometritis on hematologic indicators, and given discriminant models. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (6): 361-364 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-361-364>

For correspondence: Agarkov N.M., Dr. Med. Sci. Professor in the department of bio-medical engineering, Southwest state University; e-mail: vitalaxen@mail.ru

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 15.01.2018
Accepted 10.04.2018

Введение. Совершенствование методов диагностики, профилактики и лечения в акушерско-гинекологической службе не привело к резкому уменьшению частоты острого эндометрита (ОЭ), количество послеродовых воспалительных осложнений остаётся достаточно высоким (5–26%) и не имеет отчётливой тенденции к снижению [1–5].

В этих условиях поиск и внедрение новых перспективных методов лабораторной диагностики ОЭ является актуальным. Особое значение приобретает реализация лабораторных методов с объективизацией полученных данных методами математической статистики или на основе компьютерных технологий [6–8]. В диагностике и дифференциации ОЭ гематологические показатели используются практически всегда, но их информативность, сопряжённость между собой и дифференциально-диагностические характеристики остаются малоизученными.

Цель исследования заключается в улучшении диагностики ОЭ по информативным показателям периферической крови и дискриминантным моделям.

Материал и методы. В клинических условиях обследовано 154 больных с послеродовым ОЭ, составивших основную группу, и 103 пациентки с неосложнённым послеродовым периодом (контроль). Подсчёт форменных элементов крови проводился на автоматическом гематологическом анализаторе Quintus.

Информативность параметров крови рассчитывалась по формуле:

$$J = 10 \lg(P_1/P_2) \times 0,5 \times (P_1 - P_2),$$

где J – информативность показателя крови, P_1 – распространённость отклонений показателя крови в контрольной группе, P_2 – распространённость отклонений данного показателя у больных ОЭ. Определение коэффициентов корреляции Пирсона проводилось с использованием прикладного пакета Statistica 6.0. С применением данной программы вы-

полнялся и дискриминантный анализ. Оценка достоверности проводилась на основе критерия Т-Уайта.

Результаты и обсуждение. Развитие ОЭ вызывает определённые отклонения гематологических параметров (табл. 1). Установлены изменения как параметров красной крови, так и показателей белой крови. В частности, у пациенток основной группы достоверно снижается содержание гемоглобина и эритроцитов. Одновременно произошло значительное увеличение количества лейкоцитов, палочкоядерных нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов ($p < 0,01$). Существенно при развитии ОЭ повысилась СОЭ ($p < 0,001$). Напротив, удельный вес лимфоцитов репрезентативно снизился. Содержание эозинофилов в периферической крови достоверно уменьшилось. Не произошло значимых отклонений в содержании тромбоцитов и моноцитов ($p > 0,05$).

При исследовании общего анализа крови на 4-е сутки количество лейкоцитов составило $10,6 \pm 0,7 \times 10^9/\text{л}$. Средний уровень лейкоцитов в периферической крови, согласно другим исследованиям [3, 9, 10], у больных ОЭ изменяется от $13,2 \times 10^9/\text{л}$ до $15,0 \times 10^9/\text{л}$. Лейкоцитарная формула выглядела следующим образом: эозинофилов – $0,9 \pm 0,2\%$, палочкоядерных нейтрофилов – $3,5 \pm 0,3\%$, сегментоядерных – $71,6 \pm 0,9\%$, лимфоцитов – $20,2 \pm 1\%$, моноцитов – $3,9 \pm 0,3\%$. Эти показатели достоверно не отличались от таковых при неосложнённом течении послеродового периода. Исключение составила СОЭ, которая была достоверно ниже при физиологическом течении пуэрперального периода, чем при эндометрите, но её колебания составили в контрольной группе от 10 до 48 мм/ч, во основной от 17 до 58 мм/ч. Следовательно, количество лейкоцитов и СОЭ являются дополнительными критериями для прогнозирования послеродового эндометрита [11].

Частота встречаемости патологических отклонений среди рассмотренных показателей крови достаточно высокая для СОЭ и повышения палочкоядерных нейтрофилов (табл. 2).

Таблица 1

Изменения общего анализа крови у больных с ОЭ ($M \pm m$)

Параметр крови, единица измерения	Основная группа	Контрольная группа
Гемоглобин, г/л	112,1 $\pm$ 2,1*	127,2 $\pm$ 1,8*
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	3,6 $\pm$ 0,5*	4,8 $\pm$ 0,3*
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	10,8 $\pm$ 0,5*	6,1 $\pm$ 0,3*
Палочкоядерные, %	7,1 $\pm$ 0,2*	1,3 $\pm$ 0,1*
Сегментоядерные, %	64,5 $\pm$ 2,1*	50,4 $\pm$ 2,0*
Лимфоциты, %	19,4 $\pm$ 1,3*	35,6 $\pm$ 1,5*
Моноциты, %	6,7 $\pm$ 0,4	7,2 $\pm$ 0,2
Эозинофилы, %	2,3 $\pm$ 0,5*	5,5 $\pm$ 0,4*
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	3,7 $\pm$ 0,6	4,2 $\pm$ 0,3
СОЭ, мм/час	23,5 $\pm$ 1,9*	8,2 $\pm$ 1,7*

Примечание. * – статистически значимая разница по отношению к контролю.

Значительный процент отклонений среди гематологических показателей приходится на повышение лейкоцитов свыше $9,5 \times 10^9/л$, сегментоядерных нейтрофилов более 55% и снижение лимфоцитов менее 25%. Максимальная величина информативности в данной группе параметров соответствует СОЭ.

На второй позиции по величине информативности находятся палочкоядерные нейтрофилы. Близкие по значению меры информативности установлены для лейкоцитов, сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов. Очень низкая информативность отмечается для эозинофилов и тромбоцитов.

Изменение параметров крови вследствие ОЭ сопровождается различием степени сопряженности данных показателей по отношению к контрольной группе (рис. 1). Корреляционная модель гематологических показателей у больных ОЭ представлена преимущественно выраженной сопряженностью палочкоядерных нейтрофилов и СОЭ. При этом наибольшее число достоверных корреляционных связей выявлено для палочкоядерных нейтрофилов, имеющих три прямые связи, одну криволинейную связь с эозинофилами и одну обратную связь с лимфоцитами. В прямой зависимости палочкоядерные нейтрофилы находятся с лейкоцитами, сегментоядерными нейтрофилами и СОЭ. В контроле палочкоядерные нейтрофилы имели две прямые связи. При остром эндометрите повысилась сопряженность СОЭ с форменными элементами крови, представленная тре-

Таблица 2

Частота отклонений и информативность параметров общего анализа крови при ОЭ

Параметры крови, единица измерения	Частота отклонений		Информативность
	основная группа	контрольная группа	
Гемоглобин ниже 118,0 г/л	13,8 $\pm$ 2,8	4,0 $\pm$ 1,9	26,4
Эритроциты менее 3,6 $\times 10^{12}/л$	12,5 $\pm$ 2,7	3,9 $\pm$ 1,9	21,8
Лейкоциты более 9,5 $\times 10^9/л$	29,3 $\pm$ 3,7	2,3 $\pm$ 1,5	149,2
Палочкоядерные более 4,0%	35,3 $\pm$ 3,9	1,1 $\pm$ 1,0	257,6
Сегментоядерные более 55,0 %	26,4 $\pm$ 3,6	1,5 $\pm$ 1,2	155,1
Лимфоциты менее 25,0 %	27,8 $\pm$ 3,6	1,7 $\pm$ 1,3	158,3
Моноциты менее 5,0 %	3,2 $\pm$ 1,4	0,4 $\pm$ 0,6	12,6
Эозинофилы менее 3,0 %	2,1 $\pm$ 1,2	1,2 $\pm$ 1,1	1,1
Тромбоциты менее 4,0 $\times 10^9/л$	3,5 $\pm$ 1,5	2,7 $\pm$ 1,6	0,5
СОЭ более 15,0 мм/час	45,2 $\pm$ 4,0	1,1 $\pm$ 1,0	355,8

мя прямыми и одной криволинейной достоверной связью. Отмечается также усиление сопряженности лейкоцитов, лимфоцитов с другими гематологическими показателями. Корреляционный метод показывает важное диагностическое значение палочкоядерных нейтрофилов, лимфоцитов, СОЭ и лейкоцитов.

Среди параметров общего анализа периферической крови для создания классификационных моделей применялись СОЭ, палочкоядерные нейтрофилы и лейкоциты. Рассчитав коэффициенты классификационных функций и константы для рассматриваемых классов, посредством дискриминантного метода синтезировали необходимые модели. Математическая модель для больных без ОЭ описывается уравнением:

$$y_5 = 19,547x_6 + 121,582x_7 + 24,386x_8 - 382,596,$$

где y_5 – больные без ОЭ, x_6 – СОЭ, x_7 – палочкоядерные нейтрофилы, x_8 – лейкоциты.

Для больных ОЭ по данным параметрам общего анализа крови математическая модель имеет вид:

$$y_6 = 15,298x_6 + 52,354x_7 + 36,187x_8 - 201,578,$$

где x_6 – x_8 – ранее указанные информативные параметры общего анализа периферической крови.

Математические модели, включающие информативные показатели общего анализа крови, позволяют на необходимом уровне провести дифференциацию представителей первого и второго класса (табл. 3).

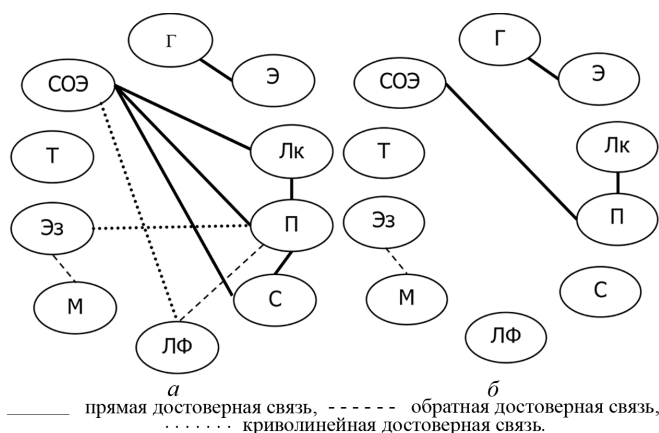
Количество пациентов без ОЭ, ошибочно классифицированных как больные ОЭ по данным моделям, составило 13,2%. При выполнении классификации пациентов с ОЭ ошибочно отнесено к первому классу 12,6%. Построенные модели являются адекватными и улучшают диагностику ОЭ по СОЭ, содержанию палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитов крови.

Проведенная диагностика ОЭ с применением кластерного анализа в выбранном пространстве признаков позволила выявить два случая из семи случаев легкой формы заболевания как среднетяжелые, а четыре из шести случаев послеро-

Таблица 3

Классификация больных ОЭ и без данной патологии по информативным показателям общего анализа крови

Код признака	Observed	G_1:0	G_2:1
1	G_1:0	3,589	3915,527
2	G_1:0	0,847	3727,828
3	G_1:0	1,724	3529,809
4	G_1:0	2,378	3521,418
5	G_1:0	1,545	3977,821
6	G_1:0	0,217	3721,686
7	G_1:0	1,319	3834,564
8	G_1:0	1,859	3862,575
9	G_1:0	1,162	3652,883
10	G_1:0	0,548	3687,149
11	G_2:1	3739,235	4,899
12	G_2:1	3743,762	2,873
13	G_2:1	3741,258	0,492
14	G_2:1	3657,742	0,018
15	G_2:1	3645,408	0,427
16	G_2:1	3678,664	0,918
17	G_2:1	3587,469	3,819
18	G_2:1	3914,042	4,327



Корреляционные модели показателей периферической крови в основной (а) и контрольной группах (б).

Г - гемоглобин, Э - эритроциты, Лк - лейкоциты, П - палочкоядерные, С - сегментоядерные, Лф - лимфоциты, М - моноциты, Эз - эозинофилы, Т - тромбоциты, СОЭ - скорость оседания эритроцитов.

догового ОЭ в среднетяжелой форме как тяжёлые [6].

С помощью дифференциального кластерного метода удалось достаточно надёжно диагностировать лёгкую и среднюю форму заболевания, которые хотя и образуют широкие, частично перекрывающиеся кластеры, но их размеры примерно одинаковы. Эффективность диагностики с помощью кластерного анализа составила 85,7, 83,3 и 78,9% соответственно для лёгкой, средней и тяжёлой формы послеродового ОЭ [6].

Разработанные авторами [6] математические модели позволяют определить граничные значения количества информации для ОЭ и для каждой его формы.

Заключение. Ведущими информативными показателями периферической крови для диагностики ОЭ являются палочкоядерные нейтрофилы и СОЭ. Высокая информативность названных параметров крови объективизирована мерой информативности, корреляционным методом. При последнем установлено наибольшее количество достоверных корреляционных связей для СОЭ, палочкоядерных нейтрофилов с другими форменными элементами крови. Количество репрезентативных корреляционных связей при ОЭ выше, чем у здоровых женщин. Синтезированные дискриминантные модели по информативным показателям общего анализа крови обеспечивают безошибочную дифференциацию больных ОЭ в 86,8–87,4% случаев и, следовательно, улучшают диагностику данной патологии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4, 5 см. REFERENCES)

- Агарков Н.М., Аксёнов В.В., Иванов А.В., Иванов В.А., Кича Д.И., Субботина Т.И. Диагностическая значимость и кластеризация параметров системного гуморального иммунитета при остром эндометрите. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (12): 750-3.
- Анохова Л.И., Патеюк А.В., Белокриницкая А.В., Загородная Э.Д. Сравнительное действие ронколейкина и генферона на некоторые показатели иммунитета и гемостаза при развитии эндометрита после кесарева сечения. *Медицина в Казбасе*. 2013; 1: 49 – 54.

- Новикова Е.Н., Коба И.С. Новый пробиотический препарат «Гипролам» для профилактики послеродового эндометрита. *Вестник АПК Ставрополя*. 2013; 2(10): 219 – 21.
- Битюкова В.В., Сидоренко Е.А., Гуртовой Б.Л. Построение двухступенчатой автоматизированной системы диагностики эндометрита. *Вестник ТГТУ*. 2013; 9 (3): 423-9.
- Агарков Н.М., Макконен К.Ф., Аксёнов В.В., Яковлев А.П., Луценко В.Д. Использование метода проточной цитометрии и диагностически значимых показателей системного клеточного иммунитета для диагностики острого эндометрита. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (9): 563-7.
- Каграманова Ж.А., Малиновская В.В., Выжлова Е.Н., Ланшакова П.Е. Новые направления в диагностике и лечении эндометрита. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2016; 1: 64-77.
- Чернуха Е.А. Нормальный и патологический послеродовой период. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2006.
- Черненко М.Л., Тетелютина Ф.К., Виноходова Е.М., Леднева А.В., Стяжкина С.Н., Султанова М.В., Пахомова И.А. Эффективная терапия в комплексном лечении послеродового эндометрита. *Фундаментальные исследования*. 2013; 9: 1164 – 7.
- Тузлуков И.И., Коваленко М.С., Наумова Н.В. Особенности течения и методы прогнозирования послеродового эндометрита. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2015; 1: 149-54.

REFERENCES

- Agarkov N.M., Aksyonov V.V., Ivanov A.V., Ivanov V.A., Kicha D.I., Subbotina T.I. Diagnostic significance and clustering parameters, the system of humoralimmu-Niceta in acute endometritis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62 (12): 750-3. (in Russian)
- Anokhova L.I., Pateyuk A.V., Belokrinickaya A.V., Zagorodnaya Je.D. Comparative effects of treatment with Roncoleukin and genferon on some indicators of immunity and hemostasis during the development of endometritis after cesarean section. *Meditina v Kuzbasse*. 2013; 1: 49 – 54. (in Russian)
- Novikova E.N., Koba I.S. New probiotic preparation “Giprobum” for the prevention of postpartum endometritis. *Vestnik APK Stavropol'ya*. 2013; 2(10): 219 – 21. (in Russian)
- Giraldo-Isaza M.A., Jaspan D., Cohen A.W. Postpartum endometritis caused by herpes and cytomegaloviruses. *Obstet. Gynecol.* 2011; 117(2): 466-7.
- Kasius J.C., Broekmans F.J., Sie-Go D.M., Bourgain C., Eijkemans M.J., Fauser B.C., Devroey P., Fatemi H.M. The reliability of the histological diagnosis of endometritis in asymptomatic IVF cases: a multicenter observer study. *Hum. Reprod.* 2012; 27(1): 153-8.
- Bitjukova V.V., Sidorenko E.A., Gurtovoy B.L. Build a two-stage automated system for the diagnosis of endometritis. *Vestnik TGTU*. 2013; 9 (3): 423-9. (in Russian)
- Agarkov N.M., Makkonen K.F., Aksyonov V.V., Yakovlev A.P., Lutsenko V.D. Using the method of flow cytometry and diagnostically significant indicators of systemic cellular immunity for the diagnosis of acute endometritis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62 (9): 563-7. (in Russian)
- Kagramanova Zh.A., Malinovskaya V.V., Vyzhlova E.N., Lashakova P.E. New directions in the diagnosis and treatment of endometritis. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2016; 1: 64-77. (in Russian)
- Chernuha E.A. Normal and pathological postpartum period [Normal'ny I patologicheskiy poslerodovoy period]. Moscow : GeOTAR-Media; 2006. (in Russian)
- Chernenkova M.L., Tetelyutina F.K., Vinokhodova E.M., Ledneva A.V., Styazhkina S.N., Sultanova M.V., Pakhomova I.A. Efferent therapy in the complex treatment of postpartum endometritis. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013; 9: 1164 – 7. (in Russian)
- Tuzlukov I.I., Kovalenko M.S., Naumova N.V. Features of the course and methods of prediction of postpartum endometritis. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2015; 1: 149-54. (in Russian)

Поступила 15.01.18

Принята к печати 10.04.18

ЦИТОЛОГИЯ

© ЗАХАРОВА Н.М., ВЕТЧИННИКОВА О.Н., 2018

УДК 616-091-02-076.5

Захарова Н.М.¹, Ветчинникова О.Н.²

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПАТОМОРФОЗ В ПРАКТИКЕ КЛИНИЧЕСКОГО ЦИТОЛОГА

¹ФГБУЗ «Медико-санитарная часть №174» ФМБА РФ, 142280, Москва, Россия;

²ГБУЗ «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» Минздрава Московской области, 129110, Москва, Россия

Патоморфоз означает возникающие под действием различных факторов изменения в течении болезни. Терапевтический патоморфоз развивается при проведении лечебно-диагностических процедур. В статье рассмотрены виды клеточных реакций, наблюдаемых в процессе терапевтического патоморфоза. Представлены основные цитологические признаки деструктивного и пролиферативного процессов для оценки состояния патологического очага независимо от его локализации. Обсуждается клиническое значение изучения цитологических признаков терапевтического патоморфоза.

Ключевые слова: терапевтический патоморфоз; деструкция; пролиферация; цитологический метод исследования.

Для цитирования: Захарова Н.М., Ветчинникова О.Н. Терапевтический патоморфоз в практике клинического цитолога. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(6): 365-367. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-365-367>

Zakharova N.M.¹, Vetchinnikova O.N.²

THERAPEUTIC PATHOMORPHOSIS IN THE PRACTICE OF CLINICAL CYTOLOGISTS

¹Medical Department of Federation Medical and Biology Agency, 142280, Moscow, Russian Federation

²M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Clinical and Research Institute, 129110, Moscow, Russian Federation

Pathomorphosis means the changes that occur under the influence of various factors during the course of the disease. Therapeutic pathomorphosis develops during diagnostic and therapeutic procedures. The article considers the types of cellular reactions observed in the process of therapeutic pathomorphosis. The main cytological signs of destructive and proliferative processes for assessing the condition of the pathological focus, regardless of its location, are presented. The clinical significance of the study of cytological signs of therapeutic pathomorphosis is discussed.

Key words: therapeutic pathomorphosis; destruction; proliferation; cytological methods of investigation.

