

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

8 • 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

АВГУСТ

Журнал основан в январе 1955 г.

**Почтовый адрес**

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

Телефон редакции:  
8-495-430-03-63,  
E-mail: clin.lab@yandex.ru

**Зав. редакцией Л. А. Шанкина**

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ**

Тел. 8-903-724-40-29

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

Художественный редактор

*Е. М. Архипова*

Переводчик *В. С. Нечаев*

Корректор *В. С. Смирнова*

Технический редактор *Л. В. Зюкина*

Сдано в набор 20.06.2018.

Подписано в печать 14.06.2018.

Формат 60 × 88<sup>1</sup>/<sub>8</sub>.

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 издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

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

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

**Индекс 71442 — для подписчиков**

**Подписка через Интернет: [www.aks.ru](http://www.aks.ru),**

**[www.pressa-ef.ru](http://www.pressa-ef.ru)**

**Подписка на электронную версию:**

**[elibrary.ru](http://elibrary.ru)**

ISSN 0869-2084. Клини. лаб. диагностика.  
2018. № 8. 457–520.

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:**

**Главный редактор В. Н. ТИТОВ**

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

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:**

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛЬСТВО  
"МЕДИЦИНА"

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

# D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 63  
8 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

AUGUST

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](mailto: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](mailto:oao-meditsina@mail.ru)**

**WWW page: [www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)**

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

**EDITOR BOARD:**

**Editor-in-Chief V. N. TITOV**

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

**EDITORIAL COUNCIL:**

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



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

**БИОХИМИЯ**

- Сажина Н.Н., Евтеева Н.М., Титов В.Н.* Константы скорости реакций взаимодействия озона с пальмитиновой, олеиновой и другими жирными кислотами. Роль озонлиза в метаболизме жирных кислот. . . . . 460
- Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Молчан Н.С., Полушин Ю.С.* Уровень циркулирующего хуманина у пациентов с ишемической болезнью сердца . . . . . 466
- Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Гапон Л.И., Горбатенко Е.А., Дьячков С.М., Шароян Ю.А., Зуева Е.В.* Перспективный анализ параметров липидного спектра и маркеров сосудистого воспалительного ответа с прогнозом нежелательных коронарных событий у больных ишемической болезнью сердца после ангиопластики со стентированием . . . . . 471
- Бельская Л.В., Сарф Е.А., Косенок В.К.* Корреляционные взаимосвязи состава слюны и плазмы крови в норме . . . . . 477
- Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А., Михельсон А.А., Аллилуев И.А., Михельсон А.М.* Дисбаланс окислительно-восстановительных процессов в околоплодных водах при преэклампсии. . . . . 483
- Колсанов А.В., Чаплыгин С.С., Соколов А.В., Власов М.Ю., Мякишева Ю.В.* Экспресс-методы определения показателей метаболизма в ротовой жидкости (обзор литературы) . . . . 489
- Булгакова С.В., Гусякова О.А., Тренева Е.В., Захарова Н.О., Николаева А.В.* Влияние липидного обмена на темп старения пациентов с артериальной гипертензией. . . . . 495

**КОАГУЛОЛОГИЯ**

- Лисютенко Н.С., Морова Н.А., Цеханович В.Н.* Лабораторные признаки активации системы гемостаза у больных ишемической болезнью сердца после операции коронарного шунтирования . . . . . 500

**ИММУНОЛОГИЯ**

- Скирда Т.А., Борисова О.Ю., Петрова М.С., Комбарова С.Ю.* Определение противокклюзных антител в иммуноферментном анализе . . . . . 505

**КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

- Образцова О.А., Вербенко Д.А., Карамова А.Э., Семёнова В.Г., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г.* Совершенствование ПЦР-диагностики лепры путём амплификации видоспецифичного повторяющегося фрагмента генома *Mycobacterium leprae*. . . . . 511
- Чукаева И.И., Ганковская Л.В., Плотникова Н.А., Орлова Н.В., Понасенко О.А., Свитич О.А., Спирыкина Я.Г.* Изучение экспрессии гена белка теплового шока 70 (HSP70) и его полиморфного маркера (+1267A>G) у женщин при воздействии длительного стресса . . . . . 517

**BIOCHEMISTRY**

- Sazhina N.N., Evteeva N.M., Titov V.N.* Rate constants for interaction reactions of ozone with palmitic, oleic and others fatty acids. Role of ozonolysis in metabolism of fatty acids . . . . . 460
- Zhloba A.A., Subbotina T.F., Molchan N.S., Polushin Yu.S.* The level of circulating humanin in patients with ischemic heart disease . . . . . 466
- Petelina T.I., Musikhina N.A., Gapon L.I., Gorbatenko E.A., Dyachkov S.M., Sharoyan Yu.A., Zueva E.V.* Prospective analysis of parameters of lipid spectrum and markers of inflammatory vascular response with prognosis of undesirable coronary events in patients with ischemic heart disease after angioplasty with stenting . . . . . 471
- Bel'skaya L.V., Sarf E.A., Kosenok V.K.* Correlation interrelations between the composition of saliva and blood plasma in norm . . . . . 477
- Pogorelova T.N., Gunko V.O., Nikashina A.A., Mikhelson A.A., Alililuev I.A., Mikhelson A.M.* Disbalance of redox processes in amniotic fluid at pre-eclampsia . . . . . 483
- Kolsanov A.V., Chaplygin S.S., Sokolov A.V., Vlasov M.Yu., Myakishcheva Yu.V.* Express methods for detection the indicators of metabolism in the oral liquid (a review) . . . . . 489
- Bulgakova S.V., Gusyakova O.A., Treneva E.V., Zakharova N.O., Nikolaeva A.V.* The impact of lipid metabolism on the rate of aging of patients with arterial hypertension . . . . . 495

**COAGULOGY**

- Lisyutenko N.S., Morova N.A., Tsekhanovich V.N.* Laboratory signs of activation of the hemostasis system in patients with coronary heart disease, who had coronary artery bypass surgery . . . . . 500

**IMMUNOLOGY**

- Skirda T.A., Borisova O.Yu., Petrova M.S., Kombarova S.Yu.* Definition of anti-pertussis antibodies by enzyme immunoassay . . . . . 505

**CLINICAL MOLECULAR STUDIES**

- Obraztsova O.A., Verbenko D.A., Karamova A.E., Semenova V.G., Kubanov A.A., Deryabin D.G.* The refinement of leprosy PCR diagnostics by the amplification of species-specific repeated fragment of the *Mycobacterium leprae* genome . . . . . 511
- Chukaeva I.I., Gankovskaya L.V., Plotnikova N.A., Orlova N.V., Ponasenko O.A., Svitich O.A., Spiryakina Ya.G.* Study of heat shock protein gene 70 (hsp70) expression and its polymorphous marker (+ 1267a> g) in women under exposure to a long-term stress . . . . . 517

## БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.13-004.6-092:612.015.3

Сажина Н.Н.<sup>1</sup>, Евтеева Н.М.<sup>1</sup>, Титов В.Н.<sup>2</sup>

### КОНСТАНТЫ СКОРОСТИ РЕАКЦИЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОЗОНА С ПАЛЬМИТИНОВОЙ, ОЛЕИНОВОЙ И ДРУГИМИ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ. РОЛЬ ОЗОНОЛИЗА В МЕТАБОЛИЗМЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН РФ, 119334, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, 121552, Москва, Россия

*Измерены кинетические параметры взаимодействия озона с 13 индивидуальными насыщенными, моноеновыми, ненасыщенными и полиеновыми жирными кислотами (ЖК), которые имеют в молекулах 0–4 двойные связи (ДС). Проведена оценка констант скоростей реакций взаимодействия ЖК с озоном. Выявлена зависимость величин констант от: а) длины алифатической цепи ЖК; б) числа ДС в цепи; в) позиции ДС в цепи ЖК и з) цис-, транс- конфигурации ЖК. Наиболее высокую константу скорости реакции имеет C18 : 1 цис-ω-9 олеиновая ЖК ( $2,58 \cdot 10^5$ ,  $M^{-1}s^{-1}$ ). У остальных оценённых ЖК константа окисления в 1,5–3 раза ниже, в зависимости от структуры ЖК. Наибольшую роль озонлиз играет в биохимических реакциях, в физиологическом метаболизме ЖК и афизиологических реакциях модификации ЖК в составе фосфолипидов (фосфатидилхолина и аминофосфолипиды) в структуре плазматических мембран живых клеток. Мы полагаем также, что в филогенезе биологическая роль инсулина способствует превращению вышедших из океана плотоядных животных в травоядные, обеспечивает животным высокие кинетические параметры движения при реализации биологической функции локомоции, превращает in vivo малоэффективный пальмитиновый вариант метаболизма ЖК с дефицитом энергии в высокоэффективный олеиновый вариант метаболизма. В филогенезе низкая химическая активность пальмитиновой насыщенной ЖК и высокая активность олеиновой ненасыщенной ЖК in vivo – это основной этиологический фактор двух афизиологических процессов – атеросклероза и атероматоза, основа формирования ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда.*

**Ключевые слова:** жирные кислоты; озонлиз; двойные связи; инсулин; атеросклероз; атероматоз.

**Для цитирования:** Сажина Н.Н., Евтеева Н.М., Титов В.Н. Константы скорости реакций взаимодействия озона с пальмитиновой, олеиновой и другими жирными кислотами. Роль озонлиза в метаболизме жирных кислот. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(8): 460-465. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-460-465>

Sazhina N.N.,<sup>1</sup> Evteeva N.M.,<sup>1</sup> Titov V.N.<sup>2</sup>

RATE CONSTANTS FOR INTERACTION REACTIONS OF OZONE WITH PALMITIC, OLEIC AND OTHERS FATTY ACIDS. ROLE OF OZONOLYSIS IN METABOLISM OF FATTY ACIDS

<sup>1</sup>N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health, 121552, Moscow, 121552, Russia

*Kinetic parameters of the interaction between ozone with 13 individual saturated, monoenic, unsaturated and polyenic fatty acids (FA) which have 1-4 double bonds (DB) have been determined. Rate constants for FA reaction with ozone were estimated. It was found that the constants depend on a) aliphatic chain length, b) DB number of DB in the chain, c) DB position in the chain and d) cis- or trans- configuration of FA. The highest rate constant was recorded for C18:1 cis-ω-9 oleic FA ( $2.58 \cdot 10^5$ ,  $M^{-1}s^{-1}$ ). Oxidation rate constants for other FA were 1.5- to 3-fold lower depending of the FA structure. The greatest role ozonolysis is played in biochemical reactions, in physiologic metabolism of FA and also in aphysiologic reactions of modification of FA as part of phospholipids (phosphatidylcholine and aminophospholipids) in structure of plasmatic membranes of living cells. We believe also that phylogenetically the role of insulin consists in: a) promoting the conversion of carnivorous (fish-eating) animals that left the ocean into herbivorous, b) providing high kinetic parameters for realization of the biological function of locomotion, c) converting in vivo the low-efficiency palmitic pathway of FA metabolism with energy deficiency into a high-efficiency oleic pathway. During phylogenesis, low chemical activity of oleic FA in vivo is the major etiological factor of two nonphysiological processes: atherosclerosis and atheromatosis which are fundamental for the development of ischemic heart disease and myocardial infarction.*

**Key words:** fatty acids; ozonolysis; double bonds; insulin; atherosclerosis; atheromatosis.

**For correspondence:** Sazhina N.N., candidate of phys.-math. sciences, senior researcher of the FGBU Institute of Biochemical Physics im. N.M. Emanuel RAS; e-mail: [Natnik48s@yandex.ru](mailto:Natnik48s@yandex.ru)

**For citation:** Sazhina N.N., Evteeva N.M., Titov V.N. Rate constants for interaction reactions of ozone with palmitic, oleic and others fatty acids. Role of ozonolysis in metabolism of fatty acids. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (8): 460-465 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-460-465>

**Acknowledgment.** The study did not have sponsorship.

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

Received 01.06.2017  
Accepted 09.06.2017

**Введение.** Озон ( $O_3$ ) и его действие на живые организмы, химические и биологические субстраты изучены достаточно хорошо [1]. В нижних слоях атмосферы озон непосредственно взаимодействует с живыми формами и проявляет свои токсические свойства [2]. Он является сильным инициатором окисления и относится к веществам высшей категории опасности. В повышенных концентрациях  $O_3$  отрицательно влияет на здоровье человека и животных, угнетает активность биологических процессов в растениях и их рост.

Биологические и медицинские исследования показали, что озон в высоких концентрациях может действовать как мутаген, канцероген; на нативные клетки животных озон оказывает влияние подобно ионизирующей радиации [3]. Озон разрушает и небиологические объекты, например резину, каучук, взаимодействует с металлами и иными материалами [4]. Высокую реакционную способность озона используют для очистки воздуха и воды от патогенных микроорганизмов, а также для антибактериальной обработки воды, хранения продуктов питания и т. д.