For citation: Zakharova N.M., Vetchinnikova O.N. Therapeutic pathomorphosis in the practice of clinical cytologists. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (6): 365-367. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-365-367>

For correspondence: Vetchinnikova O.N., Doctor of medicine, Senior Researcher of department Transplantation and Dialysis, professor of Chair of Transplantation Nephrology and Artificial Organs Faculty; e-mail: olg-vetchinnikova@yandex.ru

Information about authors:

Zakharova N.M., E-mail: nmzakharova@yandex.ru;

Vetchinnikova O.N., E-mail: olg-vetchinnikova@yandex.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 05.02.2018

Accepted 24.02.2018

В результате успехов в развитии медицинской науки и практики, достигнутых в течение последних десятилетий, коренным изменениям подвергся ряд принципиальных положений теоретической медицины, сложившихся ещё в конце XIX века и сохраняющих свою значимость до сих пор. Речь идёт прежде всего о компенсаторно-приспособительных реакциях организма, соотношении структуры и функции, процессах регенерации клеток, тканей, органов [1–3]. Изучение сущности этих явлений лежит в основе понимания патогенеза и патоморфоза заболеваний, что, в свою очередь, позволяет не только прогнозировать течение и исход той или иной

болезни, но и разрабатывать новые объективные диагностические критерии, а также средства профилактики и лечения.

В настоящее время в реальной клинической практике широкое признание получили цитоморфологические исследования, которые проводятся не только при диагностике патологических процессов, но и в ходе лечения ряда заболеваний [4–11]. Зачастую различия между реактивными изменениями и признаками злокачественной трансформации в клетках незначительны, а морфологическая картина стёрта по ряду причин, в том числе и на фоне лечения заболевания. Процессы деструкции и пролиферации характеризуют основные морфологические изменения в патологическом очаге, и цитологический метод исследования по этим изменениям позволяет оценить состояние патологического очага вне зависимости от его локализации.

Общие представления о патоморфозе. Понятие патоморфоза введено W. Hensl в 1929 г. для характеристики сдвигов

Для корреспонденции: Ветчинникова Ольга Николаевна, д-р мед. наук, ст. науч. сотр. хирургического отделения трансплантологии и диализа, проф. каф. трансплантологии нефрологии и искусственных органов; e-mail: olg-vetchinnikova@yandex.ru

в клинических проявлениях сифилиса под влиянием активной химиотерапии [12]. Термин «патоморфоз», в современном его понимании, применил W. Doerr в 1956 г. [13]. В отечественную литературу он введен Я.Л. Рапопортом в 1962 г. [14], который дал ему такое определение: «Патоморфоз – это стойкие изменения количественных и качественных сдвигов в нозологии, а также клинико-анатомических форм болезней под влиянием различных воздействий». Ещё W. Doerr [13] подчёркивал необходимость различать виды патоморфоза: 1) естественный патоморфоз, т.е. спонтанные изменения картины болезни, возникшие вследствие изменения как внешних (изменение экологии), так и внутренних (изменения в макроорганизме) причин болезни; 2) индуцированный, или терапевтический, патоморфоз, т.е. изменения болезни, вызванные терапевтическими воздействиями.

Терапевтический патоморфоз может манифестировать стертой клинической симптоматикой с неожиданными проявлениями в ходе заболевания и непредсказуемым исходом. Не всегда отмечается соответствие клинических и морфологических характеристик патоморфоза. Наблюдения показывают, что морфологические изменения наступают не сразу после воздействия лечебного агента, а спустя определенное время [8, 9].

Морфодинамика патологических процессов на клеточном уровне. Как известно, клеточные реакции многообразны и сводятся к нескольким типам. Анализируя фундаментальные работы по общей патологии и теории медицины, В.И. Казанин предлагает классификацию клеточных реакций в патологии, в которую включены как деструктивные (в том числе и дегенеративно-дистрофические), так и пролиферативные процессы [15]. Патологические реакции на клеточном уровне начинаются с процесса пролиферации и нередко заканчиваются реакциями необратимого повреждения клеток (некроз, апоптоз, терминальная дифференцировка) [16].

С морфологической и патофизиологической позиций среди клеточных реакций выделяют следующие виды [15]: 1) реакции пролиферации; 2) нарушение дифференцировки; 3) злокачественная трансформация; 4) реакции клеточных перемещений; 5) реакции межклеточных (и клеточно-матричных) взаимодействий; 6) реакции эндцитоза (фагоцитоз, резорбция, инфильтрация); 7) клеточные дистрофии; 8) адаптивная перестройка (гиперплазия, гипертрофия, атрофия, старение); 9) патология ультраструктур клеток; 10) реакции необратимого повреждения клеток. Большинство перечисленных клеточных реакций в той или иной мере имеют место при патоморфозе различных заболеваний.

Наиболее полно изучен терапевтический патоморфоз опухолевых процессов в ходе специфического лечения. Согласно исследованиям Е.Ф. Лушниковой [17], принято выделять четыре степени терапевтического патоморфоза опухоли:

I (слабая) – дистрофия отдельных клеток;

II (умеренная) – очаги некроза и дистрофия клеток;

III (выраженная) – поля некроза, выраженная дистрофия клеток, единичные атипичные клетки;

IV (резко выраженная) – тотальный некроз.

При исследовании морфологических проявлений опухоли под воздействием лечения определяют степень выраженности дистрофических и некробиотических изменений, полиморфизм опухолевых клеток, митотическую активность, развитие элементов соединительной ткани (выраженность фиброза), плотность воспалительной инфильтрации и состояние микроциркуляторного русла. Кроме морфологических данных в качестве признаков терапевтического патоморфоза определяют биологические опухолевые маркеры: показатели гормональной чувствительности, активности регуляции пролиферации, ангиогенеза, метастазирования и инвазии, а также регуляторы апоптоза [18–20].

Материал для цитологического исследования получают

методом тонкоигльной аспирационной биопсии патологических участков различных органов под контролем ультразвукового исследования. Кроме того, клинический цитолог исследует соскобы с повреждённых поверхностей, мазки-отпечатки, выпотные и другие биологические жидкости. Морфологический материал, полученный на момент исследования, не следует расценивать как нечто застывшее во времени, учитывая динамичность перестройки ткани в процессе развития патологического процесса или лечения. Цитологический метод исследования является высокоинформативным, экономичным, малотравматичным, хорошо воспроизводимым, что имеет большое значение для оценки активности патологического процесса в реальной клинической практике.

В патологических условиях одним из общих свойств различных тканей является морфодинамика. Основу морфодинамики патологического очага составляют процессы деструкции и пролиферации. Многолетний опыт работы клиническим цитологом позволяет утверждать, что цитоморфологическими признаками деструктивных процессов в исследуемом участке ткани, отражающими дегенеративно-дистрофические изменения, являются:

1) присутствие изолированных клеток, клеток в виде «голых» ядер;

2) рыхлое расположение клеток в группах и скоплениях (ослабление межклеточных контактов);

3) утрата целостности оболочек клеток и ядер;

4) вакуолизация цитоплазмы клеток;

5) значительное преобладание нейтрофилов (при наличии лейкоцитарной реакции).

Непременный спутник деструкции – пролиферация, к цитоморфологическим признакам которой относятся:

1) высокая клеточность цитологического препарата; наряду с незрелыми (недифференцированными) клетками присутствуют функционально активные клетки;

2) выраженность межклеточных контактов;

3) базофилия цитоплазмы;

4) наличие ядрышек в ядрах.

Цитологические признаки процессов деструкции и пролиферации представлены на примере препаратов – мазков-отпечатков со слизистой оболочки поверхности сигмовидной кишки при неспецифическом язвенном колите у больного Г., 43 года, в период обострения (до лечения) и в стадии ремиссии (после лечения) (рис. 1, 2, см. обложку).

Цитологическое заключение даёт характеристику морфологических изменений на ограниченном участке биологического объекта, при этом сложно оценить соотношение слоев эпителия и состояние кровеносных сосудов. Но по результатам цитологического анализа можно не только дифференцировать принадлежность клеток к той или иной ткани, но и выявлять морфологические признаки активности процессов пролиферации, клеточной гибели, терапевтического патоморфоза, особенности лейкоцитарной реакции в динамике патологического процесса, активность компонентов стромы. Данные цитологического метода исследования дополняют результаты гистологического анализа, а зачастую содержат уникальную информацию о клеточном составе и структуре клеток.

Заключение. Не отрицая информативности других методов диагностики, есть основания полагать, что результаты цитологического анализа содержат объективную, воспроизводимую и достоверную информацию о состоянии исследуемого участка ткани. Цитоморфологическая картина изменённого органа и совокупность признаков, отражающих характер патологического процесса, обеспечивают не только диагностику заболевания, но заключение в рамках доказательной медицины.

Информация, полученная на клеточном уровне, даёт возможность обосновать закономерности развития заболевания и компенсаторно-приспособительные механизмы того или

иногo патологического процесса, что важно для уточнения звеньев его патогенеза, а в итоге – для выбора оптимальной тактики лечения пациента, а также прогноза и раннего выявления рецидива. Комплексная оценка результатов цитоморфологического анализа в сочетании с данными современных иммунологических и молекулярно-биологических исследований позволит получить адекватный материал, содержащий наиболее близкую к реальности информацию о динамике процесса терапевтического патоморфоза.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акмаев И.Г. Нейроиммуноэндокринология: Истоки и перспективы развития. *Успехи физиологических наук*. 2003; 34 (4): 4 – 15.
2. Титов В.Н. Филогенетическая теория становления болезни, теория патологии, патогенез «метаболических пандемий» и роль клинической биохимии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 10: 5 – 13.
3. Крыжановский Г.Н., ред. *Дизрегуляторная патология*. Руководство для врачей и биологов. М.: Медицина; 2002.
4. Шабалова И.П., Касоян К.Т. *Цитологическая диагностика заболеваний шейки и тела матки*. М.-Тверь: Триада; 2010.
5. Волченко Н.Н., Савостикова М.В. Атлас цитологической и иммуноцитохимической диагностики опухолей. М.: Репоцентр М; 2010.
6. Шапиро Н.А., Батороев Ю.К., Дворниченко В.В. *Цитологическая диагностика опухолей печени, желчного пузыря и поджелудочной железы*. М.: РепоцентрМ; 2012.
7. Титмушш Э., Адамс К. *Шейка матки. Цитологический атлас*. Перевод с англ. Кондриков Н.И., ред. М.: Практическая медицина; 2015.
8. Захарова Н.М., Шатохина С.Н., Свистушкин В.М., Ратова А.В., Шевчик Е.А., Голубовский Г.А., Цыбин А.А. Цитологическая картина слизистой оболочки полости носа и околоносовых синусов у пациентов с полипозным риносинуситом при проведении NO-терапии. *Альманах клинической медицины* 2011; 25: 25 – 9.
9. Захарова Н.М., Шатохина И.С., Волошин В.П., Ерёмин А.В., Зубиков В. С., Ошукров С.А., Цыбин А.А. Особенности местной воспалительной реакции в области хирургического вмешательства при эндопротезировании крупных суставов. *Альманах клинической медицины*. 2012; 27: 14 – 17.
10. Серов В.В. Учение о патоморфозе: прошлое и настоящее. *Архив патологии*. 1997; 59 (4): 3 – 5.
11. Рапопорт Я.Л. Проблема патоморфоза. *Архив патологии*. 1962; 24 (2): 3 – 11.
12. Казанин В. И. *Систематика клеточных реакций в патологии*. М.: Медицина. 2004.
13. Шмаров Д.А., Погорелов В.М., Козинец Г.И. Современные аспекты оценки пролиферации и апоптоза в клинико-лабораторной диагностике (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 1: 36 – 9.
14. Абросимов А.Ю., Лушников Е. Ф., Габай В.Л., Саенко А.С., Доросевич А.Е., *Гибель клетки (апоптоз)*. М.: Медицина; 2001.
15. Titov V.N. The phylogenic theory of disease formation, theory of pathology, pathogenesis of «metabolic pandemics» and the role of clinical biochemistry. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 10: 5 – 13. (in Russian)
16. Kryzhanovsky G.N., ed. *Disregulation pathology. [Dizregulacionnaya patologiya. Rukovodstvo dlya vrachey i biologov]*. Moscow: Meditsina; 2002. (in Russian)
17. Shabalova I.P., Kasoyan K.T. *Cytological diagnosis of diseases of the cervix and body. [Tsitologicheskaya diagnostika zabolevaniy sheyki I tela matki]*. Moscow-Tver': Triada; 2010. (in Russian)
18. Volchenko N. N., Savostikova M. V. *Atlas of cytological and immunocytochemical diagnosis of tumors. [Atlas tsitologicheskoy I immunocitokhimicheskoy diagnostiki opukholey]*. Moscow: ReprotsentrM; 2010. (in Russian)
19. Shapiro N. A. Batoroev Yu.K., Dvornichenko V. V. *Cytological diagnosis of tumors of the liver, gallbladder and pancreas. [Tsitologicheskaya diagnostika opukholey pecheni, zhelchnogo puzrya i podzheludchnoy zhelezy]*. Moscow: ReprotsentrM; 2012. (in Russian)
20. Titmushsh E., Adams K. *Cervical Cytology. The translation from English. Kondrikov N.I., ed. [Sheika matki. Tsitologicheskii atlas.]*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2015. (in Russian)
21. Zakharova N.M., Shatochina S. N., Svistushkin V.M., Ratova A.V., Shevchik E.A., Golubovsky G.A., Tsybin A.A. Cytologic picture of the nasal cavity mucosa and paranasal sinuses after NO-therapy of patients with polypous rhinosinusitis. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2011; 25: 25 – 9. (in Russian)
22. Zakharova N.M., Shatochina S. N., Voloshin V.P., Eriomin A.V., Zubikov V.S., Oshukov S.A., Tsybin A.A. The features of the local inflammatory reaction in the area of surgical intervention for endoprosthetics of the major vessels. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2012; 27: 14 – 7. (in Russian)
23. Bryan R. Haugen, Whitney W. Woodmansee, Michael T. McDermott. Towards improving the utility of fine-needle aspiration biopsy for the diagnosis of thyroid tumors. *Clin. Endocrinol*. 2002; 56 (3): 281 – 90.
24. Pomplun S., Singh N., Plowman P.N., Wells C.A. Fine needle aspiration from the upper arm in a postmastectomy patient. *Cytopathology*. 2003; 14 (1): 37 – 9.
25. Serov V.V. Pathomorphosis teaching: past and present. *Arkhir patologii*. 1997; 59 (4): 3 – 5. (in Russian)
26. Doerr W. Uber Pathomorphose. *Artzl. Wschr*. 1956; 11 (6): 121 – 32.
27. Rapoport Ya.L. The problem of pathomorphosis. *Arkhir patologii*. 1962; 24 (2): 3 – 11. (in Russian)
28. Kazanin V.I. *Systematics of cellular reactions in pathology [Sistematika kletochnykh reaktsiy v patologii]*. Moscow: Meditsina; 2004. (in Russian)
29. Shmarov D.A., Pogorelov V.M., Kozinetz G.I. The actual aspects of evaluation of proliferation and apoptosis in clinical laboratory diagnostic: A Review. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 1: 36 – 9. (in Russian)
30. Abrosimov A. Yu., Lushnikov E. F., Gabai V. L., Saenko A. S., Dorosovich A. E. *Cell death (apoptosis). [Gibel' kletki (apoptoz)]*. Moscow: Meditsina; 2001. (in Russian)
31. Hemminki K., Granstrom C. Morphological types of breast cancer in family members and multiple primary tumors: is morphology genetically determined. *Breast Cancer Res*. 2002; 4(4): 7 – 12.
32. Fridman J.S., Lowe S.W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 2003; 22: 9030 – 40.
33. Bramer J.A., Abudu A.A., Tillman R.M., Carter S.R., Sumathi V.P., Grimer R.J. Pre- and post-chemotherapy alkaline phosphatase levels as prognostic indicators in adults with localised osteosarcoma. *Eur. J. Cancer*. 2005; 41(18): 2846 – 52.

REFERENCES

1. Akmayev I.G. Neuroimmunoendocrinology, its Developmental Consideration. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2003; 34 (4): 4 – 15. (in Russian)

Поступила 05.02.18
Принята к печати 24.02.18

КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 618.2:616-005.1-08

Клычева М.М., Назаров С.Б., Кузьменко Г.Н., Попова И.Г., Ситникова О.Г., Бойко Е.Л., Харламова Н.В.

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЕЙ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА, В ПОЗДНИЕ СРОКИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

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

Исследовано влияние гуморальных факторов на состояние гемостаза у беременных и небеременных женщин. Обследовано 70 женщин в возрасте 22–32 лет, из них 1-ю группу составили 50 пациенток с физиологически протекающей беременностью на сроке гестации 38–40 нед, 2-ю группу – 20 практически здоровых небеременных женщин. У всех женщин в плазме крови определяли уровень эндотелиальной синтазы оксида азота e-NOS, циклического гуанозинмонофосфата цГМФ, антигепаринового фактора тромбоцитов PF4, β-тромбоглобулина β-TG, адреналина и норадреналина методом иммуноферментного анализа (ИФА), в сыворотке крови – суммарное содержание нитратов и нитритов NOx, показатели гемостазиограммы. Результаты исследования показали достоверное снижение содержания e-NOS, NOx, цГМФ, PF4, а также повышение уровня адреналина и норадреналина в крови у беременных женщин в 38–40 нед гестации в сравнении с показателями небеременных женщин.

Ключевые слова: беременность; e-NOS; NOx; цГМФ; адреналин; норадреналин; гемостаз.

Для цитирования: Клычева М.М., Назаров С.Б., Кузьменко Г.Н., Попова И.Г., Ситникова О.Г., Бойко Е.Л., Харламова Н.В. Особенности изменения уровней гуморальных факторов, регулирующих систему гемостаза, в поздние сроки физиологической беременности. 2018; 63 (6): 368-371. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-368-371>

Klycheva M.M., Nazarov S.B., Kuzmenko G.N., Popova I.G., Sitnikova O.G., Boyko E.L., Kharlamova N.V.

FEATURES OF CHANGES IN LEVELS OF HUMORAL FACTORS REGULATING THE SYSTEM OF HEMOSTASIS, IN THE LATE STAGES OF PREGNANCY

Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood named V.N. Gorodkov, 153045, Ivanovo, Russian Federation

The influence of humoral factors on the state of hemostasis in nonpregnant and pregnant women. There were 70 women aged from 22 to 32 years, of which the 1st group consisted of 50 patients with physiological pregnancy at term gestation 38-40 weeks, the 2nd group – 20 healthy non-pregnant women. All women was measured in the plasma levels of e-NOS, cGMP, PF4, β-TG, adrenaline and noradrenaline by ELISA, in serum NOx, indicators of gemostaziogramma. The results showed a significant decrease in the blood e-NOS, NOx, cGMP, PF4, as well as increased levels of adrenaline and noradrenaline in the blood of pregnant women in 38-40 weeks of gestation in comparison with nonpregnant women.

Key words: pregnancy; e-NOS; NOx; cGMP; adrenaline; noradrenaline; haemostasis.

For citation: Klycheva M.M., Nazarov S.B., Kuzmenko G.N., Popova I.G., Sitnikova O.G., Boyko E.L., Kharlamova N.V. Features of changes in levels of humoral factors regulating the system of hemostasis, in the late stages of pregnancy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018;63 (6): 368-371. (in Russ.) DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-368-371>

For correspondence: Klycheva M.M., junior researcher of clinical biochemistry and Genetics; e-mail: maya.klycheva@yandex.ru

Information about authors:

Klycheva M.M., orcid.org/0000-0002-1725-8505
Kuzmenko G.N., orcid.org/0000-0001-5772-9271
Sitnikova O.G., orcid.org/0000-0003-2604-0724
Kharlamova N.V., orcid.org/0000-0003-2867-1693

Nazarov S.B., orcid.org/0000-0003-1545-7655
Popova I.G., orcid.org/0000-0003-1836-3523
Boyko E.L., orcid.org/0000-0002-8907-4860

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 26.12.2017
Accepted 09.02.2018

Введение. При беременности происходит физиологическая перестройка функционирования многих органов и систем. Это проявляется в локальных и системных изменениях гемостатического и фибринолитического потенциа-

лов крови, протромбогенных эффектах эндотелия кровеносных сосудов [1]. Изучению показателей системы гемостаза придаётся большое значение как важнейшему звену в развитии осложнений во время беременности, родов и в послеродовом периоде. При этом особая роль отводится тромбоцитам, в которых содержатся тромбопластические и антигепариновые факторы, фибриназа, фибринолитические агенты, сократительные белки, необходимые для рас-

Для корреспонденции: Клычева Майя Михайловна, мл. науч. сотр. лаб. клин. биохимии и генетики; e-mail: maya.klycheva@yandex.ru

пластывания, адгезии, агрегации и реакции высвобождения тромбоцитов [2].

В физиологической адаптации сосудов [3], в регуляции агрегации тромбоцитов при беременности принимает участие оксид азота [4]. Изучение продукции оксида азота (NO) – регулятора физиологических функций организма показало, что NO ингибирует адгезию и агрегацию тромбоцитов [5]. Синтез NO осуществляется из L-аргинина с помощью каталитического действия фермента синтазы оксида азота [6]. Основным внутриклеточным рецептором для оксида азота является растворимая гуанилатциклаза, которая способствует формированию вторичного мессенджера – циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), который в свою очередь определяет многие клеточные функции через взаимодействие со специфическими киназами, ионными каналами, фосфодиэстеразами [7].

При адаптации организма женщины к беременности большое значение имеют адренергические механизмы, участвующие в регуляции системы гемостаза и обеспечении физиологического состояния миометрия в течение беременности и родов. Накануне родов происходит снижение эффективности ингибирующего влияния β -адренорецепторного ингибирующего механизма, что создаёт условия для развития спонтанной маточной активности и повышения чувствительности миометрия к известным утеростимуляторам – окситоцину, серотонину, гистамину и простагландинам [8]. Каждая фаза моноаминовой активности при гестации является физиологически обоснованной и целесообразной с точки зрения обеспечения нормального процесса беременности, последовательного развития плода и родоразрешения [9].

Однако сведения о гуморальных факторах, участвующих в регуляции гемостаза у женщин с физиологическим течением беременности в поздние сроки гестации, требуют уточнения.

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование содержания компонентов системы оксида азота (эндотелиальной синтазы оксида азота e-NOS, NO, цГМФ), катехоламинов (адреналина и норадреналина) и свёртывания крови у небеременных и беременных женщин с физиологической беременностью в сроки гестации 38–40 нед.

Материал и методы. В исследование включили 70 женщин в возрасте 22–32 лет. Основную группу составили 50 женщин на сроке гестации 38–40 нед. Критерий включения в основную группу – физиологически протекающая беременность; критерий исключения – патология беременности, потенциально ассоциированная с изменениями в системе гемостаза, тяжёлые формы экстрагенитальной патологии, применение лекарственных средств, влияющих на свёртывание крови и функцию тромбоцитов, активная инфекция. Контрольную группу составили 20 небеременных, практически здоровых женщин.

Кровь для исследования забирали утром, натощак, из локтевой вены. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли в плазме крови уровень эндотелиальной NO-синтазы e-NOS («R&D Systems», США), цГМФ («Enzo Life Science», Германия), содержание адреналина и норадреналина («IBL», Германия). Для ИФА использовали автоматический ридер EL-808 («Bio-Tek Instruments, Inc.», США). Суммарное содержание нитратов и нитритов (NOx) в сыворотке крови определяли путём восстановления нитратов в нитриты в присутствии хлорида ванадия [10]. Параметры плазменного гемостаза – активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ) и уровень фибриногена определяли на приборе «STA Compact» (Франция) с использованием реактивов фирмы «Diagnostica Stago». Для оценки активности тромбоцитов определяли уровень фактора 4 тромбоцитов (PF4) и β -тромбоглобулина (β -ТГ) с применением набора «Asserachrom» (Франция) методом ИФА. Фибринолитиче-

скую активность определяли по методу М.А. Котовшиковой и Б.И. Кузника [11].

Статистический анализ результатов исследования проводили с использованием программы Statistica 6.0. Достоверность полученных результатов оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни для двух независимых групп, корреляционный анализ проведён методом Спирмана. Данные представлены в виде медианы и референтных интервалов [Me (25–75%)]. Для определения ориентировочных границ нормы показателей рассчитывали перцентильные интервалы 5–95%. Достоверным считали уровень значимости при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Проведено исследование показателей гемостазиограммы у пациенток с физиологически протекающей беременностью на сроке гестации 38–40 нед и у небеременных женщин (табл. 1). В результате исследования показателей гемостаза у беременных и небеременных женщин получены данные, указывающие на адаптивное изменение гемостатического равновесия в сторону гиперкоагуляции у беременных женщин, которые согласуются с результатами многочисленных исследований [12, 13]. В условиях нормально протекающей беременности у здоровых женщин наблюдается укорочение АЧТВ, протромбинового времени, тромбинового времени, снижение фибринолитической активности и повышение уровня фибриногена. Данные изменения показателей считаются характерными для физиологической беременности, не приводят к тромбообразованию и являются необходимыми для нормального функционирования фетоплацентарного комплекса и обеспечения адекватного гемостаза в родах.

В гестационной адаптации системы гемостаза при физиологическом течении беременности участвует тромбоцитарно-сосудистое звено системы гемостаза. О функциональном состоянии тромбоцитов позволяют судить определяемые в плазме маркеры общей реактивности тромбоцитов и реакции высвобождения. Из числа последних наиболее распространено определение в плазме компонентов α -гранул тромбоцитов, таких как тромбоцитарный фактор 4 (PF4) и β -тромбоглобулин [14]. I. Karalis и соавт. наблюдали постепенное повышение уровней PF4 и β -ТГ после 20-й недели беременности [15]. На 30-й неделе беременности отмечали значительный рост уровня β -ТГ по сравнению с таковым в группе небеременных женщин и отсутствие изменений уровня PF4 [16]. По данным Y. Yoneyama и соавт. [17], женщины с нормально протекающей беременностью на сроке 34 нед также имеют повышенный уровень PF4 и β -ТГ по сравнению с небеременными. Однако в другой работе на сроке 34–36 нед повышения PF4 в сравнении с данными небеременных женщин найдено не было [18].

По нашим данным, у беременных женщин на сроке 38–40 нед отмечено достоверное снижение уровня PF4 (см. табл. 1). Поскольку PF4 является специфичным для тромбоцитов продуктом их активации, попадающим в плазму лишь в ходе дегрануляции тромбоцитарных гранул, полученные в ходе настоящего исследования данные свидетельствуют о снижении количества функционально активных тромбоцитов в крови. В нашем случае отсутствовали достоверные изменения уровня β -ТГ (см. табл. 1). Отсутствие изменений уровней β -тромбоглобулина при физиологическом течении беременности в сравнении с показателями небеременных женщин косвенно указывает на стабильность процессов спонтанной агрегации в конце III триместра беременности. Возможно, сниженный уровень фактора 4 тромбоцитов, а также уровень β -ТГ, характерный для небеременных женщин, могут быть эндогенным компенсационным механизмом, который уменьшает активацию тромбоцитов в конце нормально протекающей беременности.

Современное акушерство отводит системе L-аргинин – оксид азота ведущую вазорегуляторную роль в период гестации [19]. Кроме того, оксид азота имеет и другие важные функции,

Таблица 1

Показатели гемостаза у обследованных групп женщин

Показатель	Беременные женщины (n = 50)	Небеременные женщины (n = 20)	p
АЧТВ, с	36,2 (36,0; 37,0)	38,2 (38,0; 41,6)	< 0,001
Протромбиновое время, с	13,0 (13,0; 13,5)	14,1 (13,80; 14,95)	< 0,001
Тромбиновое время, с	16,1 (15,5; 16,5)	17,1 (16,4; 17,4)	< 0,001
Фибриноген плазмы, г/л	4,92 (4,56; 5,33)	2,65 (2,31; 3,21)	< 0,001
Фибринолитическая активность, %	7,00 (7,00; 8,00)	12,0 (11,5; 13,0)	< 0,001
Фактор 4 тромбоцитов, U/ml	13,7 (12,2; 15,5)	18,0 (13,8; 19,0)	< 0,01
β-тромбоглобулин, U/ml	27,8 (17,9; 33,0)	28,0 (20,0; 35,0)	> 0,05

Примечание. Числовое значение p приведено как показатель достоверности различий по сравнению с группой небеременных женщин.

в том числе снижает чувствительность тромбоцитов к проагрегантным агентам [20]. Физиологическое течение беременности сопровождается изменениями продукции оксида азота. Вопрос о биосинтезе оксида азота при нормально протекающей беременности остаётся спорным. Так, некоторые авторы в своих исследованиях показали, что биосинтез NO увеличивался при нормальной беременности, особенно во II триместре, а пика достигал в III триместре беременности [21, 22]. Однако Т. Ната и соавт. [23] получили результаты о снижении продукции оксида азота, в то время как Е. Терап и соавт. показали, что никаких изменений в биосинтезе NO при нормальной беременности по сравнению с небеременными женщинами не наблюдается [24]. В основном содержание оксида азота у беременных женщин исследовали на более ранних сроках. По нашим данным, суммарная концентрация нитратов и нитритов у беременных женщин с нормально протекающей беременностью на сроке 38–40 нед достоверно ниже, чем у небеременных женщин (табл. 2).

Возможно, снижение продукции оксида азота в конце III триместра неосложнённой беременности связано со сниженным количеством свободного аргинина в сыворотке крови. Так, в исследованиях С.В. Хлыбовой и соавт. [25] показано, что содержание свободного аргинина в сыворотке крови пациенток остаётся неизменным на протяжении I триместра и существенно возрастает во II триместре. Повышение уровня свободного аргинина на данном сроке гестации обеспечива-

Таблица 2

Особенности отдельных биохимических показателей при физиологической беременности на сроке гестации 38–40 нед

Показатель	Группа женщин		p
	беременные (n = 50)	небеременные (n = 20)	
NOx, мкмоль/л	52,0 (44,0; 62,0)	86,5 (69,5; 108,0)	0,000
e-NOS, нг/мл	2,44 (1,90; 3,20)	3,65 (3,34; 3,75)	0,000
цГМФ, пмоль/мл	0,46 (0,30; 0,62)	0,69 (0,56; 0,74)	0,001
Адреналин, пг/мл	110,1 (66,8; 211,4)	65,4 (64,7; 109,3)	0,005
Норадреналин, пг/мл	316,6 (311,0; 320,4)	305,3 (199,2; 312,8)	0,001

Примечание. Числовое значение p приведено как показатель достоверности различий по сравнению с группой небеременных женщин.

ет оптимальный уровень синтеза оксида азота и способствует физиологическому течению беременности. В III триместре происходит снижение содержания аргинина.

Снижение содержания оксида азота при нормально протекающей беременности на сроке 38–40 нед также можно объяснить низкой концентрацией фермента e-NOS в плазме крови. По нашим данным, у беременных женщин концентрация эндотелиальной синтазы оксида азота в плазме крови была ниже, чем у небеременных женщин (см. табл. 2).

Изучению роли регуляторных воздействий циклических нуклеотидов в репродуктивной системе придаётся особое значение [26]. Результаты нашего исследования показали, что уровень цГМФ у небеременных женщин оказался достоверно выше, чем у беременных (см. табл. 2). Известно, что цГМФ ускоряет гидролиз циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), в то же время последний является положительным эффектором в отношении гидролиза цГМФ [27], а развитие патологии беременности сопровождается снижением коэффициента цАМФ/цГМФ [28]. По-видимому, снижение уровня цГМФ на сроке 38–40 нед при физиологической беременности является адаптивным.

Полученные нами данные указывают на то, при физиологическом течении беременности на сроке гестации 38–40 нед по сравнению с показателями небеременных женщин отмечается снижение атромбогенного потенциала эндотелия, о чём свидетельствует снижение уровня NO. Оксид азота является основным стимулятором образования цГМФ, поэтому в организме обследованных беременных женщин снижено количество цГМФ, что может иметь отношение к механизмам индукции родовой деятельности.

Основными адренергическими медиаторами являются адреналин и норадреналин, которые могут стимулировать учащение сокращений матки или, наоборот, вызывать угнетение родовой деятельности [29]. Адреналин возбуждает сократительную активность небеременной матки и тормозит спонтанную родовую деятельность, в то время как норадреналин вызывает сокращения беременной матки [30]. Поэтому во время беременности только небольшое количество норадреналина обнаруживается в матке. По результатам нашего исследования выявлено, что содержание катехоламинов в плазме крови у беременных женщин на сроке гестации 38–40 нед было достоверно выше, чем у небеременных, что согласуется с литературными данными [31].

На основании полученных данных рассчитаны перцентильные интервалы 5–95% для e-NOS и цГМФ, которые предлагаются использовать в качестве ориентировочных границ нормы у беременных женщин с нормально протекающей беременностью на сроке гестации 38–40 нед: e-NOS – 1,34–3,66 пмоль/мл, цГМФ – 0,09–1,11 пмоль/мл (у небеременных женщин e-NOS – 2,43–3,84 пмоль/мл, цГМФ – 0,34–1,83 пмоль/мл).

Заключение. Таким образом, у женщин с нормально протекающей беременностью на сроке гестации 38–40 нед наблюдалось уменьшение продукции e-NOS, NOx и снижение уровня цГМФ, что свидетельствует об участии системы оксида азота в регуляции формирования гиперкоагуляционного потенциала при физиологической беременности.

В гестационной адаптации при физиологическом течении беременности участвует тромбоцитарно-сосудистое звено системы гемостаза, что подтверждается дифференцированными изменениями концентраций его компонентов в крови. Снижение уровня тромбоцитарного фактора 4, отсутствие изменений уровня β-тромбоглобулина у женщин с физиологической беременностью на сроке 38–40 нед гестации косвенно указывают на адаптивные изменения функции тромбоцитов в III триместре беременности в условиях повышенных уровней норадреналина и адреналина в плазме крови в сравнении с показателями здоровых небеременных женщин.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3-7, 10, 13-17, 19-24, 27 см. REFERENCES)

2. Бондарь Т.П., Муратова А.Ю., Цатурян Е.О. Динамика показателей плазменного гемостаза у женщин с тромбогенными осложнениями беременности и родов. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2012; 8(3): 720-3.
8. Овсянников В.Г., Вартанян Э.Э., Бойченко А.Е. Моноаминергические механизмы регуляции физиологической беременности. *Успехи современного естествознания*. 2003; 12: 57-8.
9. Белова Н.Г., Агаркова Л.А., Удут В.В., Желев В.А. Состояние сосудисто-тромбоцитарного гемостаза при физиологической беременности и беременности, осложненной гестозом. *Сибирский медицинский журнал*. 2010; 25(4,2): 63-5.
11. Котовшчикова М.А., Кузник Б.И. Простой метод определения естественного лизиса и ретракции кровяного сгустка. *Лабораторное дело*. 1962; 5: 6-9.
12. Момот А.П., Молчанова И.В., Батрак Т.А., Белозеров Д.Е., Трухина Д.А., Кудинова И.Ю., Максимова Н.В., Фадеева Н.И., Сердюк Г.В., Романов В.В. Референсные значения показателей системы гемостаза при физиологически протекающей беременности и после родоразрешения. *Проблемы репродукции*. 2015; 1: 89-97.
18. Момот А.П., Тараненко И.А., Трухина Д.А., Романов В.В. Особенности сосудисто-тромбоцитарного гемостаза на разных сроках физиологической беременности. *Медицинский алфавит. Современная лаборатория*. 2014; 1(2): 27-31.
25. Хлыбова С.В., Циркин В.И., Дворянский С.А. Содержание свободного L-аргинина в крови у женщин с плацентарной недостаточностью. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2006; 55(2): 20-4.
26. Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Линде В.А. Циклазные системы и механизмы клеточной регуляции в плаценте. *Успехи современного естествознания*. 2014; (5): 94-101.
28. Погорелова Т.Н., Друкер Н.А., Крукиер И.И., Длузевская Т.С. Особенности внутриклеточной регуляции метаболизма плаценты при плацентарной недостаточности. *Вестник российской ассоциации акушеров-гинекологов*. 1998; 3: 18.
29. Хасанов А.А., Бакирова И.А. Современные представления о регуляции нарушений сократительной деятельности матки. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2010; 59(2): 88-94.
30. Абрамченко В.В. Родовая деятельность и ее регуляция. СПб.: ЭЛБИ-СПб; 2006.
31. Ушакова Г.А., Петрич Л.Н. Современные представления о механизмах развития родовой деятельности. Обзор. *Мать и дитя в Кузбассе*. 2016; 2(65): 4-10.

REFERENCES

1. Thornton P., Douglas J. Coagulation in pregnancy. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*. 2010; 24(3): 339-52.
2. Bondar' T.P., Muratova A.Yu., Tsaturyan E.O. Dynamics of plasma hemostasis in women with thrombogenic pregnancy and delivery complications. *Saratovskiy nauchno-meditinskii zhurnal*. 2012; 8(3): 720-3. (in Russian)
3. Leo C.H., Jelinic M., Ng H.H., Marshall S.A., Novak J., Tare M. et al. Vascular actions of relaxin: nitric oxide and beyond. *Br. J. Pharmacol*. 2017; 174: 1002-14.
4. Neri I., Marietta M., Piccinini F., Volpe A., Facchinetti F. The L-arginine-nitric oxide system regulates platelet aggregation in pregnancy. *J. Soc. Gynecol. Invest*. 1998; 5(4): 192-6.
5. Bajraktari G., Burhenne J., Bugert P., Haefeli W.E., Weiss J. Cyclic guanosine monophosphate modulates accumulation of phosphodiesterase 5 inhibitors in human platelets. *Biochem Pharmacol*. 2017; 145: 54-63.
6. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012; 33: 829-37.
7. Zbrojkiewicz M., Sliwiński L. Cyclic guanosine monophosphate in the regulation of the cell function. *Postepy Hig. Med. Dosw*. 2016; 70: 1276-85.
8. Ovsyannikov V.G., Vartanyan E.E., Boichenko A.E. Monoaminergic mechanisms in the regulation of physiological pregnancy.

- Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2003; 12: 57-8. (in Russian).
9. Belova N.G., Agarkova L.A., Udut V.V., Zhelev V.A. Condition of vascular-thrombocytic haemostasis in physiological pregnancy and pregnancy complicated with gestosis. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2010; 25(4,2): 63-5. (in Russian)
10. Miranda K.M., Espey M.G., Wink D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide*. 2001; 5(1): 62-71.
11. Kotovshchikova M.A., Kuznik B.I. A simple method for the determination of the natural lysis and retraction of a blood clot. *Laboratornoe delo*. 1962; 5: 6-9. (in Russian)
12. Momot A.P., Molchanova I.V., Batrak T.A., Belozеров D.E., Trukhina D.A., Kudina I.Yu. et al. Reference values of hemostatic system parameters in normal pregnancy and after delivery. *Problemy reproduktivnoy*. 2015; 1: 89-97. (in Russian)
13. Szecsi P.B., Jorgensen M., Klajnbar A., Andersen M.R., Colov N.P., Stender S. Haemostatic reference intervals in pregnancy. *Thromb. Haemost.* 2010; 103(4): 718-27.
14. Kowalska M.A., Rauova L., Poncz M. Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis. *Thrombosis Research*. 2010; 125: 292-6.
15. Karalis I., Nadar S.K., Yemeni E.A., Blann A.D., Lip. G.Y.H. Platelet activation in pregnancy-induced hypertension. *Thrombosis Research*. 2005; 116: 377-83.
16. Hayashi M., Inoue T., Hoshimoto K., Hirabayashi H., Negishi H., Ohkura T. The levels of five markers of hemostasis and endothelial status at different stages of normotensive pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand*. 2002; 81(3): 208-13.
17. Yoneyama Y., Suzuki S., Sawa R., Otsubo Y., Power G.G., Araki T. Plasma adenosine levels increase in women with normal pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2000; 182: 1200-3.
18. Momot A.P., Taranenko I.A., Trukhina D.A., Romanov V.V. Features of vascular-platelet hemostasis for various periods of physiological pregnancy. *Meditsinskiy alfavit. Sovremennaya laboratoriya*. 2014; 1(2): 27-31. (in Russian)
19. Valdes G., Kaufmann P., Corthorn J., Erices R., Brosnihan K.B., Joyner-Grantham J. Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2009; 7:79.
20. López-Jaramillo P., Arenas W.D., García R.G., Rincon M.Y., López M. Review: The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in preeclampsia. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis*. 2008; 2: 261-75.
21. Choi J.W., Im M.W., Pai S.H. Nitric oxide production increases during normal pregnancy and decreases in preeclampsia. *Ann. Clin. Lab. Sci*. 2002; 32: 257-63.
22. Hodžić J., Izetbegović S., Muračević B., Iršić R., Štimjanin Jović H. Nitric oxide biosynthesis during normal pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia. *Meditsinskiy Glasnik*. 2017; 14(2): 211-7.
23. Hata T., Hashimoto M., Kanenishi K., Akiyama M., Yanagihara T., Masumura S. Maternal circulation nitrite levels are decreased in both normal normotensive pregnancies and pregnancies with preeclampsia. *Gynecol. Obstet. Invest*. 1999; 48: 93-7.
24. Teran E., Escudero C., Vivero S., Enriquez A., Calle A. Intraplatelet Cyclic Guanosine-3',5'-Monophosphate Levels During Pregnancy and Preeclampsia. *Hypertension in pregnancy*. 2004; 23(3): 303-8.
25. Khlybova S.V., Tsirkin V.I., Dvoryanskii S.A. The Free L-Arginin Blood Concentration In Women With Placental Insufficiency. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei*. 2006; 55(2): 20-4. (in Russian)
26. Pogorelova T.N., Gun'ko V.O., Linde V.A. Cyclase system and mechanisms of cell regulation in the placenta. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2014; 5(2): 94-101. (in Russian)
27. Haslam R.J., Dickinson N.T., Jang E.K. Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets. *Thromb. Haemost.* 1999; 82: 412-23.
28. Pogorelova T.N., Drukker N.A., Krukier I.I., Dluzhevskaya T.S. Features of intracellular metabolism regulation placenta with placental insufficiency. *Vestnik Rossiyskoy assotsiatsii akusherov-ginekologov*. 1998; 3: 18. (in Russian)
29. Khasanov A.A., Bakirova I.A. Modern representations about regulation Infringements contraction activity of uterus. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei*. 2010; 59(2): 88-94. (in Russian)
30. Abramchenko V.V. Labors and regulation [Rodovaya deyatel'nost' i ee regulyatsiya]. St. Petersburg: ELBI-SPb; 2006. (in Russian)
31. Ushakova G.A., Petrich L.N. Modern views on the mechanisms of labor. overview. *Mat' i ditya v Kuzbasse*. 2016; 2(65): 4-10. (in Russian)

Поступила 26.12.17

Принята к печати 09.02.18

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.9-022.6:577.212.3:575.222.75

Петров А.А., Лебедев В.Н., Казанцев А.В., Ковальчук Е.А., Сизикова Т.Е., Пышная Н.С., Павельев Д.И.,
Кутаев Д.А., Борисевич С.В.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ В КАЧЕСТВЕ КОНТРОЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ПРИ ОЦЕНКЕ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПАСНЫХ И ОСОБО ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ МЕТОДОМ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ-ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306,
г. Сергиев Посад, Россия

Метод обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) занимает ведущее место в диагностике заболеваний, вызванных РНК-содержащими вирусами. К выполнению всех этапов анализа (выделение нуклеиновой кислоты, проведение обратной транскрипции, амплификации ДНК) указанным методом предъявляются строгие требования. Необходимо учитывать возможность получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов.

Использование при постановке ОТ-ПЦР только положительного и отрицательного контрольного образца (ПКО и ОКО) недостаточно для контроля стадии выделения РНК и обратной транскрипции. В связи с этим существует необходимость разработки внутреннего контрольного образца (ВКО), позволяющего контролировать указанные стадии.

Целью данной работы является обоснование использования генно-инженерных конструкций (ГИК) в качестве контрольных образцов (ПКО и ВКО) при оценке наборов реагентов для выявления РНК возбудителей опасных и особо опасных вирусных инфекций методом ОТ-ПЦР.

В качестве ПКО использовали векторные рекомбинантные плазмиды, содержащие вставку кДНК геномной РНК возбудителя, в качестве ВКО – РНК, упакованную в белок оболочки бактериофага MS2. Показано, что ВКО не оказывает влияния на аналитическую чувствительность ОТ-ПЦР при работе как с нативными возбудителями, так с синтетическими нуклеиновыми кислотами вирусов Эбола, Марбург, Ласса, Мачупо, ВЭЛ, ЛДР, бешенства.

Обсуждается возможность использования контрольных образцов при стандартизации диагностических наборов реагентов.

Ключевые слова: обратная транскрипция; полимеразная цепная реакция; положительный контрольный образец; отрицательный контрольный образец; внутренний контрольный образец; генно-инженерная конструкция; диагностический набор реагентов.

Для цитирования: Петров А.А., Лебедев В.Н., Казанцев А.В., Ковальчук Е.А., Сизикова Т.Е., Пышная Н.С., Павельев Д.И., Кутаев Д.А., Борисевич С.В. Использование генно-инженерных конструкций в качестве контрольных образцов при оценке наборов реагентов для выявления РНК возбудителей опасных и особо опасных вирусных инфекций методом обратной транскрипции-полимеразно-цепной реакции. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (6): 372-375. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-372-375>

Petrov A.A., Lebedev V.N., Kazantsev A.V., Kovalchuk E.A., Sizikova T.E., Pyshnaya N.S., Paveliev D.I., Kutaev D.A., Borisevich S.V.

THE USE OF GENETIC ENGINEERING CONSTRUCTIONS AS CONTROL SAMPLES ON EVALUATION OF DIAGNOSTIC KITS FOR REVEAL OF RNA OF HAZARD AND EXTREMELY HAZARD AGENTS OF VIRUS INFECTIONS BY REVERSE TRANSCRIPTION – POLYMERASE CHAIN REACTION

Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of the Defense of the Russian Federation, 141306, Sergiev Posad, Russian Federation

The reverse transcription – polymerase chain reaction method (RT-PCR) has leading position on diagnostic infections, caused by RNA-containing viruses. This method presents severe requirements to carrying out of everybody stages of analysis (extraction of nucleic acid, carry out reverse transcription, amplification of DNA). It is necessary to account the possibility of false positive or false negative results appearance. The use on RT-PCR only positive (PCS) and negative (NCS) control samples is insufficient for the control of stages of RNA extraction and reverse transcription. That is way there is necessity the construction of inner control sample (ICS) to control of these stages.

The main goal of present is the ground of use genetic engineering constructions (GEC) as control samples (PCS and ICS) on evaluation of diagnostic kits for reveal of RNA of hazard and extremely hazard agents of virus infections by RT-PCR.

The vector recombinant plasmids, containing the insertion of cDNA of agent's genomic RNA are used as PCS, RNA was packed in membrane protein of MS2 bacteriophage, is used as ICS. It is demonstrated that ICS does no influence on sensitivity of RT-PCR both for use of native agents and for use of synthetic nucleic acids of Ebola, Marburg, Lassa, Machupo, Venezuelan encephalitis equine (VEE), Rift Valley fever and rabies viruses. The possibility of use of PCS and ICS for standardization of diagnostic kits is discussed.

Key words: *reverse transcription; polymerase chain reaction; positive control sample; negative control sample; inner control sample; genetic engineering construction; diagnostic kit.*

For citation: Petrov A.A., Lebedev V.N., Kazantsev A.V., Kovalchuk E.A., Sizikova T.E., Pyshnaya N.S., Paveliev D.I., Kutaev D.A., Borisevich S.V. The use of genetic engineering constructions as control samples on evaluation of diagnostic kits for reveal of rna of hazard and extremely hazard agents of virus infections by reverse transcription – polymerase chain reaction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (6): 372-375 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-372-375>

For correspondence: Borisevich S. V., doctor of biology, professor, corresponding member of RAS; e-mail: 48cnii@mil.ru

Information about authors:

Petrov A.A., <http://orcid.org/0000-0002-9714-2085>
Kazantsev A. V., <http://orcid.org/0000-0003-3072-9110>
Sizikova T.E., <http://orcid.org/0000-0002-1817-0126>
Paveliev D.I., <http://orcid.org/0000-0003-3204-1897>
Borisevich S.V., <http://orcid.org/0000-0002-5742-3919>

Lebedev V.N., <http://orcid.org/0000-0002-6552-4599>
Kovalchuk E.A., <http://orcid.org/0000-0002-6323-8249>
Pyshnaya N.S., <http://orcid.org/0000-0001-5644-7686>
Kutaev D.A., <http://orcid.org/0000-0003-4236-1368>

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

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

Received 25.03.2018
Accepted 09.04.2018

Введение. Общей тенденцией проводимых в последние годы диагностических исследований с целью обнаружения возбудителей опасных и особо опасных вирусных инфекций является использование молекулярно-биологических методов, специфичность которых основана на уникальности нуклеотидных последовательностей геномов микроорганизмов. Для выявления возбудителей с РНК-геномом ведущее положение занимает метод обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР), обладающий высокой чувствительностью и специфичностью. Однако при использовании указанного метода требуется строгое выполнение всех этапов проведения анализа, начиная от забора клинического материала и заканчивая регистрацией продуктов амплификации.

Обязательным условием для успешного применения методов молекулярной биологии является понимание возможных ошибок на всех этапах анализа, их устранение или сведение к минимуму. Контроль качества ПЦР-исследований осуществляется путём проведения следующих мероприятий [2]: включения в каждую постановку ПЦР-реакции положительного и отрицательного контроля качества выделения нуклеиновой кислоты (НК); периодического применения собственных лабораторных положительных и отрицательных контролей, охарактеризованных другими методами диагностики данной инфекции; применения зашифрованных контрольных образцов Федеральной системы внешней оценки качества (ФСВОК); проверкой чувствительности и специфичности каждой новой серии диагностических наборов методом ПЦР.

В качестве положительного контрольного образца (ПКО) используют препарат, содержащий выявляемые нуклеотидные последовательности (ген-эквиваленты). В качестве отрицательного контрольного образца (ОКО) используют препарат, не содержащий ни специфические НК, ни компоненты реакционной смеси [3]. Использование ПКО позволяет судить о специфичности реакции, использование ОКО позволяет выявить контаминацию реагентов продуктами амплификации. В то же время препарат РНК, подготовленный для ОТ-ПЦР из биологического материала, может содержать примеси ингибиторов, заметно снижающих эффективность реакции и приводящих в некоторых случаях к отсутствию специфических ампликонов даже при наличии искомого возбудителя. Следовательно, наличия только ПКО и ОКО недостаточно для контроля стадии выделения РНК и обратной транскрипции, поэтому существует необходимость разработки внутреннего контрольного образца (ВКО).

Разработка ВКО, предназначенного для проверки про-

хождения всех стадий ОТ-ПЦР анализа, имеет особую значимость при диагностических исследованиях с возбудителями опасных и особо опасных вирусных инфекций. Экстракция РНК из биопроб занимает длительное время и представляет собой существенный риск для здоровья оператора. Контроль данной стадии позволит исключить проведение повторных исследований по выделению РНК.

Изложенное определяет актуальность данной работы, целью которой является использование генно-инженерных конструкций (ГИК) в качестве контрольных образцов при оценке наборов реагентов для выявления РНК возбудителей опасных и особо опасных вирусных инфекций методом ОТ-ПЦР.

Материал и методы. В экспериментах были использованы наборы реагентов для выявления в исследуемых пробах РНК вирусов Эбола, Марбург, Ласса, Мачупо, ВЭЛ, ЛДР, «уличного» бешенства методом ОТ-ПЦР, разработанные ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации.

Каждый набор состоит из комплекта реагентов для проведения реакции обратной транскрипции (комплект № 1) и комплекта реагентов для проведения ПЦР (комплект № 2).

В состав комплекта № 1 входит положительный контрольный образец обратной транскрипции (ПКО-ОТ), состоящий из синтетической РНК, полученной с помощью *in vitro* транскрипции с рекомбинантной плазмидой rGem-T с встроенным специфическим фрагментом соответствующего выбранного гена исследуемого возбудителя, и ВКО, состоящий из «армированной» РНК, полученной на основе модифицированного экспрессионного вектора pET45b+ со встроенными генами созревания и оболочки бактериофага MS2.

Препараты вирусов Эбола, Марбург, Ласса, Мачупо, везикулярного энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ), лихорадки Долины Рифт (ЛДР), «уличного» бешенства были получены из государственной коллекции вирусов ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации.

Обнаружение фрагментов НК возбудителей опасных и особо опасных вирусных инфекций проводилось с использованием ОТ-ПЦР с электрофоретической детекцией полученных результатов.

Приписывание значений концентрации исходным аликвотам ПКО-ОТ соответствующего возбудителя осуществляли на основе данных, полученных при измерении концентрации РНК с помощью набора реагентов Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit (Promega, США) согласно инструкциям производителя и контроля приготовленного рабочего разведения. При

проведении анализа ПКО-ОТ с помощью ОТ-ПЦР определяли соответствие полученного экспериментального интегрального распределения частот ожидаемому биномиальному с помощью критерия Колмогорова-Смирнова [1].

Результаты и обсуждение. В настоящее время в качестве внешних контрольных образцов при проведении различных молекулярно-биологических, генетических и биотехнологических исследований широко используют векторные рекомбинантные плазмиды. В частности, широко используются для комплектации диагностических наборов ПКО на основе коммерческого вектора pGEM®-T («Promega», США) [5].

Для получения ПКО используют препараты НК, выделенные из исследуемого микроорганизма, либо синтетический аналог.

Однако использование ПКО подобного класса не позволяет контролировать этапы пробоподготовки, выделения геномной РНК, проведения обратной транскрипции при проведении ОТ-ПЦР. Более того, при анализе индивидуальной пробы с помощью только ПКО невозможно проконтролировать даже ход проведения амплификации целевого фрагмента ДНК.

Для того чтобы контролировать ход амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью, в практике лабораторных исследований используют дополнительный, так называемый

Таблица 1

Результаты определения размеров фрагментов кДНК геномной РНК вирусов Эбола, Марбург, Ласса, Мачупо, венесуэльского энцефаломиелита лошадей, лихорадки долины Рифт, «уличного» бешенства с использованием ВКО методом ОТ-ПЦР

Вирус	Положительный результат, визуализируются фрагменты размером...	Отрицательный результат, визуализируются фрагменты размером...
Эбола	214 п.о. и 630 п.о.*	630 п.о.*
Марбург	152 п.о. и 630 п.о.*	630 п.о.*
Ласса	295 п.о. и 630 п.о.*	630 п.о.*
Мачупо	326 п.о. и 630 п.о.*	630 п.о.*
Венесуэльский энцефаломиелит лошадей	218 п.о. и 630 п.о.*	630 п.о.*
Лихорадка долины Рифт	313 п.о. и 630 п.о.*	630 п.о.*
Бешенства	380 п.о. и 630 п.о.*	630 п.о.*

Примечание. * – внутренний контрольный образец. В экспериментах использованы биологически активные возбудители в концентрации, соответствующей аналитической чувствительности метода ($1 \cdot 10^3$ усл.ед.·мл⁻¹).

Таблица 2

Результаты оценки влияния ВКО на воспроизводимость показателя аналитической чувствительности метода ОТ-ПЦР при использовании наборов реагентов для выявления РНК возбудителей опасных и особо опасных вирусных инфекций

Набор реагентов для выявления РНК вируса... методом ОТ-ПЦР	Частота выявления, n/N ($\chi \pm \sigma$), при расчётной концентрации $1,0 \cdot 10^3$ усл.ед.·мл ⁻¹	
	без использования внутреннего контрольного образца	с использованием внутреннего контрольного образца
ОТ-ПЦР-Эбола/ВЦ	50/50 (100-2)	50/50 (100-2)
ОТ-ПЦР-Марбург/ВЦ	50/50 (100-2)	50/50 (100-2)
ОТ-ПЦР-Ласса/ВЦ	50/50 (100-2)	50/50 (100-2)
ОТ-ПЦР-Мачупо/ВЦ	50/50 (100-2)	50/50 (100-2)
ОТ-ПЦР-ВЭЛ/ВЦ	50/50 (100-2)	50/50 (100-2)
ОТ-ПЦР-ЛЛДР/ВЦ	50/50 (100-2)	50/50 (100-2)
ОТ-ПЦР-Бешенство/ВЦ	50/50 (100-2)	50/50 (100-2)

Примечание. В экспериментах использованы биологически активные возбудители в концентрации, соответствующей аналитической чувствительности метода ($1 \cdot 10^3$ усл.ед.·мл⁻¹).

Таблица 3

Результаты оценки влияния внутреннего контрольного образца на воспроизводимость показателя аналитической чувствительности метода ОТ-ПЦР при использовании наборов реагентов для выявления синтетической РНК возбудителей опасных и особо опасных вирусных инфекций

Набор реагентов для выявления РНК вируса... методом ОТ-ПЦР	Частота выявления, n/N ($\chi \pm \sigma$), при расчётной концентрации $1,0 \cdot 10^3$ копий·мл ⁻¹ (10 копий на реакцию)	
	без использования внутреннего контрольного образца	с использованием внутреннего контрольного образца
ОТ-ПЦР-Эбола/ВЦ	50/50 (100-2)	50/50 (100-2)
ОТ-ПЦР-Марбург/ВЦ	50/50 (100-2)	50/50 (100-2)
ОТ-ПЦР-Ласса/ВЦ	50/50 (100-2)	50/50 (100-2)
ОТ-ПЦР-Мачупо/ВЦ	50/50 (100-2)	50/50 (100-2)
ОТ-ПЦР-ВЭЛ/ВЦ	50/50 (100-2)	50/50 (100-2)
ОТ-ПЦР-ЛЛДР/ВЦ	50/50 (100-2)	50/50 (100-2)
ОТ-ПЦР-Бешенство/ВЦ	50/50 (100-2)	50/50 (100-2)

Примечание. В экспериментах использованы синтетические РНК возбудителей при расчётной концентрации $1,0 \cdot 10^3$ копий·мл⁻¹ (10 копий на реакцию).

«внутренний контроль». Он представляет собой любой препарат ДНК, несхожий с ДНК искомого микроорганизма. Размер продукта амплификации ВКО подбирают таким образом, чтобы он был больше, чем ампликоны, образуемые от амплификации искомого НК микроорганизма. В результате при внесении ДНК внутреннего контроля в реакционную смесь вместе с испытуемым образцом, независимо от наличия микроорганизма в биологическом образце, внутренний контроль станет причиной образования специфических ампликонов, но значительно более длинных (тяжёлых), чем ампликон микроорганизма. Наличие тяжёлых ампликонов в реакционной смеси будет свидетельством нормального прохождения реакции амплификации и отсутствия ингибиторов. Если ампликоны нужного размера не образовались, но не образовались также и ампликоны внутреннего контроля, можно сделать вывод о наличии в анализируемом образце нежелательных примесей, от которых следует избавиться, но не об отсутствии искомого НК [3].

Внутренний контроль подбирают с учётом конкретного предназначения ПЦР и модификации реакции. При выявлении РНК-содержащих вирусов с помощью ОТ-ПЦР в качестве ВКО используют «армированную» РНК, т.е. РНК, упакованную в белок оболочки бактериофага MS2. Одним из преимуществ данного ВКО является стабильность при хранении даже при комнатной температуре, поскольку РНК защищена от действия нуклеаз белковой оболочкой вириона [6, 7].

С использованием разработанных контрольных образцов была проведена экспериментальная оценка эффективности разработанных наборов реагентов. Результаты выявления РНК вирусов Эбола, Марбург, Ласса, Мачупо, ВЭЛ, ЛДР, бешенства с использованием ВКО методом ОТ-ПЦР, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что при внесении ВКО в биологическую пробу, содержащую определяемый возбудитель, в концентрации, соответствующей аналитической чувствительности метода, в результате проведения ОТ-ПЦР визуализируются фрагменты ДНК, размеры которых характерны для возбудителя и ВКО.

Результаты оценки влияния ВКО на аналитическую чувствительность наборов реагентов при выявлении РНК вирусов Эбола, Марбург, Ласса, Мачупо, ВЭЛ, ЛДР, бешенства методом ОТ-ПЦР, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что ВКО не влияет на аналитическую чувствитель-

ность наборов реагентов при выявлении РНК вирусов Эбола, Марбург, Ласса, Мачупо, ВЭЛ, ЛДР, бешенства методом ОТ-ПЦР. В экспериментах использованы препараты возбудителей, биологическая активность которых (концентрация биологически активного вируса) соответствует аналитической чувствительности метода ОТ-ПЦР.

Данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что ВКО не оказывает влияния и на аналитическую чувствительность наборов реагентов при выявлении синтетической РНК вирусов Эбола, Марбург, Ласса, Мачупо, ВЭЛ, ЛДР, бешенства методом ОТ-ПЦР.

Заключение. Таким образом, для повышения достоверности результатов ПЦР-анализа, а также стандартизации диагностических наборов для выявления возбудителей опасных и особо опасных инфекционных заболеваний обосновано использование контрольных образцов на основе ГИК, которые не оказывают влияния на чувствительность метода при работе как с нативными возбудителями, так и с их синтетическими НК (специализированные контрольные образцы). В дальнейшем указанные контрольные образцы могут быть использованы для разработки стандартных образцов категорий «отраслевой стандартный образец» и «стандартный образец предприятия» при проведении внутрилабораторного контроля в соответствии с требованиями ГОСТ 8.315-91 «Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения».

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. М.: Высшая школа; 1990.
2. Медведева Т.В., Скворцова Р.Г., Кузьменко В.В., Огарков О.Б. ПЦР-

анализ в клинической лаборатории. Учебное пособие. Иркутск: РИО ИГИУВа; 2009.

3. Сизикова Т.Е., Мельникова Е.В., Маноскин А.В., Петров А.А., Мельников Д.Г., Пантюхов В.Б. и др. Использование внешних и внутренних контрольных образцов при постановке полимеразной цепной реакции и обратной транскрипции полимеразной цепной реакции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 3: 41-4.
4. Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методическое пособие. М.: ООО «ДНК-Технология»; 2012.
5. Инструкция по применению набора pGEM®-T и pGEM®-T Easy Vector Systems, part # TM042, Promega (США).

REFERENCES

1. Lakin G.F. *Biometrics [Biometriya]*. Moscow: Vysshaya shkola ; 1990. (in Russian)
2. Medvedeva T.V., Skvortsova R.G., Kuzmenko V.V., Ogarkov O.B. *PCR – analysis in clinical laboratory [PCR-analiz v klinicheskoy laboratorii]*. Uchebnoe posobie. Irkutsk: RIO IGIUVa; 2009. (in Russian)
3. Sizikova T.E., Melnikova E.V., Manoshkin A.V., Petrov A.A., Melnikov D.G., Pantyukhov V.B. et al. The application of external and internal control objects in case of using of polymerase chain reaction and reverse transcription of polymerase chain reaction. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 3: 41-4. (in Russian)
4. Zorina V.V. *Basics of polymerase chain reaction. [Osnovy polimeraznoy tsepnoy reaktsii (PCR)]*. Metodicheskoe posobie. M.: ООО «ДНК-Технология»; 2012. (in Russian)
5. Instructions for use pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, part # TM042, Promega (USA).
6. Wei B., Wei Y., Zhang K., Yang C., Wang J., Xu R. et al. Construction of armored RNA containing long-size chimeric RNA by increasing the number and affinity of the pac site in exogenous rna and sequence coding coat protein of the MS2 bacteriophage. *Intervirology*. 2008; 51(2): 144-50.
7. Yu X.F., Pan J.C., Ye R., Xiang H.Q., Kou Y., Huang Z.C. Preparation of armored RNA as a control for multiplex real-time reverse transcription-PCR detection of influenza virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(3): 837-41.

Поступила 25.03.18

Принята к печати 09.04.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.2-022:579.871.11-092.7-078

Алиева А. А., Харсеева Г. Г., Мангутов Э. О., Головин С. Н.

ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ НЕДИФТЕРИЙНЫХ КОРИНЕБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ С ПАТОЛОГИЕЙ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ; 344022, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Недифтерийные коринебактерии штаммов C. pseudodiphtheriticum, несмотря на отсутствие способности продуцировать токсин, могут быть связаны с развитием воспалительных заболеваний респираторного и урогенитального тракта, кожи, гнойно-септических процессов различной локализации и др. Это свидетельствует о наличии у них факторов патогенности, помимо токсина, которые могут обуславливать адгезивную и инвазивную активность.

Цель исследования – характеристика факторов патогенности (адгезивности, инвазивности) недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта.

Исследованы штаммы недифтерийных коринебактерий (n = 38), выделенные из верхних дыхательных путей от больных с хроническим тонзиллитом (C. pseudodiphtheriticum, n = 9), ангины (C. pseudodiphtheriticum, n = 14), практически здоровых обследованных (C. Pseudodiphtheriticum, n = 15). Способность к адгезии и инвазии коринебактерий исследовали на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Her-2. Количество коринебактерий, адгезированных и инвазированных на клетках Her-2, определяли путём высева смыва на 20%-ный сывороточный агар с последующим подсчётом среднего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл. Электронно-микроскопическое исследование адгезии и инвазии коринебактерий на культуре клеток Her-2 проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии.

У выделенных от практически здоровых лиц штаммов C. pseudodiphtheriticum адгезивность была ниже (p ≤ 0,05), чем

у всех исследованных штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта. Наиболее выраженные адгезивные свойства ($238,3 \pm 6,5$ КОЕ/мл) обнаружены у штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от больных ангиной, по сравнению с таковыми, выделенными от больных хроническим тонзиллитом. Адгезивность и инвазивность у всех исследованных штаммов имели положительную коррелятивную связь. При электронно-микроскопическом исследовании видны коринебактерии, как адгезированные на поверхности клеток Hep-2 и накопившие контрастное вещество, так и инвазированные, электронно-прозрачные. Недифтерийные коринебактерии штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от больных с патологией респираторного тракта (ангина, хронический тонзиллит), обладали более высокой способностью к адгезии и инвазии по сравнению со штаммами *C. pseudodiphtheriticum*, изолированными от практически здоровых лиц. Выраженная способность к адгезии и инвазии, рассматриваемым как факторы патогенности *C. pseudodiphtheriticum*, позволяет им реализовывать свой патогенный потенциал, защищая от действия иммунной системы хозяина и антибактериальных препаратов.

Ключевые слова: *C. pseudodiphtheriticum*; факторы патогенности; адгезия; инвазия.

Для цитирования: Алиева А.А., Харсеева Г.Г., Мангутов Э.Е., Головин С.Н. Факторы патогенности недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (6): 375-378. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-375-378>

Alieva A. A., Harseeva G. G., Mangutov Je. O., Golovin S. N.

FACTORS OF PATHOGENICITY OF CORYNEBACTERIUM NON-DIPHTHERIA, ISOLATED FROM PATIENTS WITH THE PATHOLOGY OF THE RESPIRATORY TRACT

Federal State Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» Ministry of Health of Russia, 344022, Rostov-on-Don, Russian Federation

Corynebacteria non-diphtheria of *C. pseudodiphtheriticum* strains, despite the absence of the ability to produce toxin, can be associated with the development of inflammatory diseases of the respiratory and urogenital tract, skin, purulent-septic processes of various localization, etc. This indicates the presence of other pathogenicity factors, in addition to toxin, which may be adhesive and invasive activity.

Characteristics of pathogenicity factors (adhesiveness and invasiveness) of *Corynebacteria non-diphtheria* isolated from patients with pathology of the respiratory tract.

The strains of *Corynebacteria non-diphtheria* (38) isolated from the upper respiratory tract from patients with chronic tonsillitis (*C. pseudodiphtheriticum* - 9) and angina (*C. pseudodiphtheriticum* - 14 pcs.). As well as practically healthy subjects (*C. pseudodiphtheriticum* - 15 pcs.). The ability for adhesion and invasion of corynebacteria was studied on the culture of the cells of the pharyngeal epithelium Hep-2 carcinoma. The number of corynebacteria, adherent and invaded on Hep-2 cells, was determined by sowing the flush with 20% serum agar, followed by counting the average number of colony forming units (CFU) per 1 ml. Electron microscopic investigation of adhesion and invasion of corynebacteria on the culture of Hep-2 cells was carried out by transmission electron microscopy.

The adhesiveness of strains of *C. pseudodiphtheriticum* isolated from practically healthy individuals was lower ($p \leq 0,05$) than that of all the investigated strains of *Corynebacteria non-diphtheria* isolated from patients with pathology of the respiratory tract. The most pronounced adhesive properties ($238,3 \pm 6,5$ CFU/ml) were found in *C. pseudodiphtheriticum* strains isolated from patients with angina compared with those isolated from patients with chronic tonsillitis. Adhesiveness and invasiveness in all strains studied had a positive correlation. Electron microscopic examination shows corynebacteria, both adherent to the surface of Hep-2 cells and accumulated contrast medium, and invasive, electron-transparent.

Corynebacteria non-diphtheria of *C. pseudodiphtheriticum* strains isolated from patients with respiratory tract pathology (angina, chronic tonsillitis) had a higher ability to adhere and invade than *C. pseudodiphtheriticum* strains isolated from practically healthy individuals. The pronounced ability for adhesion and invasion, considered as pathogenicity factors of *C. pseudodiphtheriticum*, allows them to realize their pathogenic potential, protecting against the action of the host's immune system and antibacterial drugs.

Key words: *C. pseudodiphtheriticum*; pathogenicity factors; adhesion; invasion.

For citation: Alieva A. A., Kharseeva G. G., Mangutov Je. O., Golovin S. N. Factors of pathogenicity of *Corynebacterium non-diphtheria*, Isolated from patients with the pathology of the respiratory tract. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (6): 375-378 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-375-378>

For correspondence: Kharseeva G. G., doctor of medical sciences, professor; e-mail: galinagh@bk.ru

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 21.03.2018
Accepted 12.04.2018

Недифтерийные коринебактерии *Corynebacteria non diphtheriae* (*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium riegelii*, *Corynebacterium striatum* и др.) являются условно-патогенными микроорганизмами – нормальными обитателями кожи и слизистых оболочек человека. Долгое время считалось, что, за исключением *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis*, они не являются патогенными для человека. В настоящее время у нас в стране учёт частоты выделения недифтерийных коринебактерий в бактериологических лабораториях до сих пор не предусмотрен. Однако в последнее десятилетие в зарубежной литературе появились данные, свидетельствующие об их патогенности [1, 2]. Так, установлено, что 53 вида *Corynebacteria*

non diphtheriae имеют медицинское значение и могут вызывать эндокардит, септический артрит, острые заболевания верхних дыхательных путей, гнойно-септические процессы, патологию урогенитального тракта, кожи и др. [2–4]. Имеются сведения о недифтерийных коринебактериях как об агентах госпитальных инфекций, подавляющее большинство которых обладает устойчивостью к антибактериальным препаратам [2, 3]. У коринебактерий обнаружены островки патогенности, включающие ассоциированные с вирулентностью гены, ответственные за продукцию токсина и факторов адгезии [2, 3]. Учитывая, что способностью секретировать токсин обладают среди недифтерийных коринебактерий только *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis*, для определения пато-

генных свойств этих микроорганизмов целесообразной является характеристика их адгезивности. Способность к адгезии коринебактерий связывают с поверхностными структурами бактериальной клетки и, в частности, с белками DIP0733 (или 67-72p) и DIP1281 [5, 6]. Недавно появились данные о том, что белок DIP1281, находящийся на поверхности *Corynebacterium diphtheriae*, может рассматриваться и как фактор инвазивности возбудителя дифтерии, способствующий его проникновению внутрь клеток и тканей [5, 6]. Учитывая этот факт, представляется интересным выяснить, инвазивны ли недифтерийные коринебактерии и насколько этот признак коррелирует у них с адгезивностью.

В связи с этим целью нашего исследования явилась характеристика факторов патогенности (адгезивности и инвазивности) недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта.

Материал и методы. Исследованы штаммы недифтерийных коринебактерий (38 штаммов), выделенные из верхних дыхательных путей (зев, нос) от больных с хроническим тонзиллитом (*C. pseudodiphtheriticum* – 9 штаммов) и ангины (*C. pseudodiphtheriticum* – 14 штаммов) в количестве 10^5 – 10^6 КОЕ/мл и практически здоровых обследованных (*C. pseudodiphtheriticum* – 15 штаммов) в количестве 10^2 КОЕ/мл.

Способность штаммов коринебактерий к адгезии исследовали в соответствии с указаниями L. Ott на нечувствительной к токсину культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 при экспозиции 18 ч [6]. Непосредственно перед опытом коринебактерии культивировали на кровяном агаре (рН 7,6–7,8) в течение 18 ч. Взвесь коринебактерий густотой 10^9 КОЕ/мл вносили в сыровоточный бульон (рН 7,6–7,8), выдерживали в термостате (+37°C) в течение 24 ч. Готовили взвесь дифтерийных микробов в среде RPMI-1640 с добавлением 5% сыворотки эмбриональной бычьей в концентрации 10^6 КОЕ/мл и по 1 мл вносили в лунки с разреженным монослоем клеток Нер-2. Количество коринебактерий, адгезированных на клетках Нер-2, определяли путём высева смыва на 20% сыровоточный агар с последующим подсчётом среднего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл.

Для определения числа инвазивировавшихся коринебактерий в лунки планшета добавляли гентамицин в концентрации $1,2 \pm 0,4$ мг/мл с целью уничтожения коринебактерий, адгезированных на поверхности клеток Нер-2. Затем клетки Нер-2 разрушали в течение 5 мин с помощью 0,025% раствора твина-20, после чего содержимое лунок высевали на 20% сыровоточный агар и подсчитывали количество КОЕ в 1 мл.

Показатели адгезии и инвазии оценивали в (КОЕ $\pm$ m) $\times 10^2$.

Электронно-микроскопическое исследование адгезии и инвазии коринебактерий на культуре клеток Нер-2 проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии в электронном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Фиксацию образцов осуществляли 3,6 % раствором глутарового альдегида в фосфатном буфере (рН 7,2–7,4), постфиксацию – 2% водным раствором тетраоксида осмия (VIII). Контрастирование осуществляли по методу J.Luft и тетраоксидом осмия (VIII) [7]. Изображения получали при помощи CCD-камеры Olympus-SIS Veleta с применением программного обеспечения Olympus iTEM TEM Imaging Platform.

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0).

Результаты. При исследовании адгезивных свойств (см. таблицу) установлено, что у выделенных от практически здоровых обследованных штаммов *C. pseudodiphtheriticum* адгезивность была ниже ($p \leq 0,05$), чем у всех исследованных штаммов недифтерийных коринебакте-

рий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта. Примечательно, что все исследованные штаммы недифтерийных коринебактерий токсин не продуцируют. При этом наиболее выраженные адгезивные свойства ($238,3 \pm 6,5$ КОЕ/мл) обнаружены у штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от больных ангины, по сравнению со штаммами *C. pseudodiphtheriticum*, выделенными от больных хроническим тонзиллитом.

При определении инвазивных свойств (см. таблицу) обнаружены такие же закономерности: среди всех исследованных недифтерийных коринебактерий наименее инвазивными оказались штаммы *C. pseudodiphtheriticum*, выделенные от практически здоровых обследованных. При этом наиболее инвазивными из числа штаммов коринебактерий, изолированных от больных с патологией респираторного тракта, оказались штаммы *C. pseudodiphtheriticum*, выделенные также от пациентов с хроническим тонзиллитом.

При сравнительном анализе интенсивности процессов адгезии и инвазии штаммов коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта, установлено, что адгезия превалировала ($p \leq 0,05$) над инвазией у всех исследованных штаммов. Однако различий в активности этих факторов патогенности у штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от практически здоровых лиц, обнаружить не удалось. Коррелятивная связь интенсивности процессов адгезии и инвазии у штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных как от больных с хроническим тонзиллитом, так и от практически здоровых обследованных, положительна (значения R составили 0,86 и 0,93 соответственно).

При рассмотрении процессов адгезии и инвазии (рис. 1, см. обложку) с помощью электронной микроскопии (увеличение 6000) обнаружены прикрепившиеся к поверхности клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 делящиеся клетки недифтерийных коринебактерий штамма *C. pseudodiphtheriticum*, выделенного от больного с хроническим тонзиллитом. На электронограмме при увеличении 20 000 (рис. 2, см. обложку) видны контуры клетки Нер-2, отростки и микроворсинки на их поверхности. Отчётливо заметны адгезированные на поверхности клеток Нер-2 коринебактерии, накопившие контрастное вещество, а также расположенные внутриклеточно, электронно-прозрачные инвазированные клетки штамма *C. pseudodiphtheriticum*.

Обсуждение. Недифтерийные коринебактерии, несмотря на отсутствие способности продуцировать токсин, могут быть связаны с развитием воспалительных заболеваний респираторного и урогенитального тракта, кожи, гнойно-септических процессов различной локализации и др. Это свидетельствует

Адгезивные и инвазивные свойства штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от различных контингентов обследованных (КОЕ $\pm$ m) $\times 10^2$

Контингент обследованных	Адгезия	Инвазия	Коэффициент корреляции (R)
Больные с патологией респираторного тракта (n = 23)			
хронический тонзиллит (n = 9)	187,0 $\pm$ 8,5*, **	146,8 $\pm$ 6,1*, **	0,78
ангина (n = 14)	238,3 $\pm$ 6,5*, **	215,9 $\pm$ 7,9*, **	0,94
Всего	212,7 $\pm$ 3,1*, **	181,4 $\pm$ 7,9*, **	0,86
Практически здоровые (n = 15)	104,0 $\pm$ 4,3	92,4 $\pm$ 7,0	0,93

Примечание. * – статистическая значимость различий ($p \leq 0,05$) между штаммами *C. pseudodiphtheriticum*, выделенными от больных с патологией респираторного тракта и практически здоровых лиц; ** – статистическая значимость различий ($p \leq 0,05$) между адгезией и инвазией.

о наличии у них иных факторов патогенности, помимо токсина, одним из которых может явиться адгезивная активность. В нашем исследовании штаммы недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*), выделенные от обследованных с патологией респираторного тракта, обладали наиболее высокой степенью адгезивности по сравнению со штаммами *C. pseudodiphtheriticum*, выделенными от практически здоровых лиц, причём этот показатель коррелировал у них со способностью к инвазии. Этот факт особенно интересен, так как ранее считалось, что коринебактерии – неинвазивные микроорганизмы. Подтверждение наличия инвазивной активности у штаммов *C. pseudodiphtheriticum* представлено на электронограмме, где отчетливо видна электронно-прозрачная клетка коринебактерий, внедрившаяся в цитоплазму клеток фарингеального эпителия Нер-2. Возможно, внутриклеточное расположение недифтерийных коринебактерий является одним из факторов, способствующих развитию острого воспалительного процесса в респираторном тракте. Не случайно от больных с ангинами были выделены штаммы коринебактерий с более высокой инвазивной и адгезивной активностью, чем от больных с хроническим тонзиллитом. Внутриклеточное расположение создаёт этим микроорганизмам определённые преимущества, позволяя избежать защитного действия иммунной системы организма, а также антибактериальных препаратов. На основании этого можно предположить, что для реализации патогенных свойств недифтерийных коринебактерий, не обладающих способностью продуцировать токсин, необходимы такие факторы патогенности, как адгезивность и инвазивность.

Заключение. Недифтерийные коринебактерии штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от больных с патологией респираторного тракта (ангина, хронический тонзиллит), обладали более высокой способностью к адгезии и инвазии по сравнению со штаммами *C. pseudodiphtheriticum*, изолированными от практически здоровых лиц. Выраженная способность к адгезии и инвазии, рассматриваемым как факторы патогенности *C. pseudodiphtheriticum*, позволяет

этим микроорганизмам, не продуцирующим токсические субстанции, реализовывать свой патогенный потенциал, защищая их от действия иммунной системы хозяина и антибактериальных препаратов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–7 см. REFERENCES)

1. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А.. Факторы патогенности *Corynebacterium non diphtheriae*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016; (3) 97-104.