Основы, механизмы взаимодействия озона с органическими молекулами, включая и жирные кислоты (ЖК), рассмотрены в более ранних публикациях [4 – 6]. Основным химическим процессом в этом взаимодействии оказывается озонлиз – фиксация молекулы  $O_3$  на двойной связи (ДС) между молекулами углерода в цепи ЖК с последующим разрывом ДС и образованием озонидов. Будучи неустойчивыми и химически активными, озониды быстро разлагаются [7, 8]. Процесс этот происходит быстро, с константой скорости реакции порядка  $10^5$ – $10^6$   $M^{-1}s^{-1}$  [4]. Далее следует каскад реакций с формированием короткоживущего свободного радикала Криге и карбонила; в результате рекомбинации они быстро преобразуются во вторичные озониды. Далее происходит образование интермедиатов – промежуточных метаболитов, которые превращаются в спирты, альдегиды и карбоновые кислоты (рис. 1) [7].

Наибольшее биологическое значение озонлиз имеет в биохимических реакциях, в физиологическом метаболизме ЖК и афизиологических реакциях модификации ЖК в составе фосфолипидов (фосфатидилхолины и аминофосфолипиды) в структуре плазматических мембран живых клеток. Озон реагирует с ДС в ЖК в разных классах липидов, формируя озониды. Максимальное их количество образуется, когда в глицерофосфолипидах этерифицированы ЖК, которые имеют ДС в цепи атомов углерода. Согласно биологической классификации, которую мы используем в работах, насыщенные ЖК (НЖК), С16:0 пальмитиновая и С14:0 миристиновая ДС не имеют. Мононенасыщенные МЖК - С16:1  $\omega$ -9 пальмитолеиновая и С18:1  $\omega$ -9 олеиновая, имеют одну ДС у 9-го атома углерода, если считать от метильного конца молекулы; обе МЖК синтезируют клетки высших животных и человека *in situ de novo* из ацетата, из активированного ацетил-КоА.

Химики делят ЖК на НЖК, МЖК и полиеновые ЖК (ПНЖК), которые имеют более одной ДС в цепи атомов углерода. С позиций же биологии, С:18 ЖК с 2 – 3 ДС мы оцениваем как ненасыщенные ЖК (ННЖК); к ПНЖК же мы относим только С:20 ЖК, которые имеют 4 – 6 ДС. Определено это реальным различием биологической роли ЖК в процессах метаболизма *in vivo*. НЖК + МЖК – это субстрат для окисления клетками в составе митохондрий с целью наработки энергии в форме макроэргического аденозинтрифосфата (АТФ). ННЖК этерифицированы в составе фосфолипидов (фосфатидилхолины, аминофосфолипиды, кардиолипиды, сфингомиелины). Синтез же биологически активных гуморальных медиаторов – эйкозаноидов (эйкоза по-гречески – «двадцать») происходит только из ПНЖК, из  $\omega$ -6 С20:4 арахидоновой ПНЖК, из  $\omega$ -3 С20:5 эйкозапентаеновой и  $\omega$ -3 С22:6 докозагексаеновой ПНЖК. Ранними в филогенезе био-

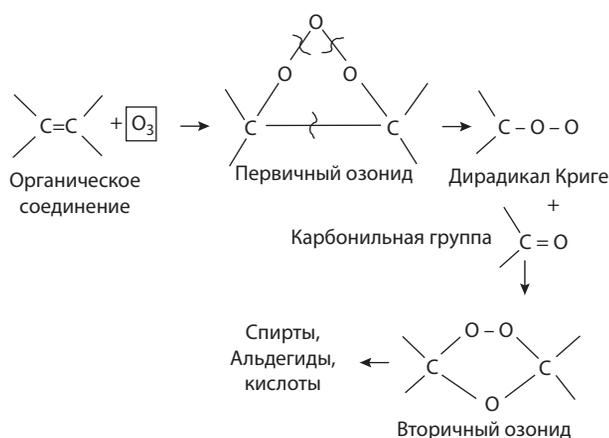


Рис. 1. Взаимодействие озона с ДС органического соединения [7].

логически активными эйкозаноидами, регуляторами метаболизма *in vivo* являются простаглицлины, простаглицлины, тромбоксаны и лейкотриены.

Характерные конечные продукты метаболизма липидов в организме – диеновые конъюгаты и малоновый диальдегид; определение содержания малонового диальдегида в биологических средах стало широко используемым методом. По концентрации диеновых конъюгатов при помощи УФ-спектроскопии и малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой оценивают окисление ЖК в разных липидах [9 – 12]. В мембранах клеток при образовании свободных радикалов начинаются процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ). Озон индуцирует ПОЛ; он ускоряет образование активных радикалов; при отсутствии которых ПОЛ не происходит.

В результате озонлиза образуется перекись водорода ( $H_2O_2$ ); при распаде её формируется в том числе высокоактивный  $OH\cdot$  радикал, который инициирует цепную реакцию окисления липидов. Первичные продукты окисления липидных субстратов, – гидроперекиси типа  $ROOH$ ; *in vivo* они оказывают афизиологическое действие на живые организмы. К вторичным продуктам окисления ЖК и липидов озоном относятся спирты, альдегиды, кетоны, кислоты, кетоэфиры и т. д. Механизмы ПОЛ отличаются от реакций озонлиза; при достаточно высокой концентрации  $O_3$  и кислорода ( $O_2$ ), при действии двух окислителей образуется малоновый диальдегид. Цепная реакция ПОЛ приводит к убыли субстрата окисления – ЖК, потреблению окислителя и накоплению продуктов реакции - гидроперекисей [7].

Ранее в работах [4 – 6] были определены кинетические константы реакций окисления ЖК озоном олеиновой МЖК [4, 5], пальмитиновой НЖК, линолевой ННЖК и арахидоновой ПНЖК [6]. Эти константы отличаются между собой на несколько порядков; подробное же изложение алгоритма их определения не приведено. Ранние публикации были основаны на экспериментах, проведённых на первой, менее совершенной модели сконструированного Д.М. Лисицыным автоматического анализатора двойных связей (АДС). В настоящей работе были проведены эксперименты на усовершенствованной модели АДС. Мы расширили список оценённых ЖК и привели описание метода определения кинетических констант.

Цель работы – экспериментальное исследование кинетики реакций взаимодействия озона с индивидуальными ЖК с разной молекулярной структурой и оценка констант скорости этих реакций.

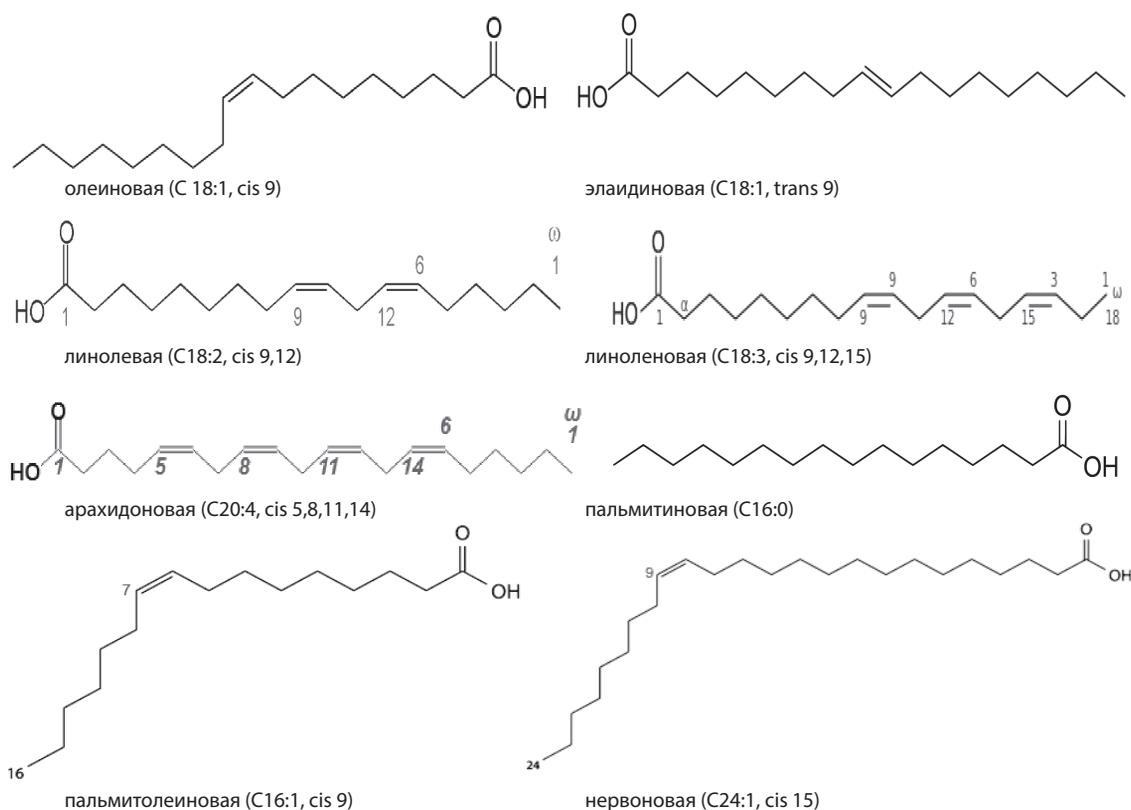


Рис. 2. Структурные формулы некоторых используемых в работе ЖК.

**Материал и методы.** В качестве объектов использовались 13 индивидуальных ЖК стандартных образцов производства фирмы Supelco (США): миристиновая C14 : 0 НЖК; пальмитиновая C16 : 0 НЖК; олеиновая МЖК, C18 : 1, цис-форма, ω 9; элаидиновая МЖК – C18 : 1, транс- ω 9; петроселиновая C18 : 1, цис- ω 6; вакценовая C18 : 1, цис- ω 11; пальмитолеиновая МЖК – C16 : 1, цис- ω 9; гадолеиновая МЖК – C20 : 1, цис- ω 11; эруковая МЖК – C22 : 1, цис- ω 13; линолевая ННЖК – C18 : 2, цис- 9 и 12 ω 6; линоленовая ННЖК – C18 : 3, цис- 9,12 и 15 ω-3; арахидоновая ПНЖК – C20 : 4, цис - 5, 8, 11,14 ω 6; нервоновая МЖК – C24 : 1, цис 15 ω 9, (рис. 2).

Для оценки кинетики взаимодействия ЖК с озоном и определения содержания ДС в ЖК использовали метод озонирования [4 – 6]. Измерения проводили на АДС модели АДС-4М; принцип действия АДС основан на способности непредельных и иных соединений быстро, с константой скорости реакции порядка  $10^5$ – $10^6$   $M^{-1}c^{-1}$  [4], присоединять  $O_3$  по месту локализации ДС. Поскольку скорость взаимодействия озона с ДС на несколько порядков выше, чем с иными функциональными группами в молекулах, это обеспечивает высокую селективность анализа. При барботировании  $O_3$  в реакторе через исследуемый раствор концентрация озона на выходе из реактора уменьшается. Это изменение анализатор фиксирует в форме кривой поглощения озона на ленте потенциометра - самописца. УФ-спектрофотометр (на длине волны 254 нм) регистрирует концентрацию  $O_3$  на входе и выходе из реактора; интегратор же АДС рассчитывает суммарный расход озона в реакции, который отражает площадь под кривой поглощения и пропорционален числу ДС в ЖК [13]. Температуру в реакторе, близкую к нулю, поддерживали, помещая реактор в сосуд со смесью воды со льдом. В качестве стандартного образца сравнения использовали раствор *trans*-стильбена с одной ДС в 4-х хлористом углеводе –  $CCl_4$ ; кон-

центрация стандартного образца  $C_{ct} = 2 \cdot 10^{-2}$  М. Все использованные ЖК также растворяли в  $CCl_4$  в той же концентрации. Все ЖК, кроме гадолеиновой МЖК, обладают хорошей растворимостью.

Концентрацию ДС рассчитывали по формуле:

$$[ДС] = C_{ct} \cdot S_{жк} \cdot V_{ct} \div S_{ct} \cdot V_{жк}, \quad (1)$$

где  $S_{жк}$  и  $S_{ct}$  – показатели интегратора для ЖК и стильбена,  $V_{жк}$  и  $V_{ct}$  – введённые в реактор объёмы проб: 10, 20, 30 и 40 мкл. Определение числа ДС проводили с учётом линейной зависимости от концентрации стильбена и ЖК. Необходимость выявления числа ДС в ЖК требуется для контроля окисленности образцов ЖК, т. е. их «порчи». Чувствительность прибора составила порядка  $2 \cdot 10^{-7}$  М.

На рис. 3 приведены кинетические кривые окисления озоном стильбена и ЖК: олеиновой МЖК, линолевой и линоленовой ННЖК; запись проведена при одинаковых значениях их концентрации и объёма.

Для оценки констант скорости окисления ЖК озоном провели сравнение скоростей увеличения концентрации  $O_3$  после введения стильбена или ЖК в реактор и до окончания их действия (при резком росте концентрации озона на выходе из реактора). Принимая константу скорости взаимодействия стильбена с озоном, равную  $k_{ct} = 1,8 \cdot 10^5 \cdot M^{-1}c^{-1}$  [4], и, используя кинетическое уравнение расхода ЖК при постоянной начальной концентрации озона, можно выразить  $k_{жк}$  через скорости реакций для стильбена и ЖК:

$$k_{жк} = (dC_{жк}/dt) \cdot (dC_{ct}/dt)^{-1} \cdot [C_{ct}] \cdot [C_{жк}]^{-1} \cdot k_{ct}, \quad (2)$$

а учитывая, что  $[C_{ct}] = [C_{жк}] = 2 \cdot 10^{-2}$  М и, заменяя производные тангенсами наклона кинетических кривых для стильбена и ЖК в области их расхода, получим:

$$k_{жк} = (\Delta C_{жк} \div \Delta t_{жк}) \cdot (\Delta C_{ct} \div \Delta t_{ct})^{-1} \cdot k_{ct} \quad (3)$$

Погрешность измерения ДС для стильбена и ЖК, с учётом повторяемости результатов, не превышала 15%. Статистиче-

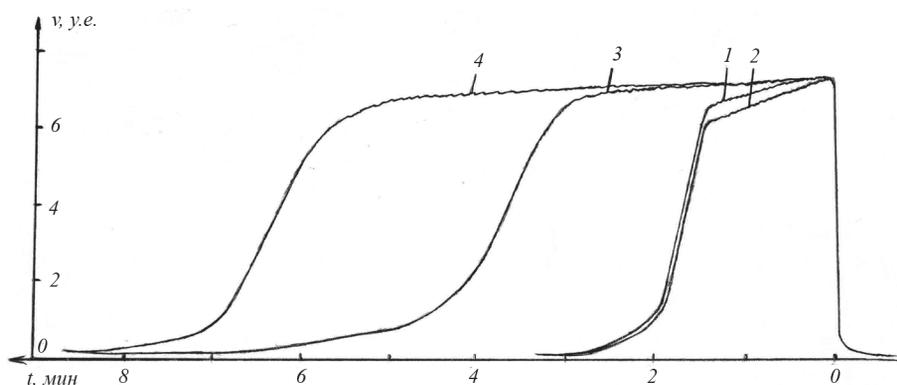


Рис. 3. Озонограммы ЖК.

1) стильбен; 2) олеиновая МЖК; 3) линолевая; 4) линоленовая ННЖК.

По оси ординат:  $v$  – уменьшение концентрации  $O_3$  на выходе из реактора (максимальная концентрация озона – вблизи нулевой линии). Исходные концентрации стильбена и ЖК –  $2 \cdot 10^{-2}$  М; объём вводимых в реактор проб 30 мкл.

скую обработку результатов проводили при использовании стандартных алгоритмов программ MS Excel. Все результаты представлены в виде значений средней величины  $\pm$  стандартная ошибка среднего [14].

**Результаты и обсуждение.** Для установления динамического диапазона измерений одновременно с записью кинетических кривых проверяли линейность зависимости числа ДС от объёма растворов стильбена и ЖК, вводимых в реактор  $V$  (рис. 4). Число ДС рассчитывали по формуле (1).

Для всех оценённых ЖК с одной ДС соответствующие точки ложатся на прямую 1, как для стильбена. Это свидетельствует о том, что все стандартные образцы ЖК содержали все ДС и не были окисленными. Для пальмитиновой и миристиновой НЖК интегратор АДС показал нулевой отклик; что указывает на отсутствии ДС. В таблице приведены все результаты оценки изученных нами ЖК. Константу скорости взаимодействия ЖК с  $O_3$  рассчитывали по формуле (3).

Основные параметры ЖК, которые определяют кинетику их взаимодействия с озоном: 1) число атомов углерода (длина алифатической цепи); 2) число ДС в цепи МЖК, ННЖК и ПНЖК; 3) расположение ДС по длине цепи ЖК; 4) их конфигурация -физиологичная-цис или афизиологичная-транс.

Самое высокое значение константы ( $k_{\text{жк}} = 2,58 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) имеет олеиновая МЖК: ДС в её составе локализована в центре цепи ЖК с цис-конфигурацией молекулы (рис. 2). Цис-конфигурация этой ДС, т. е. замена её на *trans*, уменьшает

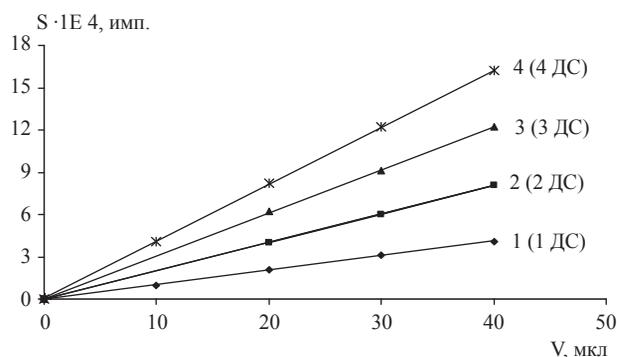


Рис. 4. Зависимости показателей интегратора  $S$  от вводимого в реактор объёма  $V$  для: 1) стильбена; 2) линолевой ННЖК; 3) линоленовой ННЖК; 4) арахидоновой ПНЖК с 1–4 ДС.

константу скорости реакции транс-элаидиновой МЖК с  $O_3$ , по сравнению с цис-олеиновой МЖК почти в 2 раза. Объяснить это можно тем, что потенциальная энергия транс-изомера ЖК меньше, чем цис-изомера. Реакция озона с олеиновой МЖК проходит с большей энергией активации, т. е. меньшая часть молекул транс-изомера обладает достаточной энергией для преодоления барьера активации [4]. Транс-форма олеиновой МЖК, элаидиновая МЖК, имеет другие химические и физические свойства; обусловлены они иной конфигурацией связей. Элаидиновую  $C_{18} : 1$  транс-  $\omega$ -9 НЖК характеризует и более высокая температура плавления ( $45^\circ\text{C}$ ) по сравнению с  $C_{18} : 1$  цис-  $\omega$ -9 олеиновой МЖК ( $13,4^\circ\text{C}$ ). Это существенное различие происходит в силу способности транс-молекул МЖК формировать более плотную упаковку цепей ЖК, образуя подобие твёрдого тела. Оно остаётся таковым и *in vivo* – у человека в клетках при физиологичной температуре тела  $36,6^\circ\text{C}$ .

Расположение ДС по длине цепи атомов углерода для  $C_{18}$  ЖК также меняет величину константы скорости взаимодействия с озоном; это следует из таблицы для:  $C_{18} : 1$ , цис-  $\omega$  9 олеиновой МЖК; для  $C_{18} : 1$  цис-  $\omega$ -6 петроселиновой МЖК и для  $C_{18} : 1$ , цис-  $\omega$ -11 вакценовой МЖК. Более дальнее расположение ДС в цис-конфигурации от центра ЖК ( $\omega$ -11) приводит к уменьшению  $k_{\text{жк}}$ . Для МЖК с разной длиной алифатической цепи (пальмитолеиновой, эруковой и нервоновой) наблюдается уменьшение величины  $k_{\text{жк}}$  с увеличением количества атомов углерода в молекуле.

С увеличением числа ДС в молекулах ЖК скорость реакции окисления их озоном значительно уменьшается, процесс идёт более медленно (рис. 3). По-видимому, озон последовательно разрывает двойные связи в зависимости от расположения их в цепи атомов углерода и энергии их связи. Полученные в настоящей работе величины констант скорости взаимодействия ЖК с озоном существенно отличаются от тех, которые выявляли ранее [6]. Для олеиновой ЖК измеренная ранее константа озонирования была примерно в 4 раза больше ( $10^6, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), чем в настоящей работе. Для арахидоновой ЖК – в 2 раза больше ( $2,4 \cdot 10^5, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), а для линолевой ЖК – более чем в 2 раза меньше ( $0,61 \cdot 10^5, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Для пальмитиновой и миристиновой ЖК в наших измерениях числа ДС и  $k_{\text{жк}}$  были равны нулю, в то время как в [6] константа скорости взаимодействия  $O_3$  с пальмитиновой НЖК составила  $6 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Поскольку авторы ранее [6] не указали методику расчёта величины констант, можно предположить, что такая разница связана с иными условиями проведения экспериментов, в частности с более высокой чувствительностью прибора и низкими концентрациями растворов, которые использованы для ЖК и стильбена.

Значение полученных данных для биологии и медицины состоит в том, что ранее (в первых работах по озонлизу) мы взяли их за основу при формировании филогенетической теории общей патологии. Согласно этой теории, на самых ранних ступенях филогенеза, во многом ещё не совершенные клетки – археи, начали в мультиферментном комплексе, в реакции Кноппа–Линена, из уксусной кислоты, активированного ацетил-КоА синтезировать пальмитиновую  $C_{16} : 0$  НЖК без образования более коротких НЖК. Определено это тем, что  $C_{16} : 0$  пальмитиновая НЖК – наиболее короткая ЖК, которая формирует монослой-

**Число ДС в ЖК, рассчитанное по формуле (1), и константы скорости взаимодействия ЖК с озоном**

Наименование ЖК	Измеренное число ДС	$k_{\text{жк}} \cdot 10^{-5}, \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$
Олеиновая, С18 : 1, цис-9	0,996 ± 0,024	2,58 ± 0,33
Элаидиновая, С18 : 1, транс-9	0,994 ± 0,021	1,40 ± 0,23
Петроселиновая, С18 : 1, цис-6	1,012 ± 0,013	1,53 ± 0,21
Вакценовая, С18 : 1, цис-11	1,038 ± 0,067	1,32 ± 0,26
Пальмитолеиновая С16 : 1, цис-9	0,998 ± 0,026	1,30 ± 0,13
Гадолеиновая, С20 : 1, цис-11	не раствор.	-
Эруковая, С22 : 1, цис-13	0,998 ± 0,023	1,03 ± 0,08
Нервоновая, С24 : 1, цис-15	1,011 ± 0,021	0,99 ± 0,02
Линолевая, С18 : 2, цис-9, 12	1,984 ± 0,031	1,47 ± 0,22
Линоленовая, С18 : 3, цис-9, 12, 15	3,002 ± 0,015	0,93 ± 0,11
Арахидоновая, С20 : 4, цис- 5, 8, 11, 14	3,976 ± 0,031	0,85 ± 0,13
Миристиновая, С14 : 0	0	0
Пальмитиновая, 16 : 0	0	0

ные, бислойные структуры. Это происходило в условиях высокой температуры первого мирового океана (36–42°C). Синтез пальмитиновой НЖК был облигатным условием формирования и самих клеток. Этот синтез древние археи сформировали на миллионы лет раньше, чем иные клетки (автотрофы) стали синтезировать глюкозу при использовании физико-химических реакций фотосинтеза. За синтезом автотрофами глюкозы последовал «великий биологический симбиоз» – функциональное слияние архей и автотрофов. Это привело к образованию более совершенных симбионтов; они стали для обеспечения энергией (синтеза макроэргического АТФ) окислять в митохондриях как ЖК в форме ацетил-КоА, так и глюкозу в форме пировиноградной кислоты, ацетил-КоА. Однако клетки животных запасать *in vivo* гидрофильную глюкозу в оптимальном количестве так и не смогли. На суше у травоядных животных для депонирования экзогенной глюкозы из пищи гепатоциты стали использовать её как субстрат для синтеза пальмитиновой НЖК и пальмитиновых ТГ, в которых пальмитиновая НЖК этерифицирована в позиции *sn*-2 3-атомного спирта глицерина с вторично спиртовой группой. Со временем температура океана уменьшалась, и низкая химическая реакционная способность пальмитиновой НЖК стала серьезным препятствием для выживания всего живого. Все организмы не могут достаточно быстро депонировать и освобождать из ТГ оптимальное количество пальмитиновой НЖК. Быстро не могут окислять пальмитиновую НЖК и митохондрии; внутренняя мембрана их трудно проницаема для пальмитиновой НЖК.

В этих, казалось бы, непреодолимых условиях, клетки стали реализовать все возможности превращения синтезированной из экзогенной глюкозы пищи пальмитиновой НЖК в иную ЖК с более высокой константой скорости окисления её *in vivo*. За миллионы лет до становления в филогенезе функции инсулина инсулиноподобный фактор роста экспрессировал синтез фермента пальмитоил-КоА-десатуразы и стал превращать С16 : 0 пальмитиновую НЖК в С16 : 1 пальмитолеиновую МЖК. На этом пути «пальмитиновая НЖК → пальмитолеиновая МЖК» успеха достигнуто не было.