REFERENCES

1. Kharseeva G.G., Voronina N.A. Factors of pathogenicity *Corynebacterium non diphtheriae*. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immuno-biologii. 2016; (3) 97-104. (in Russian)
2. Oliveira A., Oliveira L. C., Aburjaile F. Insight of Genus *Corynebacterium*: Ascertaining the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species. J. Frontiers in Microbiology. 2017; Article 1937.
3. Sangal V., Hoskisson P. A. Evolution, Epidemiology and diversity of *Corynebacterium diphtheriae*: new perspectives on an old foe. Infect. Genet. Evol. 2016; (43): 364–70.
4. Sangal V., Blom J., Sutcliffe I.C., Ch. von Hunolstein, Burkovski A., Hoskisson P.A.. Adherence and invasive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains correlates with the predicted membrane-associated and secreted proteome. BMC Genomics. 2015; 16:765.
5. Tauch A., Burkovski A. Molecular armory or niche factors: virulence determinants of *Corynebacterium* species. FEMS Microbiology Letters. 2015; 362 (23).
6. Ott L., Höller M., Rheinlaender J. Strain-specific differences in pili formation and the interaction of *Corynebacterium diphtheriae* with host cells. BMC Microbiology. 2010; 10: 257.
7. Luft J.H. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use, and mechanism of action. The Anatomical Record. 1971; 3 (171): 369-415.

Поступила 21.03.18

Принята к печати 12.04.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.266.6:577.21.083

Щит И.Ю.¹, Игнатов К.Б.^{2,3}, Бикетов С.Ф.¹

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ LAMP И ПЦР-РВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА И МЕЛИОИДОЗА

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, г. Оболенск;

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 117971, Москва;

³Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН, 127422, Москва

Представлены результаты выявления ДНК штаммов *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* с помощью петлевой изотермической амплификации (LAMP) и ПЦР с детекцией продукта в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Показано, что в ПЦР-РВ праймеры надежно выявляли ДНК тех микроорганизмов, к последовательностям которых они были сконструированы. ДНК гетерологичных штаммов указанные праймеры не выявляли. При проведении LAMP ни один набор праймеров не показал высокой аналитической чувствительности и специфичности. Праймеры выявляли ДНК не всех исследованных штаммов, к генам-мишеням которых они были рассчитаны, но были способны направлять синтез фрагментов генов гетерологичных штаммов. При этом результаты повторных экспериментов плохо воспроизводились. Неудачи при проведении LAMP могут быть обусловлены наличием GC-богатых областей в геноме *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* и формированием вторичных структур в изотермических условиях. В случае таких сложных для LAMP матриц, как ДНК *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*, рекомендуется использовать ПЦР-РВ для детекции возбудителей.

Ключевые слова: петлевая изотермическая амплификация; ПЦР в режиме реального времени; *Burkholderia mallei*; *Burkholderia pseudomallei*.

Для корреспонденции: Щит Ирина Юрьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов; e-mail: shchit@obolensk.org

Для цитирования: Щит И.Ю., Игнатов К.Б., Бикетов С.Ф. Сравнительный анализ методов LAMP и ПЦР-РВ для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (6): 378-384 DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-378-384>

Shchit I.Yu.¹, Ignatov K.B.^{2,3}, Biketov S.F.¹

COMPARATIVE ANALYSIS OF LAMP AND REAL TIME PCR METHODS TO DETECT PATHOGENS OF GLANDERS AND MELIODOSIS.

¹State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia;

²The Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

³All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology

Results of detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* DNA strains by LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) and Real Time PCR are shown. It has been revealed that, in Real Time PCR, primers steadily detected DNA of those microorganism for the sequences of which they were designed. The above mentioned primers did not detect DNA of heterologous strains. During LAMP method no set of primers showed high analytical sensitivity and specificity. Primers did not detected DNA of all the strains under research to target genes of which they were not intended, but they were capable of directing the synthesis of fragments of genes of heterologous strains. Furthermore, it was difficult to reach the same results during repeated experiments. Failures during LAMP may occur due to existence of GC-rich regions in *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* genomes and due to emergence of secondary structures in isothermal conditions. It is recommended to use Real Time PCR in order to detect pathogens, in case of such matrixes as *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* DNAs which are very complicated for LAMP.

Key words: loop mediated isothermal amplification of DNA; LAMP, Real Time PCR; *Burkholderia mallei*; *Burkholderia pseudomallei*.

For correspondence: Shchit I.Yu., Ph.D. (Biology), Senior Researcher of the department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, e-mail: shchit@obolensk.org

For citation: Shchit I.Yu., Ignatov K.B., Biketov S.F. Comparative analysis of LAMP and Real Time PCR methods to detect pathogens of glanders and meliodosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (6): 378-384 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-378-384>

Information about authors:

Shchit I. Yu., <http://orcid.org/0000-0001-9871-8018>

Ignatov K.B., <https://orcid.org/0000-0001-8900-5278>

Biketov S.F., <http://orcid.org/0000-0003-1179-6895>

Acknowledgment. The work was supported by the Sectoral Scientific Program of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.

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

Received 26.03.2018
Accepted 13.04.2018

Burkholderia mallei и *Burkholderia pseudomallei* относятся к грамотрицательным бактериям, которые являются возбудителями сапа и мелиоидоза соответственно. *B. mallei* патогенна для человека и животных. Сап – заболевание, которое в первую очередь поражает непарнокопытных (лошадей, мулов и ослов). Случаи заболевания регистрируются в странах Африки, Азии, Ближнего Востока, Центральной и Южной Америки [1]. Человек заражается при контакте с больными животными. Клинические проявления заболевания зависят от способа заражения. При сапе наблюдаются лихорадка, пневмония, абсцессы в печени, селезенке, на коже и мышцах, бактериемия [2].

B. pseudomallei также патогенна для человека и животных и является возбудителем мелиоидоза у людей. Заражение мелиоидозом происходит в результате контакта с заражённой почвой и водой [3]. Источником инфекции также являются сельскохозяйственные и дикие животные. Единичные случаи и вспышки мелиоидоза встречаются практически на всех континентах. Симптомы мелиоидоза похожи на симптомы, описанные для сапа, но, кроме контактного и воздушно-капельного способов заражения, существует также алиментарный [4]. *B. pseudomallei* является основной причиной сепсиса в Северной Австралии [5] и бактериальной пневмонии в Таиланде [6]. Даже в случае интенсивной антимикробной терапии смертность как при сапе, так и при мелиоидозе высокая (до 50%) [7]. При отсутствии лечения смертность достигает 95% [8].

Кроме того, оба микроорганизма представляют собой потенциальные агенты биотерроризма: для инфицирования требуются низкие дозы, заболеваемость и смертность высокие, возбудители устойчивы ко многим антибиотикам, их можно распространять в виде аэрозоля [9].

Для диагностики сапа и мелиоидоза применяются ми-

кробиологические методы, иммунологические тесты на основе моноклональных антител и молекулярные методы для идентификации нуклеотидных последовательностей возбудителей. Существующие бактериологические и иммунологические методы идентификации *B. mallei* и *B. pseudomallei* недостаточно эффективны для экспресс-диагностики. Имеются сведения о применении ПЦР с детекцией продукта в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с праймерами к последовательностям гена *fliP*, который кодирует белок флагеллин Р, что позволило выявить оба микроорганизма в клинических образцах [10, 11]. Также разработаны ПЦР тест-системы, в том числе мультиплексные, для детекции и дифференциации *B. mallei* и *B. pseudomallei* [12, 13]. Сложность при разработке подобных тестов заключается в том, что генетически *B. mallei* и *B. pseudomallei* очень близки: более 99% их последовательностей гомологичны, поэтому дифференцировать их друг от друга с помощью молекулярно-генетических методов затруднительно.

Относительно новый метод амплификации ДНК – LAMP (Loop-mediated isothermal AMPlification, или петлевая изотермическая амплификация) позволяет провести быструю высокоспецифичную диагностику вирусных и бактериальных инфекций. Он чувствителен, прост, не требует сложного оборудования и больших затрат времени. Этот метод, разработанный Т. Notomi и соавт. [14, 15], представляет собой реакцию изотермической амплификации выбранной последовательности ДНК. Реакция синтеза новых цепей ДНК сопровождается смещением (вытеснением) старых. Амплификацию и детектирование гена можно осуществить за одну стадию путём инкубации смеси образцов, праймеров, ДНК-полимеразы с функцией вытеснения цепей и субстратов при постоянной температуре (около 65°C). Эффективность ам-

плификации очень высока, в течение 15–60 мин ДНК амплифицируется 10^9 – 10^{10} раз. Высокая специфичность достигается за счёт использования 2–3 пар праймеров на ген-мишень.

Имеется несколько сообщений о применении LAMP для детекции *B. mallei*. Публикации на эту тему появились совсем недавно. В 2016 г. вышла статья иранских ученых [16], в которой описывалось применение метода LAMP для детекции *B. mallei*. В качестве мишени для конструирования праймеров был выбран ген интегразы *B. mallei*. Хотя для тестирования праймеров использовали всего 2 штамма *B. mallei* и 2 гетерологичных штамма *B. pseudomallei* и *Pseudomonas aeruginosa*, авторы предлагают разработанный ими набор применять для ранней диагностики сапа. В 2017 г. появилась публикация V. Pal и соавт. [17], посвящённая применению LAMP для детекции *B. mallei*. Авторы сообщают, что с помощью данного метода удалось выявить 1 пг геномной ДНК возбудителя и $5,5 \times 10^3$ КОЕ/мл *B. mallei* в крови, и рассматривают LAMP как альтернативу ПЦР для выявления сапа в эндемичных районах.

Сведений об использовании LAMP для выявления ДНК *B. pseudomallei* также немного. Группа исследователей [18] для детекции *B. pseudomallei* с помощью LAMP использовала в качестве мишени кластер генов системы секретиции III типа (TTS1). Амплификация показала высокую чувствительность и специфичность – ДНК *B. pseudomallei* выявлена в 10 из 10 образцов с возбудителем мелиоидоза, в случае 5 образцов *B. thailandensis* и 5 образцов *B. mallei* был получен отрицательный результат. При обнаружении ДНК *B. pseudomallei* в образцах от больных диагностическая точность LAMP составила 87,5%, но метод был неэффективен при исследовании образцов крови (из 44 положительных образцов с помощью LAMP выявлен только 1 образец).

Целью данной работы является оценка оригинальных праймеров для выявления ДНК штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* с помощью LAMP и ПЦР-РВ.

Для расчета LAMP-праймеров с целью идентификации *B. mallei* и *B. pseudomallei* мы использовали несколько мишеней: область *fliP/IS407A* *B. mallei*, ген *fliP* *B. pseudomallei*, ген *Orf12* области кластера генов TTS1 *B. pseudomallei*. В работе использовали 2 фермента с функцией замещения цепи: Bst-полимеразу 2.0 WarmStart («New England Biolabs», США) и SD-полимеразу [19].

Материал и методы. Штаммы бактерий. В работе использованы 12 штаммов *Burkholderia mallei*: *B. mallei* 10230, *B. mallei* 5/5 RP-4, *B. mallei* Загреб, *B. mallei* Иванович, *B. mallei* Муксувар P-5, *B. mallei* P-1, *B. mallei* P-5, *B. mallei* C5, *B. mallei* Z-12, *B. mallei* Ц-4, *B. mallei* t-12, *B. mallei* B120; 11 штаммов *Burkholderia pseudomallei*: *B. pseudomallei* 100, *B. pseudomallei* 61503, *B. pseudomallei* 101, *B. pseudomallei* 51274, *B. pseudomallei* 115, *B. pseudomallei* 116, *B. pseudomallei* 60913, *B. pseudomallei* 301, *B. pseudomallei* 102, *B. pseudomallei* 135, *B. pseudomallei* 132 из коллекции ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. В исследованиях также использовали *F. tularensis* 15/10, *B. abortus* 19, *Y. pestis* И-3449, *Y. pseudotuberculosis* C79, *Y. enterocolitica* C-126, *B. anthracis* СТИ-1, *V. cholerae* eltor M878, *E. coli* JM83, *L. pneumophila* 33152 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk». Все работы проводили в соответствии с требованиями безопасности¹.

Культивирование. Культуры патогенных буркхолдерий и близкородственных микроорганизмов из ампул высевали в бульон Хоттингера с 5% содержанием глицерина по ГОСТу 6259-75, pH $7,0 \pm 0,2$, и инкубировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 18–24 ч. Затем культуры пересевали на агар Хоттингера с 5% содержа-

нием глицерина и инкубировали в течение 24–48 ч при $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Для культивирования гетерологичных микроорганизмов использовали общепринятые питательные среды для соответствующих видов (FT-агар – для *F. tularensis*; бульон Хоттингера и агар Хоттингера – для *B. anthracis*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *E. coli*; бруцеллагар – для бруцелл; легионелбакагар – для легионелл). Инкубацию посевов культур проводили при 37°C и при 28°C – для *Y. pestis*.

Для дальнейшего использования в ПЦР готовили взвеси каждого штамма в концентрации, соответствующей 10 МЕ по стандартному образцу мутности бактериальных взвесей (комплект БАК) СОП № 1-98 ООО «ОРМЕТ», Екатеринбург, эквивалентной 110^9 м. кл./мл, которые затем разводили 0,9% раствором натрия хлорида от $1 \cdot 10^6$ м. кл./мл до концентрации $1 \cdot 10^8$ м. кл./мл для *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

Из каждой культуры готовили отдельно суспензии в 2 мл 0,9% раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 ед. ГИСК им. Л. А. Тарасевича, что соответствует $1 \cdot 10^8$ м. кл./мл для *B. anthracis*, $1 \cdot 10^9$ м. кл./мл для *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Brucella*, *Legionella* и *E. coli*, $5 \cdot 10^{10}$ м. кл./мл для *F. tularensis*. Суспензии с гетерологичными микроорганизмами разводили до концентрации $1 \cdot 10^6$ м. кл./мл.

Подготовка проб для ПЦР и LAMP. Для обеззараживания в пробирки с тестируемыми микробными взвесями добавляли мертиолат натрия до конечной концентрации 0,01% (1:10000) и прогревали на водяной бане при $56 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Затем в отдельные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл переносили по 100 мкл обработанных мертиолатом натрия проб, добавляли лизирующий буфер на основе 6М гуанидинизотиоцианата в объёме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубировали 30 мин при $65 \pm 1^\circ\text{C}$. После выполнения данного этапа материал считали обеззараженным.

Выделение ДНК. ДНК выделяли с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-В» (ОАО «ИнтерЛабСервис»). Работу проводили в соответствии с инструкцией к указанному набору.

Конструирование праймеров. Праймеры были рассчитаны с помощью программы Primer Explorer 3 (<http://primerexplorer.jp/elamp3.0.0/index.html>) и проверены на специфичность с использованием программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Праймеры синтезированы и очищены компанией «Синтол», Москва. Последовательности праймеров представлены в таблице.

Постановка LAMP. При использовании SD-полимеразы реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 1х SD-буфер («РусЭнзим», Россия), 40 ед. SD-полимеразы («РусЭнзим», Россия), 3,5 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ каждого дНТФ, 4 праймера: 0,2 мкМ F3, 0,2 мкМ B3, 0,8 мкМ VIP, 0,8 мкМ FIP, 5 мкл матрицы. Реакцию проводили при 60°C в течение 60 мин с предварительным прогревом при 92°C в течение 2 мин на амплификаторе Терцик («ДНК-Технология»).

При использовании Bst-полимеразы реакционная смесь содержала 0,8 мкМ каждого FIP- и VIP-праймеров, 0,2 мкМ каждого F3- и B3-праймеров, 1х реакционный буфер для изотермической амплификации, содержащий 20 мМ Трис-HCl, 50 мМ KCl, 10 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ MgSO_4 , 0,1% Твин-20 («New England BioLabs», США), 0,5 мМ каждого дНТФ, 0,8 М бетаина, 2 ед. полимеразы Bst 2.0 WarmStart («New England BioLabs», США), 1–5 мкл образца, воды до конечного объёма реакции 25 мкл. Реакцию собирали на льду. Образцы инкубировали на амплификаторе Терцик («ДНК-Технология») при 63°C в течение 60 мин.

Визуализация продуктов LAMP. Электрофорез продуктов LAMP проводили в 1,0% агарозном геле в ТАЕ-буфере, гели окрашивали с помощью бромистого этидия. Визуализацию осуществляли на УФ-трансиллюминаторе при длине волны 260 нм.

Постановка ПЦР-РВ. Реакцию выполняли на приборе для ПЦР-РВ Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems (США) в следующем режиме: первичная денатурация: 95°C – 10 мин, далее 40 циклов: 95°C – 15 с, 60°C – 1 мин, считывание

¹ Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности: методические указания МУ 1.3.2569-09. – М., 2009.

Праймеры для детекции *B. pseudomallei* и *B. mallei* с помощью LAMP и ПЦР-РВ

№ п/п	Название праймера	Последовательность праймера	Мишень
1	F3-Bm252	5'-gacgatgatccgcgtgaag-3'	<i>fliP/IS407A</i> <i>B. mallei</i>
2	B3-Bm252	5'-ggactacaacgagcaaaaggc-3'	
3	FIP-Bm252	5'-gccgcttccaggagtggttt-tcgttgacctgccccct-3'	
4	BIP-Bm252	5'-gtcccggttgcccgatgt-cgcacagcgactgaac-3'	<i>fliP/IS407A</i> <i>B. mallei</i>
5	F3-Bm21	5'-gcgtgaagctcgttgacct-3'	
6	B3-Bm21	5'-ggactacaacgagcaaaaggc-3'	
7	FIP-Bm21	5'-gccgcttccaggagtggttt-ccccctcgataggccaat-3'	<i>IS407A-fliP</i> <i>B. mallei</i>
8	BIP-Bm21	5'-gtcccggttgcccgatgt-cgcacagcgactgaac-3'	
9	F3-Bm26	5'-caggttagaagcagcg-3'	
10	B3-Bm26	5'-cgatgctgtcgttcctgc-3'	<i>IS407A-fliP</i> <i>B. mallei</i>
11	FIP-Bm26	5'-agaagcgtttacggaacagca-ctgcacagttccttgaccg-3'	
12	BIP-Bm26	5'-tactagactccgctgcccc-cgatgctgctgatgatgacg-3'	
13	F3-Bma54	5'-gcttccttcagaaacccgat-3'	<i>IS407A-fliP</i> <i>B. mallei</i>
14	B3-Bma54	5'-ggcagcactattcgttgag-3'	
15	FIP-Bma54	5'-ggccagccggagtgtagtaag-ttccgtaaacgcttcttca-3'	
16	BIP-Bma54	5'-ctgttttagggggcaggtcac-gacgatgctgctgctcac-3'	<i>Orf12</i> области кластера генов <i>TTS1</i> <i>B. pseudomallei</i>
17	F3-Bp228	5'-caggttgatgctggaggc-3'	
18	B3-Bp228	5'-tcgaacatttcgtcgtcg-3'	
19	FIP-Bp228	5'-ccgcccgtgttgatcgat-gaacctgctgctctatgcg-3'	<i>Orf12</i> области кластера генов <i>TTS1</i> <i>B. pseudomallei</i>
20	BIP-Bp228	5'-ggcagggaattggccgatctg-ttcgataatgctctgccg-3'	
21	F3-Bp27	5'-attcaggttgatgctggagg-3'	
22	B3-Bp27	5'-cgataatgctctgccgc-3'	<i>Orf12</i> области кластера генов <i>TTS1</i> <i>B. pseudomallei</i>
23	FIP-Bp27	5'-ccgcccgtgttgatcgat-cgaacctgctgctctatgc-3'	
24	BIP-Bp27	5'-atccggttgccgtttatgctcg-taatggcgcaagcagatcgg-3'	
25	F3-Bp1	5'-ctgcggcgctcaactc-3'	<i>fliP B. pseudo-</i> <i>mallei</i>
26	B3-Bp1	5'-tgagggaagaggcgagc-3'	
27	FIP-Bp1	5'-acgacagcatgtagcagc-acggcgccagcagccta-3'	
28	BIP-Bp1	5'-ttcacgaggatcatcgtgc-gacgagcacctgattcgg	

флуоресценции; построение кривой плавления в интервале от 60 до 95°C. Для постановки ПЦР-РВ использовали набор реактивов для проведения ПЦР-РВ с красителем SYBR Green I («Синтол», Москва). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 1х буфер Б, 1,25 ед. Таq-полимеразы, 2,5 мМ MgCl₂, 0,25 мМ каждого дНТФ, праймеры F3 + B3 0,4 мМ каждого или праймеры FIP + BIP 0,4 мМ каждого, 5 мкл матрицы. Накопление специфического продукта амплификации – участка ДНК *B. mallei* или *B. pseudomallei* – детектировалось по каналу FAM/SYBR Green dye. Анализ данных (оценку эффективности реакции, анализ кривой плавления и вычисление температуры плавления (Tm) ампликона осуществляли с помощью программного обеспечения Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems.