Через миллионы лет, при становлении в филогенезе травоядных животных, биологической функции локомоции и регуляторной активности инсулина, гормон стал обеспечивать субстратами для наработки энергии *in vivo* всю массу скелетных миоцитов. Кинетические характеристики окисления *in vivo* пальмитиновой НЖК, как и параметры движения, действия всех организмов оставались низкими. В

столь критических условиях инсулин экспрессировал синтез *in vivo* двух новых сопряжённых ферментов, из них: а) пальмитоил-КоА-элонгаза стала превращать С16 : 0 пальмитиновую НЖК в С18 : 0 стеариновую НЖК; б) стеарил-КоА-десатураза превратила С18 : 0 стеариновую НЖК в С18 : 1 цис- $\omega$ -9 олеиновую МЖК. Среди всех ЖК константа скорости окисления С18 : 1 цис  $\omega$ -9 наиболее высока. Инсулин стал тем гуморальным медиатором, гормоном, который сформировал физиологичное сочетание как высоких параметров метаболизма ЖК, так и метаболические превращения глюкозы как субстрата в синтезе олеиновой МЖК, а также окисление глюкозы в форме пирувата, ацетил-КоА в митохондриях клеток. Именно инсулин инициировал развитие животных с высокой скоростью движения при реализации ими биологической функции локомоции. На ступенях филогенеза, мы полагаем, биологическая роль инсулина состоит в том, что гормон: а) способствовал превращению на суше вышедших из океана плотоядных (рыбоядных) животных в травоядные; б) обеспечил всем животным высокие кинетические параметры движения при реализации биологической функции локомоции и в) осуществил превращение *in vivo* мало эффективного пальмитинового варианта метаболизма ЖК с постоянным дефицитом энергии в форме АТФ в потенциально высокоэффективный вариант олеинового метаболизма ЖК. В филогенезе низкая химическая активность пальмитиновой НЖК и высокая химическая активность олеиновой НЖК – основной этиологический фактор двух афизиологичных процессов – атеросклероза и атероматоза, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда. Согласно филогенетической теории общей патологии, нарушение физиологичного действия инсулина (резистентность к инсулину) оставляет основу патогенеза атеросклероза при нарушении биологических функций трофологии (питания), биологической реакции экзотрофии, биологической функции гомеостаза, адаптации и нарушения биологической функции эндозоологии [15]. Биологическую роль инсулина в формировании атеросклероза и атероматоза медленно, но стали признавать и теоретики-эндокринологи [16]; прислушиваться стали и практики-клиницисты [17–18].

Велика беда – начало.

**Заключение.** В настоящей работе проведено изучение кинетических характеристик реакций взаимодействия озона с индивидуальными насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами, имеющими различное молекулярное строение. Проведена оценка констант скоростей этих реакций. Выявлены зависимости величин этих констант от таких параметров ЖК, как длина алифатической цепи молекулы, количества ДС в ней, расположения ДС и её конфигурации. Самая высокая константа скорости оказалась у олеиновой МЖК ЖК, однако она в 4 раза меньше, чем измеренная ранее другими авторами. По мере увеличения числа ДС в молекуле и её длины константы скорости реакций их взаимодействия с озоном убывают.

Результаты работы могут быть использованы в медико-биологических приложениях при изучении метаболизма ЖК в живых организмах.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5,6, 8-10, 18  
см. REFERENCES)

1. Котельников С.Н. Основные механизмы взаимодействия озона с живыми системами и особенности проблемы приземного озона. *Труды Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН.* 2015; 71: 10 - 41.

2. Белан Б.Д. *Озон в тропосфере*. Томск: ИОА СО РАН; 2010.
3. Баллузек Ф.Б., Арча З.И., Челибанов В.П. *Озон в медицине*. Санкт-Петербург. 2005.
4. Разумовский С.В., Заиков Г.Е. *Озон и его реакции с органическими соединениями*. М.: Наука; 1974.
7. Рощина В.В. *Озон и живая клетка*. Учебное пособие к спецкурсу. Пушкино: Аналитическая микроскопия; 2009.
11. Титов В.Н., Лисицын Д.М. *Жирные кислоты. Физическая химия, биология, медицина*. М. – Тверь: Издательство «Триада»; 2006.
12. Титов В.Н., Коновалова Г.Г., Лисицын Д.М., Разумовский С.Д., Нежданова И.Б., Кухарчук В.В. Кинетика окисления жирных кислот в липидах липопротеинов низкой плотности на основании регистрации расхода окислителя и прироста продукта реакции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2005; 140(7): 45 -7.
13. Титов В.Н., Сажина Н.Н., Евтеева Н.М., Ариповский А.В., Тхагалижкокова Э.М. Титрование двойных связей в жирных кислотах плазмы крови у пациентов в тесте толерантности к глюкозе. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 1: 12 - 15.
14. Дерффель К. *Статистика в аналитической химии*. М.: Мир; 1994.
15. Титов В.Н. Синтез насыщенных, моноеновых, ненасыщенных и полиеновых жирных кислот в филогенезе, эволюционные аспекты атеросклероза. *Успехи современной биологии*. 2012; 132(2): 181 – 99.
16. Панков Ю.А. Адипогенная функция и другие биологические эффекты инсулина. *Биомедицинская химия*. 2016; 62(1): 5 - 13.
17. Титов В.Н., Ширинский В.П. Резистентность к инсулину – конфликт между биологическими настройками энергетического метаболизма и образом жизни (взгляд на проблему с эволюционных позиций). *Сахарный диабет*. 2016; 19(4): 286 -94.
6. Lisitsyn D.M., Razumovskiy S.D., Tishenin M.A., Titov V.N. Kinetic parameters of oxidation of individual fatty acids with ozone. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2004; 5: 457-9.
7. Roshchina V.V. *Ozone and a living cell. [Ozon i zhivaya kletka]*. Uchebnoe posobie k spezkursu. Pushino: Analiticheskaya mikroskopoya; 2009. (in Russian)
8. Roshchina V.V., Roshchina V.D. *Ozone and plant cell*. Dordrecht: Kluwer; 2003.
9. Cappello C., Saugel B., Huth K.C., Zwergal A., Krautkrämer M., Furman C., Rouis M., Wieser B., Schneider H.W., Neumeier D., Brand K. Ozonized low density lipoprotein (ozLDL) inhibits NF-kappaB and IRAK-1-associated signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 226 – 332.
10. Gerd H., Ledinski G, Kager G, Hallström S., Tafelit E., Koestenberger M., Jürgens G., Cvirn G. In vitro oxidation of LDL by ozone. *Chem. Physics. Lipids*. 2014; 183: 18 - 21.
11. Titov V.N., Lisizin D.M. *Fatty acid. Physical chemistry, biology, medicine. [Ghirnye kisloty. Fizicheskaya khimiya, biologiya, meditsina]*. Moscow-Tver': Izdatel'stvo «Triada»; 2006. (in Russian)
12. Titov V.N., Konovalova G.G., Lisizin D.M., Razumovskiy S.D., Naghdanova I.B., Kukharchuk V.V. Kinetics of oxidation of fatty acids in lipids of low-density lipoproteins on the basis of registration of oxidant consumption and increment of the reaction product. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2005; 140(7): 45 -7. (in Russian)
13. Titov V.N., Sazhina N.N., Evteeva N.M., Aripovskiy A.V., Thagali-jokova E.M. Titration of double bonds in fatty acids of blood plasma in patients in the test for glucose tolerance. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 1: 12 - 5. (in Russian)
14. Derffel' K. *Statistics in analytical chemistry. [Statistika v analiticheskoy khimii]*. Moscow: Mir; 1994. (in Russian)
15. Titov V.N. Synthesis of saturated, monoenoic, unsaturated and polyene fatty acids in phylogenesis, evolutionary aspects of atherosclerosis. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2012; 132(2): 181 - 99. (in Russian)
16. Pankov Yu.A. Adipogenic function and other biological effects of insulin. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2016; 62(1): 5 - 13. (in Russian)
17. Titov V.N., Schirinskiy V.P. Insulin resistance is a conflict between the biological settings of energy metabolism and the way of life (a look at the problem from the evolutionary perspective). *Sakharniy diabet*. 2016; 19(4): 286 -94. (in Russian)
18. Titov V. N. Common etiology, different pathogenesis and basics of atherosclerosis and atheromatosis prevention. Marked differences in lipoprotein-mediated fatty acids transport in blood of herbivores and carnivores. *J. Cardioprog. Found.* 2016; 4(12): 22 - 35.

## REFERENCES

1. Kotel'nikov S.N. Basic mechanisms of ozone interaction with living systems and features of the ground-level ozone problem. *Trudy instituta obshey fiziki imeni A.M. Prokhorova RAN*. 2015; 71: 10 – 41. (in Russian)
2. Belan B.D. *Ozone in the troposphere. [Ozon v troposphere]*. Tomsk: IOA SO RAN; 2010. (in Russian)
3. Balluzek F.B., Archba Z.I., Chelibanov V.P. *Ozone in medicine. [Ozon v meditsine]*. St. Peterburg; 2005. (in Russian)
4. Razumovskiy S.V., Zaikov G.E. *Ozone and its reactions with organic compounds. [Ozon i ego reaktsii s organicheskimi soedineniyami]*. Moscow: Nauka. 1974. (in Russian)
5. Razumovskiy S.D., Rakovskiy S.K., Shopov D.M., Zaikov G.E. *Ozon and its reactions with organic compounds*. Sofia. Bolgariya; 1983.

Поступила 01.06.17  
Принята к печати 09.06.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.127-005.4-074

Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Молчан Н.С., Полушин Ю.С.

## УРОВЕНЬ ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО ХУМАНИНА У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

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

*В настоящее время большой интерес вызывают новые маркёры, определяемые в общем кровотоке для оценки нарушения окислительного метаболизма тканей из-за наличия вторичной митохондриальной дисфункции, которая обычно сопровождается снижением дыхания митохондрий и является основной причиной метаболических нарушений в тканях у пациентов с ишемической болезнью сердца. В качестве одного из новых маркёров снижения окислительного метаболизма митохондрий в тканях был предложен хуманин. Изучено содержание хуманина в сравнении с другими маркёрами энергетического обмена у 59 пациентов с ишемической болезнью сердца. У обследованных пациентов наблюдалось снижение уровня хуманина до 250 нг/л по сравнению с его уровнем 1110 (800–1000) нг/л у здоровых людей. При этом у большинства пациентов наблюдался повышенный уровень молочной кислоты – от 1,0 до 2,2 мМ, в 45% случаев сопровождающийся повышением концентрации также и пирувиноградной кислоты выше 99,1 мкМ. Также было обнаружено значительное снижение уровня гомоаргинина до 1,40 (1,0–2,0) против 2,3 (1,8–3,1) мкМ у здоровых людей. Мы обнаружили обратную корреляцию между уровнем хуманина и возрастом пациентов ( $R = -0,35$ ,  $p = 0,048$ ). Можно сделать вывод, что пациенты с ишемической болезнью сердца характеризуются более низким уровнем хуманина и гомоаргинина в крови, а также повышенным содержанием молочной кислоты – показателей, являющихся критериями ингибирования аэробных путей и снижения митохондриогенеза.*

**Ключевые слова:** хуманин; гомоаргинин; молочная кислота; митохондриогенез; ишемическая болезнь сердца.

**Для цитирования:** Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Молчан Н.С., Полушин Ю.С. Уровень циркулирующего хуманина у пациентов с ишемической болезнью сердца. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (8): 466-470.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-466-470>

Zhloba A.A., Subbotina T.F., Molchan N.S., Polushin Yu.S.

THE LEVEL OF CIRCULATING HUMANIN IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; Saint-Petersburg, 197022, Russian Federation

*At present, great interest is caused with evaluation of new markers in blood circulation for the estimation a tissue oxidative metabolism disturbance due to the presence of secondary mitochondrial dysfunction in patients with coronary heart disease. Coronary heart disease is generally accompanied with a decline in mitochondrial respiration and represents the root cause of metabolic abnormalities in tissues. To gain insight into rate of decline of mitochondrial oxidative metabolism in tissues there were proposed humanin as a new marker. The content of humanin in compare with other markers of energy metabolism in 59 patients with coronary heart disease was studied. In the examined patients, a decrease in the level of humanin up to 250 ng/l was observed when compared with its level of 1110 (800 to 1500) ng/l in healthy individuals. In most of the patients increased level of lactic acid from 1.0 to 2.2 mM accompanied in 45 % cases with elevation of pyruvic acid concentration above 99.1 μM was observed. Also, it was found a significant decrease of homoarginine level down to 1.40 (1.0-2.0) versus 2.3 (1.8-3.1) μM in healthy individuals. We found an inverse correlation between the level of humanin and the age of patients ( $R = -0.35$ ,  $p = 0.048$ ). It can be concluded that patients with coronary heart disease are characterized by a lower level of humanin and homoarginine in the blood, as well as an increased content of lactic acid, indicators that are the criteria for inhibiting aerobic pathways and reducing mitochondriogenesis.*

**Key words:** humanin; homoarginine; lactic acid; mitochondriogenesis; ischemic heart disease.

**For citation:** Zhloba A.A., Subbotina T.F., Molchan N.S., Polushin Yu.S. The level of circulating humanin in patients with ischemic heart disease. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018;63 (8): 466-470 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-466-470>

**For correspondence:** : Zhloba A.A., Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Biochemistry Department of Scientific and Educational Institute of Biomedicine; e-mail: zhloba@mail.spbnit.ru

### Information about authors:

Zhloba A.A., <http://orcid.org/0000-0003-0605-7617>

Subbotina T.F., <http://orcid.org/0000-0002-2278-8391>

Polushin Yu.S. <https://orcid.org/0000-0002-6313-5856>

**Acknowledgment.** The authors would like to express their gratitude for organizational and information support to the Blood transfusion Department of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.

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

Received 16.03.2018  
Accepted 10.04.2018

Изучение и внедрение в практику лабораторной медицины биохимических маркеров степени тяжести состояния пациента перед операциями реваскуляризации миокарда до настоящего времени остаётся актуальным и практически значимым для персонализированного ведения пациента в раннем послеоперационном периоде и дальнейшей реабилитации. В настоящее время большой интерес вызывает новое семейство маркеров нарушения энергетического метаболизма в связи с наличием вторичной митохондриальной дисфункции у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС). Прогрессирование атеросклероза коронарных артерий протекает на фоне понижения уровня хуманина (ХН) в плазме крови и тканях сосудистой стенки [1]. Обнаружено, что в крови здоровых людей в возрастной группе 50–75 лет ХН на 65% больше, чем у пациентов с гипергликемией [2]. По-видимому, понижение толерантности к глюкозе сопровождается понижением уровня ХН [3]. В модельных опытах показано, что ХН вызывает повышение чувствительности клеток к инсулину [4, 5]. Пептид ХН состоит из 24 аминокислотных остатков, синтезируется на основе митохондриальной ДНК-матрицы и описан как митохондриальный фактор mt-RNR2, регулирующий окислительное фосфорилирование и тем самым продукцию АТФ [6]. Имеются сведения о том, что хуманиновая митохондриальная ДНК переносится в ядерный геном, из-за чего существуют различные ядерные ДНК-последовательности митохондриального происхождения, явление, известное как NUMT (встраивание фрагментов мтДНК в ядерный геном) [7]. Иначе говоря, в ядерном геноме имеются вырожденные ХН-подобные открытые рамки считывания – последовательности нуклеотидов в составе ДНК, способные кодировать этот пептид. В итоге в организме и соответственно в крови обнаруживаются аналоги ХН с биологической активностью [8]. Известно, что ХН интенсивно образуется не только в тканях печени и почек, но и в других богатых митохондриями тканях, включая сердечную мышцу и поперечнополосатую мышечную ткань, а также клетки нервной системы [9]. Этот пептид и его аналоги оказывают мощное цитопротекторное и антиапоптотическое действие [10, 11]. ХН и пептиды, его аналоги, при введении дают значительные положительные эффекты при патологических состояниях, ассоциированных с возрастом, включая ИБС, инсульт, болезнь Альцгеймера, ишемию-реперфузию миокарда, атеросклероз, боковой амиотрофический склероз, и при онкологических заболеваниях [12]. Таким образом, повышение уровня ХН способствует коррекции нарушенного аэробного катаболизма у лиц с перечисленными заболеваниями. С другой стороны, понижение уровня циркулирующего ХН является диагностическим признаком торможения функции митохондрия с соответствующим снижением окислительного фосфорилирования и накоплением промежуточных органических кислот. В частности, у пациентов с пониженным резервом коронарного кровотока в возрасте  $47 \pm 10$  лет уровень ХН в плазме крови составлял  $1,3 \pm 1,1$  нг/мл, что существенно ниже по сравнению с лицами с нормальным резервом кровотока –  $2,2 \pm 1,5$  нг/мл [1]. К настоящему времени исследования содержания ХН в крови человека не завершены, так как отсутствуют данные популяционных исследований прогностического значения определения ХН при сердечно-сосудистых заболеваниях. Не представлены также сведения о содержании ХН в крови пациентов с ИБС и сердечной недостаточностью, имеющих показания к операции реваскуляризации миокарда, тогда как именно в этой когорте пациентов с нарушениями кровообращения наблюдаются значительные сдвиги липидного и углеводного обмена, развитие вторичной митохондриальной дисфункции.

В настоящем исследовании проведена оценка изменения содержания ХН в плазме крови группы пациентов с ИБС,

однородной по возрасту, нозологической и функциональным характеристикам при сопоставлении наблюдаемых отклонений с другими клинико-лабораторными данными и показателями, характерными для нарушений энергетического метаболизма.

*Материал и методы.* В исследование включено 59 пациентов с ИБС (46 мужчин и 13 женщин в возрасте 51–72 лет), направленных в клинику ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова с августа 2014 по октябрь 2016 г. на плановую операцию аортокоронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения. У всех пациентов диагностированы много-сосудистое поражение коронарного русла с необходимостью реваскуляризации, хроническая сердечная недостаточность III функционального класса (фракция выброса левого желудочка не менее 50%) и артериальная гипертензия, требующая медикаментозной коррекции. Обязательным условием включения являлось также информированное согласие пациента на участие в исследовании. Протокол исследования в соответствии с принципами Хельсинкской декларации был одобрен Этическим комитетом ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Критериями невключения являлись: отсутствие согласия пациента, сопутствующая клапанная патология, перенесённый острый инфаркт миокарда в предшествующие 6 нед, сердечная недостаточность с фракцией выброса левого желудочка менее 50%, сахарный диабет, хроническая болезнь почек > 3Б ст. Венозную кровь для исследования получали непосредственно перед операцией аортокоронарного шунтирования из кубитальной вены через 15–30 мин после анестезии, но перед началом искусственного кровообращения. Методика анестезии у всех пациентов была однотипной. Различия заключались лишь в том, что у 15 пациентов в качестве основного анестетика использовали десфлуран, а у 28 – севофлуран. В остальных 16 наблюдениях ингаляционный анестетик не использовали, а анестезию осуществляли внутривенным введением пропофола. Образцы крови, взятые в вакутейнеры, содержащие этилендиаминтетраацетат натрия, немедленно помещали в холодильник (+4°C), а затем отделяли плазму путём центрифугирования (1500 об/мин, 10 мин) не позднее 30 мин после взятия. Аликвоты полученной плазмы хранили при -80°C вплоть до анализа.

Группу сравнения составили здоровые лица обоего пола, сопоставимые по возрасту с обследуемой группой пациентов – регулярные доноры старшей возрастной группы. Забор образцов крови проводили из кубитальной вены после 10-часового голодания. Процессирование и хранение образцов осуществляли так же, как и в группе пациентов. Более подробная информация об обследованных лицах представлена в табл. 1.

Уровень гомоаргинина (гArg) определяли в составе спектра 22 других аминокислот плазмы крови (за исключением аминокислот) методом обращенно-фазного ВЭЖХ-анализа на хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) по разработанной нами технологии, подробно описанной в нашем патенте [14], с использованием ортофталевого альдегида для предколоночной дериватизации и колонки Zorbax Eclipse AAA C18 (150 x 4,6) мм, 3,5 мкм. Концентрации аминокислот рассчитывали, используя норвалин в качестве внутреннего стандарта. Концентрацию общего гомоцистеина (oГци) определяли также с помощью ВЭЖХ описанным ранее методом [15].

Концентрацию молочной кислоты (МК) в плазме крови определяли колориметрически с помощью лактатоксидазного теста по набору «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Россия). Концентрацию пировиноградной кислоты (ПВК) определяли в безбелковом ультрафильтрате плазмы с использованием ЛДГ [16]. Плазму крови смешивали с 0,9% раствором NaCl в соотношении 1:2. Ультрафильтрат плаз-

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика обследованных лиц

Показатель	Группа пациентов с ИБС, $M \pm \sigma$	Группа здоровых лиц / референтный диапазон
Число наблюдений	59	30
Демографические и общеклинические данные		
Мужчины/женщины, $n$ (%)	46 (78%) / 13 (22%)	11(37%) / 19 (63%)
Возраст, годы	$61,4 \pm 6,2$	$50,4 \pm 9,2$
ОИМ в анамнезе, $n$ (%)	33 (56%)	0
Фракция выброса, % должного	$62,0 \pm 6,4$	100
Индекс массы тела, $кг/м^2$	$28,4 \pm 3,6$	До 25
Рутинные лабораторные данные		
Глюкоза, мМ	$5,4 \pm 0,7$	4,6 – 6,1
Общий холестерин, мМ	$4,5 \pm 1,5$	3,5 – 5,5
Креатинин, мкМ		
м	$91 \pm 18$	53–106
ж	$74 \pm 12$	44–97
Мочевина, мМ	$5,6 \pm 1,5$	2,9–7,5
АлАТ, Ед/л	$26 \pm 15$	До 40
АсАТ, Ед/л	$24 \pm 10$	До 40
Фибриноген, г/л	$3,4 \pm 0,8$	2,0 – 4,0
Фооновая терапия		
$\beta$ -Блокаторы, $n$ (%)	59 (100%)	–
Ингибиторы АПФ, $n$ (%)	46 (77%)	–
Антитромботические препараты, $n$ (%)	50 (85%)	—

Примечание. Собственные данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение; референтный диапазон для рутинных лабораторных показателей приведён согласно [13]; ОИМ – острый инфаркт миокарда; АПФ – ангиотензинпревращающий фермент.

мы получали центрифугированием при 2000 g в течение 1 ч при 4°C с использованием центрифужных приспособлений вместимостью 500 мкл Vivaspin 3,000 MWCO PES (Sartorius, Германия). Реакционная смесь объёмом 330 мкл включала: 130 мкл ультрафильтра, 130 мкл 50 мМ трис-НСl буфера рН 7,8, 15 мкл препарата ЛДГ (Sigma-Aldrich, США) с удельной активностью 50 Е/мл и 45 мкл 1 мМ раствора НАДН. Измеряли падение оптической плотности при 340 нм. Оно завершалось в описанных условиях через 10 мин после прибавления препарата ЛДГ при различном содержании ПВК до полного его исчерпания в реакционной смеси. Концентрацию ПВК определяли по данным предварительно полученной калибровочной кривой в аналитическом диапазоне от 10 до 200 мкМ пирувата натрия (Sigma-Aldrich, США). В качестве холодных проб служили реакционные смеси без добавления ПВК и препарата ЛДГ для определения вклада в оптическую плотность каждого из них. Сходимость и воспроизводимость результатов определения ПВК по описанной методике соответствовала установленным требованиям ( $CV$   $2,07 \pm 1,43\%$  и  $3,45 \pm 1,47\%$ , соответственно).

Уровень ХН в плазме крови человека определяли с помощью коммерческих наборов реактивов для иммуноферментного анализа поставки НПО «Иммунотэкс», <http://белкианти-тела.рф/>, Россия. Производство наборов, поставляемых НПО «Иммунотэкс», сертифицировано по ISO-13485 и ISO-9001. Все использованные нами наборы были поставлены в теплоизолирующих контейнерах с хладагентами, сохранившими требуемое охлаждение вплоть до вскрытия контейнеров в лаборатории. Исследования проводили с предварительной оценкой влияния компонентов биологической матрицы на

ход анализа, стандартные растворы белка, помимо буфера от производителя, также разводили с использованием плазмы крови от здоровых лиц (spike control). Воспроизводимость значений оптических плотностей стандартных растворов, приготовленных на буфере и плазме/сыворотке крови, соответствовала аналитическим характеристикам использованного набора реактивов, установленных производителем ( $CV < 10\%$ ). В работе использованы наборы для определения ХН (MT-RNR2L1) производства CLOUD-CLONE CORP, США и CUSABIO BIOTECH Co., Ltd., КНР, предназначенные для анализа как плазмы, так и сыворотки крови. Сведения о содержании в крови других белков, включая тропонин, амилазу, аминотрансферазы, получали из данных сопутствующего лабораторного обследования пациентов.

*Статистическая обработка данных.* Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха ( $Me(Q1-Q3)$ ). Степень соответствия распределения данных нормальному закону оценивали с помощью критериев Шапиро–Уилка и Колмогорова – Смирнова. Сравнение групп с нормальным распределением проводили с помощью  $t$ -критерия Стьюдента. В случае распределения, отличного от нормального, применяли  $U$ -критерий Манна – Уитни. Статистическую связь между данными анализировали путём вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали различия данных и корреляции при  $p < 0,05$ . Данные анализировали с применением программы Statistica 10.0 (Dell, Inc., США).