Воспроизводимость. Все эксперименты повторяли не менее 3 раз, в том числе выращивание штаммов, выделение ДНК, постановку LAMP и детекцию продукта.

Результаты. Выбор мишеней и конструирование праймеров для изотермической амплификации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза. Показано, что удобными мишенями для дифференциальной детекции патогенных буркхолдерий с помощью ПЦР служат ген *fliP*, кодирующий белок флагеллин Р, и инсерционный элемент IS407A. Это обусловлено тем, что хотя инсерционный элемент IS407A присутствует в геноме обоих микроорганизмов, только у *B. mallei* он встраивается в последовательность гена флагеллина Р, меняет ориентацию гена *fliP* на противоположную, нарушает его экспрессию, и *B. mallei* теряет подвижность [20]. У *B. pseudomallei* вставки IS407A внутри гена *fliP* нет, кроме того, последовательности гена *fliP* у *B. pseudomallei* и других видов буркхолдерий, таких как *B. ceracia*, различаются. Область *fliP/IS407A* является уникальной для вида *B. Mallei*, и, как показали D. Gilling и соавт. [21]

с помощью пиросеквенирования, определение наличия или отсутствия последовательности IS407A в гене *fliP* позволяет надёжно дифференцировать эти два вида. Данные пиросеквенирования были использованы для конструирования праймеров с целью детекции возбудителей сапа и мелиоидоза.

В результате были синтезированы несколько наборов праймеров, направляющих синтез фрагмента участка *fliP/IS407A B. mallei* – Bm252 и Bm21, Bm26 и Bma54, а также Bp1 к участку гена *fliP* для детекции *B. pseudomallei*. Также для выявления ДНК *B. pseudomallei* в качестве мишени использовали ген *Orf12* области кластера генов *TTS1 B. pseudomallei*, который является специфичным для данного микроорганизма. К фрагменту этого гена был рассчитан набор праймеров Bp27.

Амплификация фрагментов ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* с помощью ПЦР-РВ.

Первоначально провели оценку специфичности праймеров с помощью ПЦР *in silico* (<http://insilico.ehu.es/PCR/Amplify.php>). Полученные данные показали, что все наборы обладают способностью направлять синтез уникальных участков на хромосомной ДНК тех возбудителей, к ДНК-последовательностям которых они рассчитаны. Внешние праймеры F3B3 из наборов Bm252, Bm21, Bm26, Bma54 могли направлять синтез фрагмента более 1 тысячи пар нуклеотидов (т. п. н.) с ДНК некоторых штаммов *B. mallei*, но так как в LAMP используются 4 праймера, за счёт чего специфичность синтеза повышается и возможность синтеза другого продукта практически исключена, наработка фрагмента большой длины маловероятна. *In silico* все подобранные наборы праймеров не инициировали амплификацию фрагментов ДНК других буркхолдерий, сиквенсы которых находятся в базе данных GenBank.

Для проверки специфичности внутренних и внешних праймеров всех наборов для выявления ДНК *B. pseudomallei* и *B. mallei* провели ПЦР-РВ. Детекцию ПЦР-продукта осуществляли с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I по накоплению флуоресцентного сигнала и температуре плавления (Tm) синтезированного ампликона. Для этого после амплификации выполняли анализ кривой плавления. Самыми удачными наборами оказались Bma54 к мишени *IS407A-fliP B. mallei* и Bp27 на ген *Orf12* области кластера генов *TTS1 B. pseudomallei*. При использовании как F3-B3, так и FIP-BIP пар праймеров этих наборов флуоресцентные сигналы были зарегистрированы только при амплификации специфического продукта, синтез которого с ДНК-мишени направляла соответствующая пара праймеров. На кривой плавления были детектированы единичные пики, соответствующие плавлению специфического продукта, т. е. в анализируемых образцах синтезировался ожидаемый фрагмент с соответствующей пары праймеров. Сигналов с ДНК гетерологичных штаммов микроорганизмов получено не было. Праймеры других наборов такой специфичностью не обладали, они могли инициировать амплификацию фрагментов ДНК других микроорганизмов. При анализе продуктов ПЦР-РВ с помощью гель-электрофореза в геле были детектированы единичные полосы на ожидаемом уровне: 202 п. н. в случае праймеров Bma54-F3-B3 (рис. 1), 147 п. н. при использовании Bma54-FIP-BIP, 194 п. н. в случае праймеров Bp27-F3-B3 (рис. 2) и 139 п. н. при синтезе с праймеров Bp27- FIP-BIP.

При использовании других праймеров помимо образования специфического продукта синтезировались неспецифические продукты, отличающиеся от фрагмента ожидаемой длины, либо наблюдалась амплификация ДНК гетерологичных штаммов.

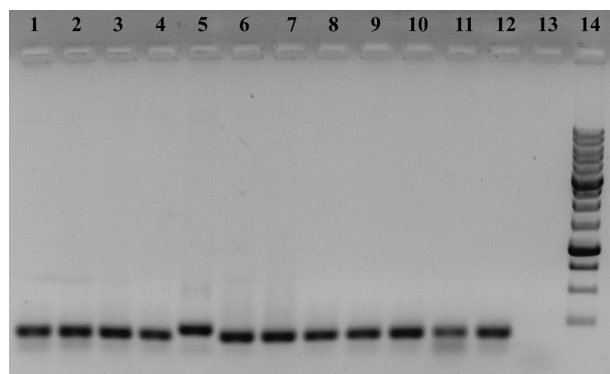


Рис. 1. Обнаружение фрагмента гена *IS407A-flpP* *B. mallei* с помощью праймеров Bma54 и ПЦР-РВ.

1 – ДНК *B. mallei* 10230; 2 – ДНК *B. mallei* 5/5 RP-4; 3 – ДНК *B. mallei* Загреб; 4 – ДНК *B. mallei* Иванович; 5 – ДНК *B. mallei* Муксувар P-5; 6 – ДНК *B. mallei* P-1; 7 – ДНК *B. mallei* P-5; 8 – ДНК *B. mallei* C5; 9 – ДНК *B. mallei* Z-12; 10 – ДНК *B. mallei* Ц-4; 11 – ДНК *B. mallei* t-12; 12 – ДНК *B. mallei* B120; 13 – отрицательный контроль ПЦР (вода); 14 – маркер молекулярной массы (250—10 000 п. н.).

LAMP амплификация фрагментов ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* с помощью SD-полимеразы

Результаты детекции *B. mallei* и *B. pseudomallei* с использованием LAMP отличались от результатов ПЦР-РВ. Ни один набор праймеров для LAMP не показал высокой аналитической чувствительности и специфичности. Например, с помощью набора Bm252 было выявлено 8 штаммов возбудителя сапа из 12 исследованных. Этот набор также направлял синтез с ДНК трех штаммов *B. pseudomallei*. Аналогичные результаты были получены при работе с тремя другими наборами Bma54, Bm21 (рис. 3) и Bm26: они не выявляли ДНК всех исследованных штаммов *B. mallei* и были способны направлять синтез фрагментов генов гетерологичных штаммов. При этом в некоторых случаях выход LAMP-продуктов был низким, а результаты повторных экспериментов плохо воспроизводились.

При детекции мелиоидоза наибольшей чувствительностью обладали 2 набора: Bp1 и Bp27: они выявили 9 и 8 штаммов возбудителя соответственно. Выход продуктов реакции также

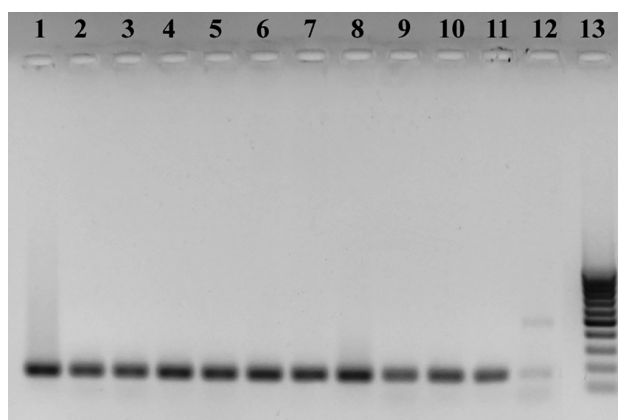


Рис. 2. Обнаружение фрагмента гена *Orf12* области кластера генов TTS1 *B. pseudomallei* с помощью праймеров Bp27 и ПЦР-РВ.

1 – ДНК *B. pseudomallei* 100; 2 – ДНК *B. pseudomallei* 61503; 3 – ДНК *B. pseudomallei* 101; 4 – ДНК *B. pseudomallei* 51274; 5 – ДНК *B. pseudomallei* 115; 6 – ДНК *B. pseudomallei* 116; 7 – ДНК *B. pseudomallei* 60913; 8 – ДНК *B. pseudomallei* 301; 9 – ДНК *B. pseudomallei* 102; 10 – ДНК *B. pseudomallei* 135; 11 – ДНК *B. pseudomallei* 132; 12 – отрицательный контроль ПЦР (вода); 13 – маркер молекулярной массы (100–1000 п. н.).

был низким, а результаты экспериментов плохо воспроизводились.

Геномы *B. mallei* и *B. pseudomallei* отличаются высоким содержанием GC-пар. В литературе приводятся данные о том, что введение в реакционную смесь бетаина усиливает специфичность праймеров и выход ампликона при синтезе GC-богатых участков ДНК, образование нежелательных продуктов при этом снижается [22–24]. Амплификация GC-богатых областей ДНК затруднена из-за недостаточной денатурации цепей ДНК и образования вторичных структур, а бетаин способствует лучшему разделению цепей [22]. Тем не менее в наших экспериментах введение разных количеств бетаина в реакционную смесь никакого эффекта не оказало.

Проведение LAMP с использованием Bst 2.0 WarmStart-полимеразы. В параллельных экспериментах использовали полимеразу Bst 2.0 WarmStart («New England Biolabs»). Результаты LAMP с использованием Bst 2.0 WarmStart не совпадали с результатами изотермической амплификации с применением SD-полимеразы и отличались от результатов ПЦР-РВ. В ходе электрофореза наблюдали иногда появление в отрицательном контроле (вода) большого количества неспецифического продукта LAMP, вероятно, вследствие образования димеров праймеров (рис. 4, дорожка 13).

При работе с SD-полимеразой образования димеров праймеров не наблюдали ни разу. Разными исследователями отмечалось, что Bst 2.0 WarmStart может работать в отсутствие матрицы и осуществлять неспецифический синтез ДНК (до-страивать димеры праймеров). Следует отметить, что Bst 2.0 WarmStart могла направлять синтез с праймеров, при использовании которых с SD-полимеразой ампликонов получено не было. Как и в случае с SD-полимеразой, результаты повторных экспериментов воспроизводились плохо.

Обсуждение. Одним из основных преимуществ LAMP является отсутствие необходимости в сложном оборудовании. Для проведения амплификации требуется лишь водяная баня. Визуализация продукта тоже может не требовать оборудования. Всё это делает LAMP очень привлекательной для использования в малооснащённых лабораториях и полевых условиях.

Следует отметить, что критическими моментами для подбора праймеров являются несколько параметров: наличие GC-богатых областей, температура плавления (T_m) праймеров, стабильность последовательности праймеров, формирование вторичных структур и дистанция между праймерами [25]. Можно предположить, что неудачи при работе с некоторыми

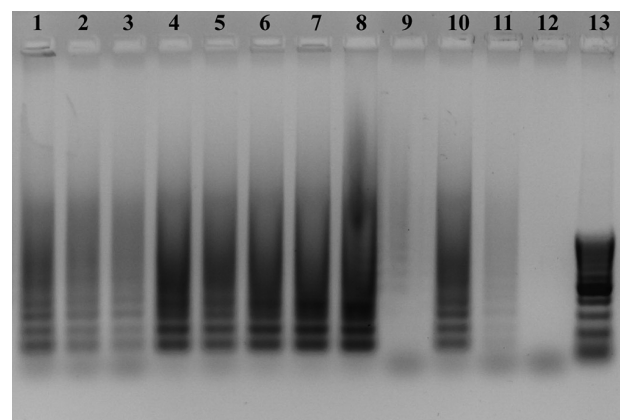


Рис. 3. Обнаружение фрагмента гена *flpP/IS407A* *B. mallei* с помощью LAMP праймеров Bm21 и SD-полимеразы.

1 – ДНК *B. mallei* 10230; 2 – ДНК *B. mallei* 5/5 RP-4; 3 – ДНК *B. mallei* Загреб; 4 – ДНК *B. mallei* Иванович; 5 – ДНК *B. mallei* Муксувар P-5; 6 – ДНК *B. mallei* P-1; 7 – ДНК *B. mallei* P-5; 8 – ДНК *B. mallei* C5; 9 – ДНК *B. mallei* Z-12; 10 – ДНК *B. mallei* Ц-4; 11 – ДНК *B. mallei* t-12; 12 – отрицательный контроль ПЦР (вода); 13 – маркер молекулярной массы (100–1000 п. н.).

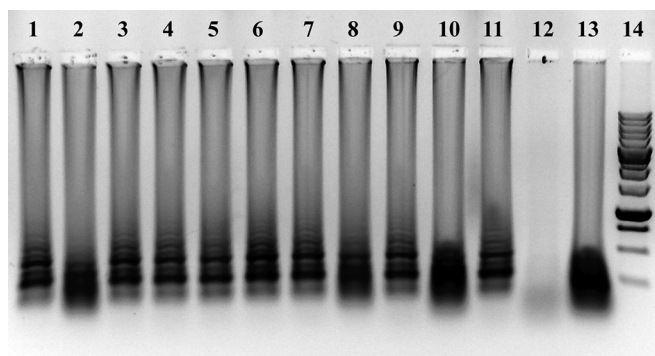


Рис. 4. Обнаружение фрагмента гена *Orf12* области кластера генов TTS1 *B. pseudomallei* с помощью праймеров Bp27 и полимеразы Bst 2.0 WarmStart («New England Biolabs»).

1 – ДНК *B. pseudomallei* 100; 2 – ДНК *B. pseudomallei* 61503; 3 – ДНК *B. pseudomallei* 101; 4 – ДНК *B. pseudomallei* 51274; 5 – ДНК *B. pseudomallei* 115; 6 – ДНК *B. pseudomallei* 116; 7 – ДНК *B. pseudomallei* 60913; 8 – ДНК *B. pseudomallei* 301; 9 – ДНК *B. pseudomallei* 102; 10 – ДНК *B. pseudomallei* 135; 11 – ДНК *B. pseudomallei* 132; 12, 13 – отрицательный контроль ПЦР (вода); 14 – маркер молекулярной массы (250–10 000 п. н.).

наборами праймеров могут быть обусловлены дизайном олигонуклеотидов или особенностями петлевой изотермической реакции (участие в реакции 4 праймеров, 2 из которых имеют сложное строение). К сожалению, нельзя исключить возможность формирования вторичных структур, особенно внутренними праймерами FIP и VIP, так как они длиннее и имеют более сложную структуру, чем внешние праймеры.

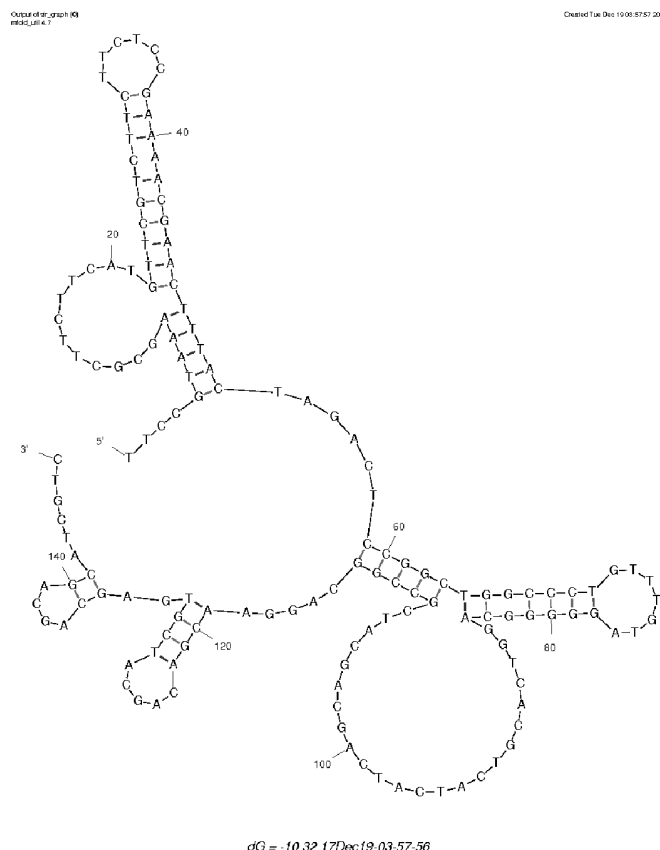


Рис. 5. Вторичные структуры, формируемые фрагментом гена *IS407A-flpP* *B. mallei*, на который с помощью программы Primer Explorer 5 рассчитаны праймеры Bma54.

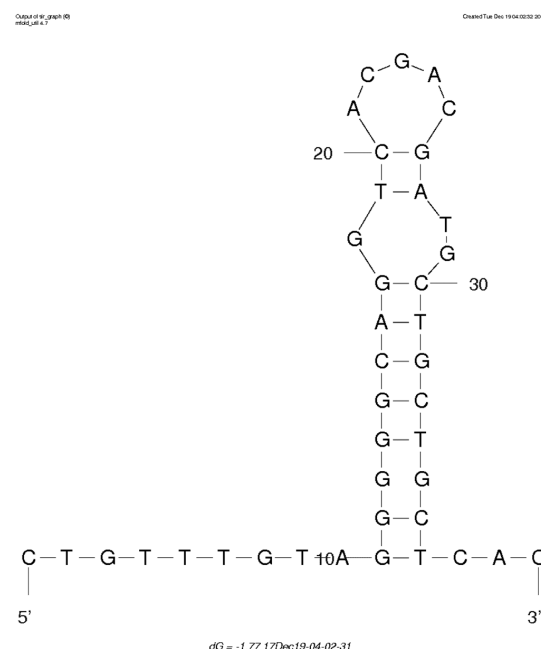


Рис. 6. Вторичные структуры, формируемые внутренним праймером VIP-Bma54.

По-видимому, существенную роль играет содержание GC-пар в геноме возбудителя инфекции. Например, содержание GC-пар в геномах *B. anthracis* составляет 35%, и при детекции этого микроорганизма с помощью SD-полимеразы был получен положительный результат [26]. Содержание GC-пар в геномах *B. mallei* и *B. pseudomallei* – около 69–70%. Изотермическая амплификация протекает при довольно низкой температуре, в результате чего полной денатурации молекул ДНК не происходит. Возможно, при низком содержании GC-пар процесс денатурации ДНК в изотермических условиях проходит лучше, формирование гантелеобразных структур в первые моменты реакции осуществляется успешнее, а сама изотермическая амплификация протекает с большей эффективностью.

Для выяснения причин неудач при постановке LAMP был проведён анализ формирования вторичных структур на матрице и праймерах с помощью программы mfold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>). Образование шпилек и димеров наблюдалось у всех праймеров и ампликонов (рис. 5, 6).

Например, ампликон, синтезированный с внутренних праймеров набора Bma54 на фрагмент гена *IS407A-flpP* *B. mallei*, при 63°C образует несколько вторичных структур. Одна из таких структур представлена на рис. 5 ($\Delta G = -10,32$ ккал/моль). На рис. 6 показана структура, образованная праймером VIP-Bp1 ($\Delta G = -1,77$ ккал/моль). Нельзя исключить, что наработке LAMP-продукта в изотермических условиях помешали вторичные структуры, образовавшиеся на матрице и праймерах. Возможно, успешная амплификация проходила в том случае, когда стабильность вторичных структур была более низкой.

Попытки избавиться от вторичных структур с помощью реагентов, которые используют при проведении ПЦР, не дали успехов. В некоторых публикациях сообщается, что добавление 0,8 М бетаина увеличивало чувствительность реакции и усиливало эффективность LAMP-теста [27]. Предполагается, что бетаин способен облегчать амплификацию GC-богатых матриц и предотвращать образование вторичных структур GC-богатых областей ДНК-последовательностей из-за уменьшения межплоскостных взаимодействий оснований. Однако S. Chen и соавт. [28] обнаружили, что бетаин не оказывал влияния на амплификацию. В проведённых нами

исследованиях положительного действия бетаина на реакцию амплификации также не обнаружено.

Существует мнение, что степень очистки внутренних праймеров FIP и VIP очень важна для формирования первичных гантелеобразных структур, поэтому рекомендуется использовать очистку с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [29]. Отчасти неудачи в детекции возбудителей сапа и мелиоидоза при работе с SD-полимеразой можно объяснить недостаточной чистотой внутренних праймеров, но на эффективность ПЦР-PV и LAMP с Bst 2.0 WarmStart степень очистки праймеров не влияла.

Успех изотермической амплификации также зависит от активности ферментов в вытеснении цепи и их способности проходить такие сложные области ДНК, как шпильки, без скольжения, остановки и диссоциации полимераз во время амплификации. Оба фермента Bst 2.0 WarmStart и SD-полимераза были способны направлять синтез специфических фрагментов с ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Преимуществами SD-полимеразы является её термостабильность и более высокая специфичность. В отдельных экспериментах с использованием фермента Bst-полимеразы наблюдали появление димеров праймеров вместо образования специфических продуктов, а также в отрицательном контроле. При использовании обоих ферментов для синтеза GC-богатых матриц необходимо решить, как улучшить денатурацию ДНК во время амплификации с целью снижения формирования вторичных структур.

Заключение. В проведённых исследованиях наилучший результат был получен при выполнении ПЦР-PV. Наборы Vma54 к мишени *IS407A-flpB* *B. mallei* и Bp27 на ген *Orf12* области кластера генов TTS1 *B. pseudomallei* надёжно выявляли ДНК тех микроорганизмов, к последовательностям которых они были сконструированы. ДНК гетерологичных штаммов указанные праймеры не выявляли. Таким образом, в случае сложных для LAMP матриц, таких как ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei*, можно рекомендовать остановить свой выбор на ПЦР-PV для детекции возбудителей, хотя это повышает требования к необходимому оборудованию.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–25, 27–29, см. REFERENCES)

26. Щит И.Ю., Игнатов К.Б., Кудрявцева Т.Ю., Шишкова Н.А., Миронова Р.И., Маринин Л.И., Мокриевич А.Н., Крамаров В.М., Бикетов С.Ф., Дятлов И.А. Использование петлевой изотермической амплификации ДНК для выявления и идентификации сибиреязвенного микроба. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017. 35(2):69-76.

REFERENCES

1. Neubauer H., Sprague L.D., Zacharia R., Tomaso H., Al Dahouk S., Wernery R. et al. Serodiagnosis of Burkholderia mallei infections in horses: state-of-the-art and perspectives. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*. 2005; 52:201-5.
2. Van Zandt K.E., Greer M.T., Gelhaus H.C. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet J. Rare Dis*. 2013; 8:131.
3. Dance D.A. Melioidosis as an emerging global problem. *Acta Trop*. 2000; 74:115-9.
4. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev*. 2005; 18:383-416.
5. Currie B.J., Fisher D.A., Howard D.M., Burrow J.N., Lo D., Selva-Nayagam S. et al. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. *Clin. Infect. Dis*. 2000; 31:981-6.
6. Chaowagul W., White N.J., Dance D.A., Wattanagoon Y., Naigowit P., Davis T.M. et al. Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. *J. Infect. Dis*. 1989; 159:890-9.
7. Dance D.A. Melioidosis: the tip of the iceberg? *Clin. Microbiol. Rev*. 1991; 4:52-60.

8. Sanford J.P. Pseudomonas species (including melioidosis and glanders). In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., ed. Principles and practice of infectious diseases. 8th ed. New York, N.Y: Churchill Livingstone; 1995; 2003-9.
9. HHS and USDA Select Agents and Toxins 7 CFR Part 331, 9 CFR Part 121, 42 CFR Part 73. 2012. http://www.selectagents.gov/resources/List_of_Select_Agents_and_Toxins_2012-12-4.pdf. Accessed 1 February 2012.
10. Tomaso H., Scholz H.C., Al Dahouk S., Pitt T.L., Treu T.M., Neubauer H. Development of 5' nuclease real-time PCR assays for the rapid identification of the Burkholderia mallei/Burkholderia pseudomallei complex. *Diagn. Mol. Pathol*. 2004; 13:247-53.
11. Tomaso H., Scholz H.C., Al Dahouk S., Eickhoff M., Treu T.M., Wernery R. et al. Development of a 5'-nuclease real-time PCR assay targeting flpP for the rapid identification of Burkholderia mallei in clinical samples. *Clin. Chem*. 2006; 52(2):307-10.
12. Lee M.A., Wang D., Yap E.H. Detection and differentiation of Burkholderia pseudomallei, Burkholderia mallei and Burkholderia thailandensis by multiplex PCR. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 2005; 43:413-7.
13. Janse I., Hamidjaja R.A., Hendriks A.C., van Rotterdam B.J. Multiplex qPCR for reliable detection and differentiation of Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei. *BMC Infect. Dis*. 2013; 13:86.
14. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28:E63.
15. Notomi T., Hase T. Process for synthesizing nucleic acid, 2002, *US patent* 6410278.
16. Mirzai S., Safi S., Mossavari N., Afshar D., Bolourchian M. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Burkholderia mallei. *Cell Mol. Biol. Noisy-le-grand*. 2016; 62(10):32-6.
17. Pal V., Saxena A., Singh S., Goel A.K., Kumar J.S., Parida M.M. et al. Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Burkholderia mallei. *Transbound Emerg. Dis*. 2017; 65(1):e32-e39.
18. Chantratita N., Meumann E., Thanwisai A., Limmathurotsakul D., Wuthiekanun V., Wannasani S. et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification Method Targeting the TTS1 Gene Cluster for Detection of Burkholderia pseudomallei and Diagnosis of Melioidosis. *J. Clin. Microbiol*. 2008; 46(2):568-73.
19. Ignatov K.B., Barsova E.V., Fradkov A.F., Blagodatskich K.A., Kramarova T.V., Kramarov V.M. A strong strand displacement activity of thermostable DNA polymerase markedly improves the results of DNA amplification. *BioTechniques*. 2014; 57:81-7.
20. Niernan W.C., DeShazer D., Kim H.S., Tettelin H., Nelson K.E., Feldblyum T. et al. Structural flexibility in the Burkholderia mallei genome. *Proc. Nat. Acad. Sciences USA*. 2004; 101(39):14246-51.
21. Gilling D.H., Luna V.A., Pflugrad C. The Identification and Differentiation between Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei Using One Gene Pyrosequencing. *International Scholarly Research Notices*. 2014, Article ID 109583.
22. Rees W.A., Korte Y.T., Von J., Hippel P.H. Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry*. 1993; 32(1):137-44.
23. Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D., Loening S. A. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucl. Acids Res*. 1997; 25(19):3957-8.
24. Jensen M.A., Fukushima M., Davis R. DMSO and Betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in De Novo synthesis. *PLoS ONE*. 2010; 5(6):e11.
25. Parida M., Sannarangaiah S., Dash P.K., Rao P.V.L., Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol*. 2008; 18:407-21.
26. Shchit I.Y., Kudryavtseva T.Y., Shishkova N.A., Mironova R.I., Marinin L.I., Mokrievich A.N., Biketov S.F., Dyatlov I.A., Ignatov K.B., Kramarov V.M. The use of loop-mediated isothermal DNA amplification for the detection and identification of the anthrax pathogen. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2017; 32(2):69-76. (in Russian).
27. George G., Mony P., Kenneth J. Comparison of the efficacies of loop-mediated isothermal amplification, fluorescence smear microscopy and culture for the diagnosis of tuberculosis. *PLoS ONE*. 2011; 6:e21007.
28. Chen S.Y., Wang F., Beaulieu J.C., Stein R.E., Ge B.L. Rapid detection of viable salmonellae in produce by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol*. 2011; 77:4008-16.
29. Tomita N., Mori Y., Kea H., Notomi T. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of Gene Sequences and Simple Visual Detection of Products. *Nature Protocols*. 2008; 3:877-82.

Поступила 26.03.18

Принята к печати 13.04.18

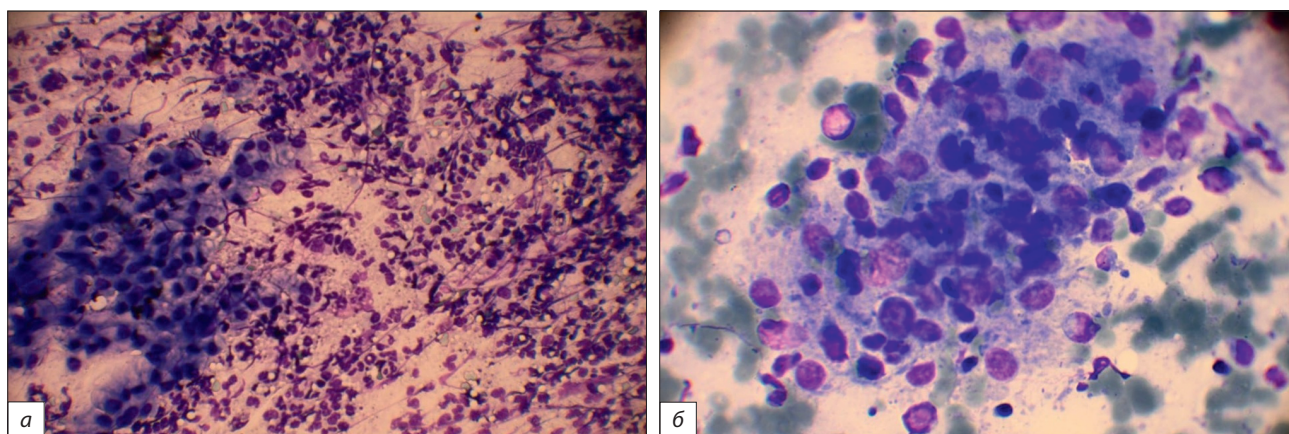


Рис. 1. Фрагменты цитогрaмм слизистой оболочки сигмовидной кишки (мазок-отпечаток с поверхности) больного Г., 43 года, с неспецифическим язвенным колитом до лечения.

а – скопление рыхло расположенных эпителиальных клеток кишечного типа; вакуолизация цитоплазмы эпителиальных клеток; выраженная лейкоцитарная реакция со значительным преобладанием нейтрофилов; *б* – скопление рыхло расположенных эпителиальных клеток кишечного типа; *в* – группы эпителиальных клеток кишечного типа с признаками секреции, изолированные эпителиальные клетки, клетки в виде «голых» ядер. Окраска азур-эозином. Ув. 400 (из архива автора).

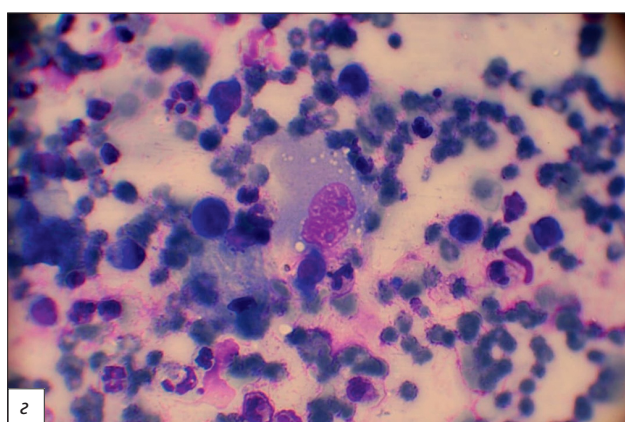
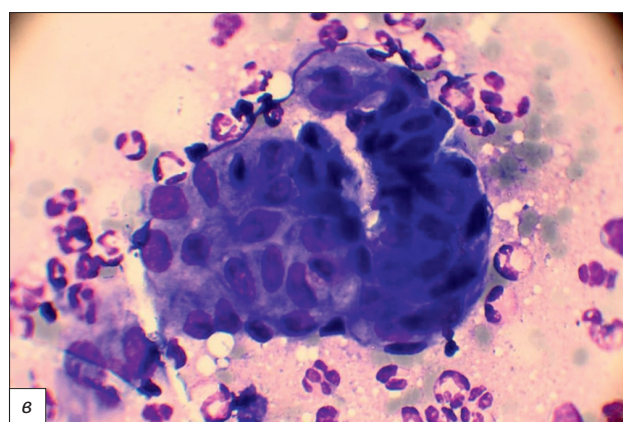
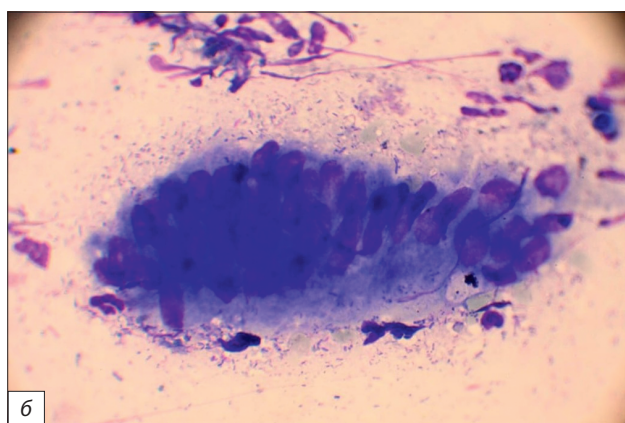
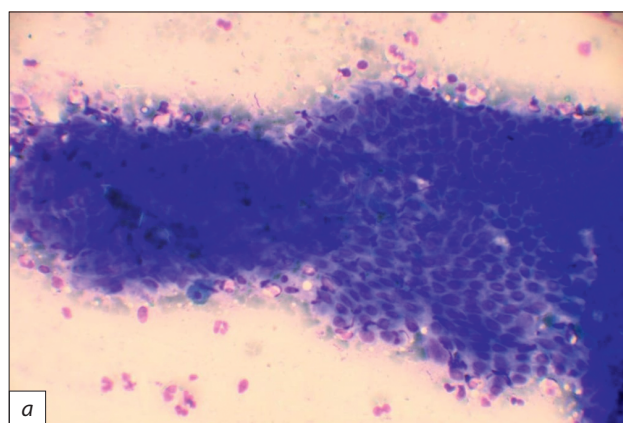
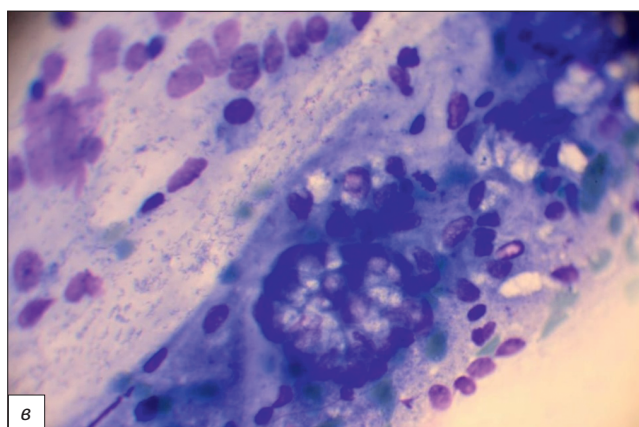


Рис. 2. Фрагменты цитогрaмм слизистой оболочки сигмовидной кишки (мазок-отпечаток с поверхности) больного Г., 43 года, с неспецифическим язвенным колитом после лечения.

а – скопление пролиферирующих эпителиальных клеток; неотчетливые признаки кишечной дифференцировки; выраженные межклеточные контакты; *б* – скопление эпителиальных клеток кишечного типа; *в* – скопление эпителиальных клеток кишечного типа с признаками секреции; базофилия цитоплазмы эпителиальных клеток; умеренно выраженная лейкоцитарная реакция; *г* – эпителиальные клетки с ядрышками в ядрах. Окраска азур-эозином. Ув. 400 (из архива автора).

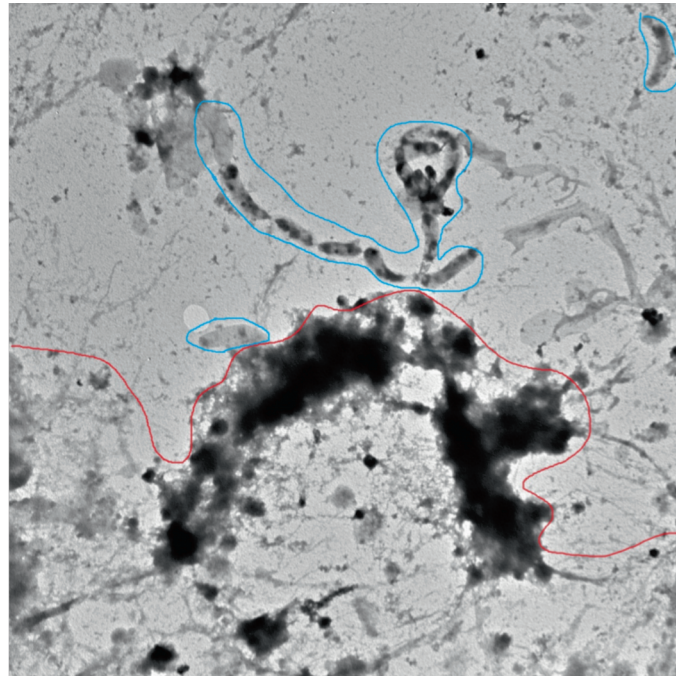


Рис.1. Клетки штамма *C. pseudodiphtheriticum*, выделенного от больного с хроническим тонзиллитом на культуре клеток Нер-2. Увеличение x 6 000. Контрастирование по методу Luft J.H. и тетраоксидом осмия (VIII) [7]. На электронограмме красным обведена цитоплазма, синим – коринебактерии.

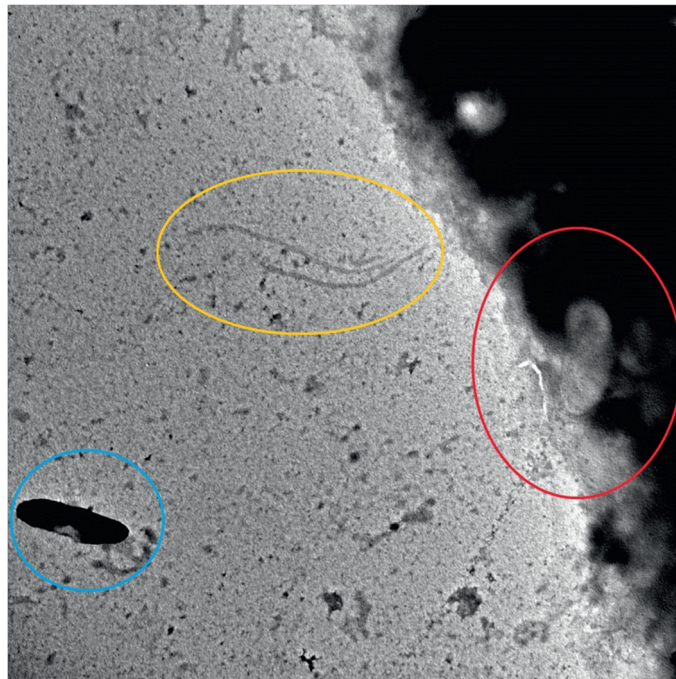


Рис. 2. Клетки штамма *C. pseudodiphtheriticum*, выделенного от больного с хроническим тонзиллитом на культуре клеток Нер-2. Увеличение x 20 000. Контрастирование по методу Luft J.H. и тетраоксидом осмия (VIII) [7].

На электронограмме контурированные микроворсинки клетки Нер-2 обведены желтым; клетка коринебактерий Нер-2 обведены красным; клетка коринебактерий, расположенная внеклеточно, - синим.