*Результаты.* Группа пациентов ко дню оперативного вмешательства характеризовалась небольшими отклонениями концентраций рутинных биохимических показателей от референтных значений: глюкоза  $5,4 \pm 0,7$  мМ, общий холестерин  $4,5 \pm 1,5$  мМ, креатинин у лиц мужского пола составил  $91 \pm 18$ , а женского –  $74 \pm 12$  мкМ. Следует отметить, что из рутинных биохимических показателей ко дню операции отклонение от референтных интервалов наблюдалось лишь у некоторых из них, в том числе у шести уровень глюкозы крови был больше 6,0 мкМ, оГци выше 10 мкМ – у девяти и креатинина выше 0,1 мМ – у шести. Существенного отклонения в содержании ферментов – маркёров проницаемости клетки у пациентов не обнаружено. В среднем, уровень МК в крови пациентов был выше, чем у здоровых (табл. 2), но лишь у троих из них превышал границу 2,2 мМ, применяемую на практике для определения у пациента состояния лактатацидоза [16]. Уровень ХН плазмы крови у этих пациентов был ниже 400 нг/л. 47 пациентов из 59 характеризовались уровнем МК от 1 до 2,2 мМ, т. е. выше границы 90-го перцентиля, известной для концентраций МК, выявляемых у здоровых людей [16]. Таким образом, у большинства пациентов было повышение уровня МК от 1,0 до 2,2 мМ, которое у 21 (45%) пациента сопровождалось пируватемией выше 99,1 мкМ (90-й перцентиль группы здоровых). Только у одного из числа этих пациентов уровень ХН был выше 400 нг/л.

Как следует из данных, представленных на рисунке, уровень ХН в плазме крови, полученной из кубитальной венозной крови пациентов, значительно ниже ( $p = 1 \cdot 10^{-5}$ ), чем в образцах, полученных от доноров. Содержание ХН на уровне верхнего квартиля у пациентов составило 398 нг/л. В группе доноров содержание ХН в крови ниже этого значения выявлено только однократно и составило 320 нг/л, а у остальных оно колебалось от 740 до 1960 нг/л (см. рисунок). В настоящем исследовании обнаружена отрицательная корреляционная связь уровня ХН и возраста от 51 года до 72 лет у пациентов обоего пола ( $R = -0,35$ ,  $p = 0,048$ ). Размер использованной для исследования выборки позволил обнаружить слабую отрицательную корреляционную связь между уровнем ХН и нарастанием соотношения содержания МК и содержания ПВК у пациентов ( $R = -0,30$ ,  $p = 0,09$ ). Чувстви-

Таблица 2

Показатели, метаболически связанные с функцией митохондрий

Показатель	Группа пациен- тов с ИБС, <i>n</i> = 59	Группа здоровых лиц ( <i>n</i> = 30) / референт- ный интервал	<i>p</i>
Молочная кислота, мМ	1,5 (1,2–1,8)	0,5–1,0 [16]	< 0,001
Пировиноградная кислота, мкМ	94 (71–114)	15–100 [16]	< 0,001
Отношение МК/ПВК	16,2 (13,3–18,7)	7–28 [16]	> 0,05
Хуманин, нг/л	308 (258–398)	1110 (800–1500)	< 0,000001
Гомоаргинин, мкМ	1,40 (1,0–2,0)	2,3 (1,8–3,1) [14]	< 0,000001
Аланин, мкМ	304 (253–355)	344 (317–412)	> 0,05
Метионин, мкМ	24 (19 – 28)	17 (11 – 22)	0,0003
оГци, мкМ	7,8 (6,1 – 10,5)	8,1 (6,5 – 10,3)	0,92
Отношение оГци/Мет	0,35 (0,23–0,52)	0,57 (0,35–0,74)	0,003
Гли, мкМ	210 (173–292)	260 (227–324)	0,00003
Сер, мкМ	105 (85–127)	75 (67–97)	0,0008
Отношение Сер/Гли	0,50 (0,44–0,59)	0,31 (0,27–0,38)	< 0,000001

Примечание. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала; референтные интервалы представлены в виде диапазона концентраций между 10-м и 90-м перцентилями у здоровых людей; достоверность различий оценивалась с помощью непараметрического теста Манна–Уитни.

тельности использованных тест-систем было достаточно для регистрации снижения уровня ХН до 175 нг/л в крови обследованных пациентов, что почти в 10 раз ниже, чем уровни ХН, выявляемые у доноров.

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что другие нарушения энергетического метаболизма также характерны для обследованных пациентов с ИБС. В частности, отмечается более высокий, чем в группе сравнения, уровень МК и ПВК, повышенный уровень метионина ( $p = 0,0003$ ) и низкий уровень гомоаргинина ( $p = 1 \cdot 10^{-5}$ ). Примечательно, что понижение уровня ХН и гомоаргинина в крови пациентов является с одинаково высокой достоверностью.

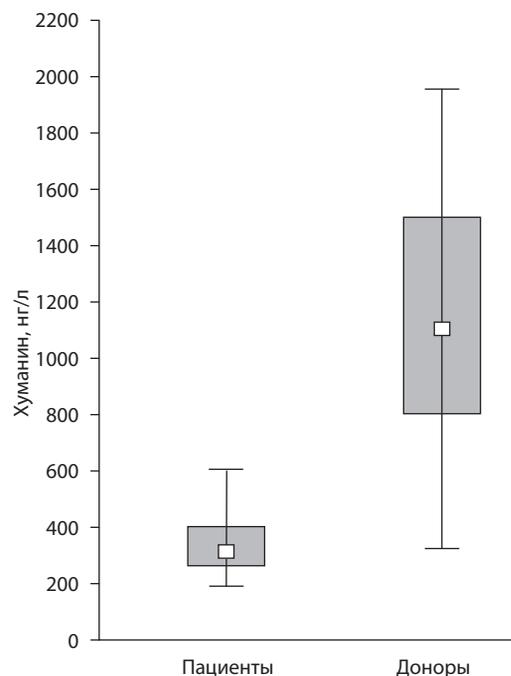
**Обсуждение.** У подавляющего большинства обследованных пациентов обоего пола уровень ХН был ниже 400 нг/л. Уровень ХН не имел отчётливых корреляций ни с уровнем гликемии, лактатемии, креатинина, общего гомоцистеина, холестеринемии, ни с другими клинико-биохимическими показателями, что свидетельствует о самостоятельном диагностическом значении данного показателя.

Скорость образования ХН в тканях и его содержание в крови в малой степени зависят от текущего изменения потоков субстратов и продуктов энергетического метаболизма, а связаны с имеющимся количеством функционально активных митохондрий. Уровень ХН в плазме/сыворотке соответствует митохондриогенезу в тканях [17]. Вслед за усилением образования митохондрий в тканях увеличивается и уровень ХН в крови, а это в свою очередь способствует увеличению потребления глюкозы из кровотока чувствительными к инсулину клетками [5]. Поэтому при определении только ХН, в отличие от информации, получаемой при определении МК и ПВК как показателей активации гликолитического метаболизма, мы не сможем сделать вывод о соотношении аэробного и анаэробного окисления субстратов, но сможем судить о состоянии образования полноценных митохондрий, необходимых для глубокого окисления органических кислот.

ХН в настоящее время известен как показатель, количественно характеризующий уровень общего пула эффективных митохондрий в организме, за счёт которых должны происходить важные для клетки энергоёмкие процессы, в том числе: окисление субстратов до углекислого газа и воды, формирование трансмембранного потока ионов водорода, окислительное фосфорилирование и регуляция трансмембранного переноса ионов кальция. С возрастом наблюда-

ся снижение уровня ХН в кровотоке [5]. У детей препубертатного и пубертатного периодов, независимо от пола, ХН в крови регистрируется на уровне  $1800 \pm 400$  нг/л [3]. Другие данные указывают на более высокий уровень ХН у здоровых детей – девочек в возрасте от 3 до 19 лет, составивший в среднем около 2000 нг/л, чем у сверстниц, больных диабетом 1-го типа, составивший примерно 1300 нг/л [18]. В этом исследовании отмечается также имеющее место повышение уровня ХН во время пубертатного периода. Имеющиеся данные указывают на существование разницы в содержании ХН как в зависимости от возраста, так и в связи с наличием патологического процесса, связанного с нарушением регуляции энергетического метаболизма или развитием атеросклероза. При этом затруднительно оценивать изменения абсолютных концентраций ХН в различных исследованиях, так как все описанные результаты получены методом ИФА в различных условиях. Неясно, сколько из 6–7 возможных форм циркулирующего ХН выявляется в проведённых исследованиях. В значительной степени это объясняется недостатком информации от производителей наборов о возможных перекрёстных реакциях с различными вариантами ХН. Критическое понижение уровня ХН наблюдается от уровня около 1400 нг/л (у 45–65-летних лиц), 1300 нг/л (у 66–80-летних) и до, примерно, 700–800 нг/л у лиц старше 81 года [5]. Это подтверждается данными, полученным нами как в отношении доноров, так и пациентов.

В отличие от гомоаргинина [19, 20] ХН крови как системный показатель состояния энергетического метаболизма до сих пор не охарактеризован в больших популяционных иссле-



Медиана, межквартильный размах и дисперсия 10-го–90-го перцентилей пациентов с ИБС ( $n = 59$ ) и сравнительной группы доноров ( $n = 30$ ). Различия достоверны ( $p = 1 \cdot 10^{-5}$ , тест Манна–Уитни).

дованиях. Показано, что определение уровня гомоаргинина может рассматриваться при прогнозировании возможного инсульта и инфаркта [20–22]. В отношении ХН предприняты лишь отдельные моноцентровые исследования с небольшими когортами пациентов или лицами групп сравнения. Данные о возрастных колебаниях уровня ХН изложены во введении и также ограничены несколькими исследованиями. К настоящему времени следует ожидать появления сведений о референтных интервалах уровня ХН в крови человека, так как на рынке появились надежные тест-системы для определения этого пептидного маркера митохондриогенеза.

**Заключение.** При интерпретации данных определения белковых и метаболических маркеров митохондриальной дисфункции у пациентов только у отдельных лиц наблюдалось отсутствие биохимических признаков существенного нарушения энергетического метаболизма. Митохондриальный пептид хуманин, постоянно выделяющийся в кровь, при нарушении кровообращения в связи с ИБС характеризуется значительным снижением содержания в крови от 1500 нг/л у здоровых лиц до 250 нг/л у пациентов. Низкий уровень ХН в сочетании с высоким уровнем молочной кислоты больше 2,2 мМ следует расценивать в качестве маркера наиболее тяжёлого состояния пациентов с ИБС в связи с торможением митохондриогенеза и функции митохондрия организма.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность менеджменту ПСПбГМУ им. И.П. Павлова за организационную и информационную поддержку в ходе проведения настоящего исследования.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-8, 10-12, 15, 17-22 см. REFERENCES)

9. Биоинформационная база данных Uniprot (2018) [Электронный ресурс]. Available at: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8IVG9> (accessed 6 march 2018).
13. Тиц Н.У., ред. *Клиническая оценка лабораторных тестов: Справочник* (пер. с англ.). М.: Медицина; 1986.
14. Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Шипаева К.А. Способ определения содержания гомоаргинина в плазме крови и других биологических жидкостях человека. Патент РФ № 2609873; 2017.
16. Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Алексеевская Е.С., Моисеева О.М., Гаврилюк Н.Д., Иртыго О.Б. Уровень циркулирующего PGC1 $\alpha$  при сердечно-сосудистых заболеваниях. *Биомедицинская химия*. 2016; 62(2): 198-205.

#### REFERENCES

1. Widmer R.J., Flammer A.J., Herrmann J., Rodriguez-Porcel M., Wan J. et al. Circulating humanin levels are associated with preserved coronary endothelial function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2013; 304: H393–7.
2. Voigt A., Jelinek H. F. Humanin: a mitochondrial signaling peptide as a biomarker for impaired fasting glucose-related oxidative stress. *Physiological Reports*. 2016; 4(9): 1-5.
3. De Dona V., Ciaccio M., Wan J., Guercio G., Vaiani E., Krochik G. et al. Plasma humanin levels during normal childhood and huberty. Study of possible correlations with sex, age, and insulin levels *Horm. Res. Paediatr.* 2014; 82 (suppl. 1).
4. Hoang P.T., Park P., Cobb L.J., Paharkova-Vatchkova V., Hakimi

- M., Cohen P. et al. The neurosurvival factor Humanin inhibits beta-cell apoptosis via signal transducer and activator of transcription 3 activation and delays and ameliorates diabetes in nonobese diabetic mice. *Metabolism*. 2010; 59(3): 343-9.
5. Muzumdar R.H., Huffman D.M., Atzmon G., Buettner C., Cobb L.J., Fishman S. et al. Humanin: A novel central regulator of peripheral insulin action. *PLoS ONE*. 2009; 4(7): e6334.
6. Remor A.P., de Matos F.J., Ghisoni K., da Silva T.L., Eidt G., Búrigo M. et al. Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: involvement of advanced glycosylated end products. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011; 1812(11): 1460–71.
7. Lee C., Yen K., Cohen P. Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides? *Trends Endocrinol. Metab.* 2013; 24(5): 222–8.
8. Bodzioch M., Lapicka-Bodzioch K., Zapala B., Kamysz W., Kiec-Wilk B., Dembinska-Kiec A. Evidence for potential functionality of nuclearly-encoded humanin isoforms. *Genomics*. 2009; 94(4): 247-56.
9. Uniprot, the unified database (2018). Available at: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8IVG9> (accessed March, 6 2018).
10. Hill S., van Remmen H. Mitochondrial stress signaling in longevity: A new role for mitochondrial function in aging. *Redox. Biol.* 2014; 2: 936–44.
11. Gao G.S., Li Y., Zhai H., Bi J.W., Zhang F.S., Zhang X.Y. et al. Humanin analogue, S14G-humanin, has neuroprotective effects against oxygen glucose deprivation/reoxygenation by reactivating Jak2/Stat3 signaling through the PI3K/AKT pathway. *Exp. Ther. Med.* 2017; 14(4): 3926-34.
12. Gong Z., Tas E., Musumdar R. Humanin and age-related diseases: a new link? *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2014; 5: 210.
13. Tietz N.W., ed. *Clinical Guide to Laboratory Tests [Klinicheskaya otsenka laboratornykh testov]*. Moscow: Meditsina; 1986. (in Russian)
14. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Shipaeva K.A. The way for determination the content of homoarginine in blood plasma and other biological fluids of human. Patent RF N 2609873; 2017. (in Russian)
15. Zhloba A.A., Subbotina T.F. Homocysteinylated score of high-molecular weight plasma proteins. *Amino Acids*. 2014; 46(4): 893-9.
16. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Alekseevskaya E.S., Moiseeva O.M., Gavrilyuk N.D., Irtyuga O.B. The level of circulating PGC1 $\alpha$  in cardiovascular diseases. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2016; 62(2): 198-205. (in Russian)
17. Hipkiss A.R. Mitochondrial dysfunction, proteotoxicity, and aging: causes or effects, and the possible impact of NAD<sup>+</sup>-controlled protein glycation. *Adv. Clin. Chem.* 2010; 50: 123-50.
18. Hernandez, M., Wan, J., Valdes, C., Avila, A., Codner, E., Cohen, P. Reduced Humanin Levels in Children with Type-1 Diabetes Mellitus. *Horm. Res. Paediatr.* 2015; 84(suppl. 2): 12.
19. März W., Meinitzer A., Drechsler C., Pilz S., Krane V., Kleber M.E. et al. Homoarginine, cardiovascular risk, and mortality. *Circulation*. 2010; 122(10): 967–75.
20. Pilz S., Meinitzer A., Tomaschitz A., Drechsler C., Ritz E., Krane V. et al. Low homoarginine concentration is a novel risk factor for heart disease. *Heart*. 2011; 97 (15): 1222–7.
21. Atzler D., Rosenberg M., Anderssohn M., Choe C.U., Lutz M., Zugck C. et al. Homoarginine—an independent marker of mortality in heart failure. *Int. J. Cardiol.* 2013; 168(5): 4907–9.
22. Raedle-Hurst T., Mueller M., Meinitzer A., Maerz W., Dschietzig T. Homoarginine-A prognostic indicator in adolescents and adults with complex congenital heart disease? *PLoS One*. 2017; 12(9): e0184333.

Поступила 16.03.18

Принята к печати 10.04.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.132.2-089.86-037-074

Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Гапон Л.И., Горбатенко Е.А., Дьячков С.М., Шароян Ю.А., Зуева Е.В.

## ПРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ПАРАМЕТРОВ ЛИПИДНОГО СПЕКТРА И МАРКЁРОВ СОСУДИСТОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА С ПРОГНОЗОМ НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫХ КОРОНАРНЫХ СОБЫТИЙ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА ПОСЛЕ АНГИОПЛАСТИКИ СО СТЕНТИРОВАНИЕМ

Тюменский кардиологический научный центр, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, 625026, Томск, Россия

*Исследование причин развития сосудистых коронарных осложнений после ангиопластики со стентированием с использованием оценки биохимических параметров при динамическом наблюдении за больными ишемической болезнью сердца (ИБС) со значимым коронарным стенозом определяет актуальность исследования. Проводился анализ параметров липидного спектра и маркёров сосудистой воспалительной реакции у пациентов с ИБС, в группах со стабильной стенокардией и эпизодом нестабильной стенокардии после ангиопластики со стентированием, чтобы проследить динамику биохимических параметров и выявить предикторы нежелательных коронарных событий. Больные ИБС с выявленным значимым коронарным стенозом артерий (n = 95) после проведённой коронароангиографии в точке максимального повышения уровня маркёров воспалительной реакции (3 мес после ангиопластики) разделены на две группы – пациенты с сохраняющейся стабильной стенокардией (n = 77) до конца исследования и пациенты с развившимся постреструктуризационным эпизодом нестабильной стенокардии (n = 18) после ангиопластики со стентированием. Зарегистрировано отсутствие нормализации атерогенного спектра липидного профиля и пролонгированный характер сосудистого воспалительного ответа до конечной точки наблюдения после ангиопластики. Методом бинарной логистической регрессии выявлено, что в общей группе пациентов с ИБС повышение уровня холестерина липопротеинов низкой плотности на 1 ммоль/л достоверно увеличивает вероятность развития значимого коронарного стеноза у мужчин и повышает риск возникновения нестабильной стенокардии после ангиопластики в 7,387 раза. Установлено, что пациенты с нестабильной стенокардией на исходном этапе имеют достоверно более высокий риск развития нестабильности коронарного кровотока в постреструктуризационном периоде за счёт повышенного уровня гомоцистеина. Выявлена совокупность биохимических маркёров для прогнозирования значимости коронарного стеноза и развития нежелательных сосудистых коронарных событий после ангиопластики у больных ИБС – это мужской пол, повышенный уровень холестерина липопротеинов низкой плотности и гипергомоцистеинемия.*

**Ключевые слова:** стенокардия напряжения; ангиопластика со стентированием; липидный спектр; маркёры воспаления.

**Для цитирования:** Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Гапон Л.И., Горбатенко Е.А., Дьячков С.М., Шароян Ю.А., Зуева Е.В. Проспективный анализ параметров липидного профиля и маркёров сосудистого воспалительного ответа с прогнозом нежелательных коронарных событий у больных ишемической болезнью сердца после ангиопластики со стентированием. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (8): 471-477. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-471-477>

*Petelina T.I., Musikhina N.A., Gapon L.I., Gorbatenko E.A., Dyachkov S.M., Sharoyan Yu.A., Zueva E.V.*

PROSPECTIVE ANALYSIS OF PARAMETERS OF LIPID SPECTRUM AND MARKERS OF INFLAMMATORY VASCULAR RESPONSE WITH PROGNOSIS OF UNDESIRABLE CORONARY EVENTS IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE AFTER ANGIOPLASTY WITH STENTING

Tyumen Cardiology Research Center, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, 625026, Tomsk, Russia

*The study of the causes of the development of vascular coronary complications after angioplasty with stenting using the evaluation of biochemical parameters in the dynamic observation of patients with IHD with significant coronary stenosis determines the relevance of the study.*

*To analyze the parameters of lipid spectrum and markers of vascular inflammatory reaction in patients with IHD, in groups with stable angina and episode of unstable angina after angioplasty with stenting, to trace the dynamics of biochemical parameters and to reveal the predictors of undesirable coronary events.*

*Patients with IHD with significant coronary stenosis of the arteries (SCS, n = 95) after coronary angiography at the point of maximum increase in the level of markers of the inflammatory reaction (3 months after angioplasty) are divided into 2 groups - patients with persistent stable angina pectoris (SA, n = 77) until the end of the study and patients with developed postvascularization episode of unstable angina (UA, n = 18).*

*The dynamics of observation of biochemical parameters recorded the absence of normalization of the atherogenic spectrum of the lipid profile and the prolonged nature of the vascular inflammatory response to the end point of observation after angioplasty. The method of binary logistic regression revealed that in the general group of patients with IHD, an increase in the level of low density lipoprotein cholesterol by 1 mmol / L significantly increases the probability of significant coronary stenosis in men and raises the risk of UA after angioplasty by 7.38 times. It was found that patients with UA at the initial stage have a significantly higher risk of coronary blood flow instability in the post-vascularization period due to an elevated level of homocysteine.*

**Для корреспонденции:** Петелина Татьяна Ивановна, д-р мед.наук, ст. науч. сотр. отд-ния артериальной гипертензии и коронарной недостаточности научного отдела клинической кардиологии; e-mail: [petelina@cardio.tmn.ru](mailto:petelina@cardio.tmn.ru)

*A set of biochemical markers for predicting the significance of coronary stenosis and development of undesirable vascular coronary events after angioplasty in patients with IHD has been identified: male sex, elevated LDL cholesterol and hyperhomocysteinemia.*

**Key words:** *angina pectoris; angioplasty; stenting; lipid spectrum; markers of inflammation.*

**For citation:** *Petelina T.I., Musikhina N.A., Gapon L.I., Gorbatenko E.A., Dyachkov S.M., Sharoyan Yu.A., Zueva E.V. Prospective analysis of lipid profile parameters and markers of vascular inflammatory response with prognosis of undesirable coronary events in patients with coronary heart disease after angioplasty with stenting. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (8): 471-477 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-471-477>*

**For correspondence:** *Petelina T.I., MD, senior research fellow of the Department of Arterial Hypertension and Coronary Insufficiency; e-mail: [petelina@cardio.tmn.ru](mailto:petelina@cardio.tmn.ru)*

**Information about the authors:**

*Petelina T.I., <http://orcid.org/0000-0001-6251-4179>*

*Musikhina N.A., <http://orcid.org/0000-0001-9607-7245>*

*Gapon L.I., <http://orcid.org/0000-0002-3620-0659>*

*Gorbatenko E.A., <http://orcid.org/0000-0003-0858-2933>*

*Dyachkov S.M., <http://orcid.org/0000-0002-3238-3259>*

*Sharoyan Yu.A., <http://orcid.org/0000-0001-9998-5409>*

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

**Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

Received 09.04.2018  
Accepted 18.04.2018

Заболевания сердечно-сосудистой системы (ССЗ) остаются основной причиной инвалидизации и смертности населения развитых стран, более половины всех случаев ССЗ приходится на долю заболеваний атеротромботической природы, в частности ишемической болезни сердца (ИБС) [1]. Характерной чертой ИБС является непредсказуемость развития острых коронарных событий, основным патогенетическим фактором которых является нарушение целостности нестабильной атеросклеротической бляшки, вызывающее образование тромба в просвете коронарной артерии. В настоящее время ведётся активный поиск биохимических маркеров, являющихся предикторами развития острых атеротромботических событий. К их числу относятся параметры, характеризующие липидный спектр сыворотки крови и маркёры системной и локальной активности сосудистого воспаления, из которых наиболее изученными являются С-реактивный белок (СРБ), интерлейкины (ИЛ) 6, 8, матриксные металлопротеиназы (ММП 2 и 9), система сигнальных молекул рецептор CD40 - лиганд CD40 и другие [2-4].

Метод коронарного стентирования является одним из наиболее распространённых способов лечения пациентов с различными формами ИБС, характеризуюсь эффективным восстановлением коронарного кровотока и стабилизацией состояния пациентов. Прогноз у больных после чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) определяется рядом факторов. В качестве предикторов неблагоприятного прогноза у данной категории больных в первую очередь изучались клинические прогностические признаки, такие как пол, возраст, наличие сахарного диабета (СД). [5-7] Однако, если клинические и ангиографические параметры коронарных осложнений ангиопластики достаточно хорошо известны, то изменения лабораторных показателей, способствующие их развитию, представлены недостаточно. Так, опубликованы данные, свидетельствующие о том, что СРБ, уровень ингибитора активатора плазминогена-1, активность фактора фон Виллебранда, скорость оседания эритроцитов, уровень эозинофилов и миелопероксидазы являются предикторами неблагоприятных прогнозов после ЧКВ со стентированием и имплантацией стентов с лекарственным покрытием, однако результаты подчас противоречивы. [8-12] Неоднозначная роль биохимических медиаторов в развитии осложнений после ангиопластики со стентированием и отсутствие единого мнения о сроках определения побуждают конкретизировать их значимость в характере течения пострераскуляризации-

ной ИБС и развитии возможных нежелательных коронарных событий.

Цель исследования - провести анализ параметров липидного спектра и маркёров сосудистой воспалительной реакции у пациентов с ИБС, в группах со стабильной стенокардией (СС) и эпизодом нестабильной стенокардии (НС) после ангиопластики со стентированием, проследить динамику биохимических параметров и выявить предикторы нежелательных коронарных событий.

**Материал и методы.** Проанализированы результаты обследования 143 пациентов с ИБС, проходивших стационарное лечение на базе отделения неотложной кардиологии «Тюменского кардиологического научного центра», Томского национального исследовательского медицинского центра РАН. Распределение общего количества пациентов проводилось по параметру значимости коронарного стеноза, определённому как сужение  $\geq 75\%$  диаметра просвета артерии. После селективной коронарной ангиографии (КАГ) была выделена группа пациентов с наличием значимого коронарного стеноза (ЗКС;  $n = 95$ ), которая по клиническим данным была подразделена на группу пациентов со СС ( $n = 53$ ) и НС ( $n = 42$ ).

Исследование изучаемых параметров проводилось при поступлении пациента в стационар перед КАГ и через 3, 6 и 12 мес после выполнения ангиопластики с установкой стента с лекарственным покрытием на фоне приёма стандартной терапии (ингибиторы АПФ,  $\beta$ -адреноблокаторы, дезагреганты – клопидогрел и/или ацетилсалициловая кислота, статины). Средний срок наблюдения составил  $12 \pm 1,4$  мес.

Протокол исследования одобрен Этическим комитетом учреждения. Перед включением в исследование от каждого из его участников было получено письменное информированное согласие на использование результатов исследования в научных целях.

Диагноз ИБС, критерии СС и НС, дислипидемии, степень тяжести артериальной гипертензии, хронической сердечной недостаточности (ХСН), ожирения верифицированы, а плановая терапия подобрана в стационаре на основании действующих современных национальных и международных клинических рекомендаций по диагностике и лечению, разработанных комитетом экспертов Российского общества кардиологов, Всемирной организации здравоохранения, Американской ассоциации сердца и Европейского общества кардиологов соответственно.

Натошак производился забор венозной крови в одноразовые пробирки системы Vacuette (Япония), кровь центрифугировали 15 мин при 2500 оборотах на центрифуге Sigma (Германия). Сыворотку крови пациентов аликвотировали для дальнейшего замораживания (при  $-70^{\circ}\text{C}$ ).

На биохимическом автоматическом анализаторе Cobas Integra 400 plus (Швейцария) исследовали параметры липидного обмена. Определение общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой и низкой плотности (ЛПВП и ЛПНП) проводили прямым энзиматическим колориметрическим методом; концентрации апоА-I, апоВ, липопротеинов а (Лп-а) проводили методом иммунотурбидиметрии при использовании аналитических наборов и контрольных материалов Roche Diagnostics GmbH (Германия).

В качестве биохимических маркёров воспаления определяли: высокочувствительный С-реактивный белок (вч-СРБ, референсные значения 0,0-3 мг/л) – иммунотурбидиметрическим методом, используя аналитический набор «С-reactive protein hs» (BioSystem, Испания), на полуавтоматическом анализаторе открытого типа Clima MC-15 (Испания); ИЛ-1 $\beta$  (референсные значения 0,0-5,0 пг/мл), ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО $\alpha$  (референсные значения 0,00–8,11 пг/мл) - «сэндвич» и гомоцистеин (НУС, референсные значения 5,0-15,0 мкмоль/л) - конкурентным методом (твердофазный хемилюминесцентный иммуноферментный анализ) на анализаторе IMMULITE 1000 (Siemens Diagnostics, США); растворимый CD40-лиганд (sCD40 L, референсные значения 0,03-3,98 нг/мл) - методом «иммуноферментного сэндвича» с использованием наборов Human sCD40L Elisa на анализаторе Bender MedSystems, Австрия; рецептор CD40 (референсные значения 53,3-156,8 нг/мл) и матриксную металлопротеиназу-9 (ММП-9, референсные значения 20,3-77,2 нг/мл) - Bender MedSystems an eBioscience company, Австрия; тканевой ингибитор металлопротеиназы -1 (TIMP-1, референсные значения 92-116 нг/мл) - Human TIMP-1 Elisa K.t Invitrogen, США, на анализаторе Personal Lab, Италия.

Показатели функциональной активности эндотелия в сыворотке крови: уровень нитритов (референсное значение  $3,77 \pm 0,87$  нмоль/л) определяли на биохимическом анализаторе Humalyzer 2000 Human (Германия, 1995) и эндотелина-1-21 (референсные значения 0,2-0,7 фмоль/л) - на иммуноферментном полуавтоматическом анализаторе «Dynatech» (Германия, 1989 г).

Комплексную оценку состояния сосудистого русла проводили высокотехнологичным методом исследования – селективной КАГ с помощью ангиографических комплексов «Diagnost ARC A», « Poly diagnost C», «Integris Allura» (Philips, Голландия) по стандартной методике Judkins из феморального доступа. ЧКВ выполняли методом транслюминальной баллонной ангиопластики со стентированием. В обеих группах были имплантированы однотипные стенты с лекарственным покрытием (Taxis, Promus Element, Nobori).

*Статистические методы исследования.* Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета прикладных программ Statistica (SPSS Inc, ver 11.5). Для оценки нормальности распределения применялся критерий Колмогорова – Смирнова. Для обнаружения различий между группами в количественных переменных нормального распределения использовался t-критерий Стьюдента, для сравнения качественных и количественных величин, не являющихся нормальными, – непараметрический критерий Манна–Уитни. Сравнение групп между собой проводили с помощью критерия Вилкоксона для парных измерений. Данные представлены в виде средних значений с указанием стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ). Достоверность различий выявляли при  $p < 0,05$ . Оценка взаимосвязи признаков проводилась с ис-

пользованием коэффициентов ранговой корреляции Пирсона и Спирмена для количественных и качественных величин соответственно. Для выявления предикторов среди общего числа изучаемых параметров использовали метод бинарной логистической регрессии.

*Результаты.* По полученным нами ранее результатам проспективного наблюдения пациентов в общих группах, поступивших со СС и НС и перенёсших ангиопластику со стентированием, отмечено, что в течение 12 мес регистрировались признаки коррекции исходно повышенных уровней атерогенных фракций липидов, параметров воспалительной сосудистой реакции и эндотелиальной дисфункции. При этом отмечено, что достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение уровня атерогенных фракций ОХС, ЛПНП и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), ТГ наблюдалось спустя 6 мес в группе со СС и через 12 мес - в группе с НС. Выявлен пролонгированный ответ системного вч-СРБ и локальных воспалительных реакций (ФНО $\alpha$ , гомоцистеина, ИЛ-1 $\beta$ , ММП-9) с максимумом значений спустя 3 мес и снижением показателей с тенденцией к целевому уровню спустя 6 мес при СС и через 12 мес при НС после ангиопластики со стентированием.

Параллельный однонаправленный рост уровня параметров сосудистой воспалительной реакции к точке 3 мес после ангиопластики на фоне сохраняющейся гиперхолестеринемии определил пациентов со ЗКС независимо от клинического проявления ИБС как пациентов, имеющих повышенный риск развития ранних рестенозов, а сохраняющийся процесс пролонгированного вялотекущего течения воспалительной реакции до конечной точки наблюдения не исключал развития поздних атеротромботических осложнений.

В последние годы, по мере увеличения частоты ЧКВ со стентированием, всё больше внимания уделяется решению проблем, связанных с атеротромбозом и рестенозом внутри стентов, которые выявляются приблизительно в 10-40 и 0,87-2,2% случаев в течение первого года после постановки стента соответственно [13, 14].

В качестве пускового момента в развитии рестенозов рассматривается комбинированное поражение - механическое повреждение интимы и медиа артерий с усугублением местной воспалительной реакции, а также гиперчувствительность к материалам стента с вовлечением в процесс реакции эозинофильных гранулоцитов [15].

Принимая во внимание пик активации воспалительной реакции через 3 мес наблюдения, мы проанализировали динамику маркёров липидного профиля и сосудистой воспалительной реакции у пациентов с сохраняющейся СС и пациентов с вновь возникшим эпизодом НС в пострестенозном периоде. Установлено, что у пациентов со ЗКС после ангиопластики со стентированием ( $n = 95$ ) стабильность состояния пациентов из исходных групп сохранялась на протяжении дальнейшего анализируемого срока наблюдения в 81,1% случаев ( $n=77$ ), развитие эпизода пострестенозирования НС зарегистрировано в 18,9% случаев ( $n=18$ ). Выявлено, что пострестенозирования эпизод НС в 72,2% случаев ( $n = 13$ ) достоверно ( $p = 0,02$ ) чаще отмечен у пациентов с исходной нестабильностью коронарного кровотока на начальном этапе исследования и лишь в 27,8% случаев ( $n = 5$ ) - у пациентов с исходной СС. Среди пациентов с пострестенозирования эпизодом НС после проведенной диагностической КАГ у 4 (1,3%) выявлен рестеноз стентированного коронарного сосуда.

Сравнительная характеристика клинико-anamnestических параметров у пациентов, перенёсших ангиопластику со стентированием, в зависимости от клинического варианта течения ИБС, зарегистрированного в ходе наблюдения, представлена в табл. 1 и 2.

Согласно данным табл. 1, пациенты со СС и пострестено-

Таблица 1

**Характеристика факторов риска у пациентов со стабильной стенокардией и постриваскуляризационным эпизодом нестабильной стенокардии (M±SD)**

Показатель	Пациенты СС (n = 77)	Пациенты с эпизодом НС (n = 18)
Табакокурение	29,9% (n = 23)	22,2% (n = 4)
Отягощённая наследственность по ИБС	24,4% (n = 19)	11,1% (n = 2)
ИБС без АГ	10,4% (n = 8)	27,8% (n = 5)
Перенесённый ИМ	44,2% (n = 34)	44,4% (n = 8)
Дислипидемия	94,8% (n = 73)	94,4% (n = 17)
СД 2-го типа	33,8% (n = 26)	27,8% (n = 5)
Стаж ИБС, годы	6,95 ± 5,87	9,26 ± 7,43
Стаж табакокурения, годы	10,43 ± 1,19	9,75 ± 2,3
Стаж СД 2-го типа, годы	4,67 ± 2,46	5,44 ± 2,61

Примечание. Здесь и в табл.2: n - количество пациентов, % - процент от общего числа обследуемых в группе; ИМ – инфаркт миокарда.

скуляризационным эпизодом НС оказались сопоставимы по частоте распространения факта и стажу табакокурения, отягощенной наследственности по ИБС, перенесённого ИМ, наличию и стажу ИБС, СД 2-го типа.

В соответствии с данными, представленными в табл. 2, пациенты обеих групп достоверно не различались по ряду параметров, рассмотренных как возможные факторы риска неблагоприятных коронарных событий. Основную часть пациентов составили лица мужского пола с однососудистым ЗКС, ИБС преимущественно в рамках стенокардии напряжения (СН) II ФК в сочетании с АГ III степени, ХСН II ФК (NYHA) и ожирением I степени тяжести.

Сравнительная характеристика параметров липидного спектра пациентов со СС и с постриваскуляризационным эпизодом НС представлена в табл. 3. Представлена точка максимального повышения изучаемых параметров и конечная точка исследования.

Как видно из табл. 3, в ходе проспективного анализа параметров липидного спектра у пациентов со СС выявлено достоверное снижение значений ОХС и ЛПНП при сохранении уровня показателей выше референсных значений. Выявлено постоянство высоких значений уровня ТГ и ЛП-а. Зарегистрировано достоверное снижение параметров ЛПОНП и апоВ/апоА-I с достижением целевых уровней к конечной точке наблюдения. Статистически значимое увеличение апоА-I прослеживается в рамках референсных значений. Проспективный анализ параметров липидного спектра у пациентов с постриваскуляризационным эпизодом НС не выявил достоверного снижения повышенного уровня ОХС, ЛПНП, ТГ и ЛП-а. Значимое снижение уровня ЛПОНП достигает границ нормативного интервала через 12 мес. Значимого изменения содержания антиатерогенной фракции, представленной ЛПВП и апоА-I на исходном и проспективном этапах, не выявлено. Согласно представленным в табл. 4 данным, проспективный анализ воспалительных маркёров у пациентов со СС выявил достоверное снижение повышенного уровня вч-СРБ, ФНОα и гомоцистеина с достижением нормативного интервала значений спустя 12 мес после ангиопластики со стентированием. Несмотря на достоверное снижение

Таблица 2

**Характеристика клинико-anamнестических показателей пациентов со стабильной стенокардией и постриваскуляризационным эпизодом нестабильной стенокардии (M ± SD)**

Показатель	Пациенты СС (n = 77)	Пациенты с эпизодом НС (n = 18)
Мужской пол	68,8% (n = 53)	83,3% (n = 15)
Однососудистый ЗКС	57,1% (n = 44)	61,1% (n = 11)
Многососудистый ЗКС (≥2 КА)	42,9% (n = 33)	38,9% (n = 7)
Стенокардия напряжения, ФК		
I	6,5% (n = 5)	5,6% (n = 1)
II	62,3% (n = 48)	72,2% (n = 13)
III	31,2% (n = 24)	22,2% (n = 4)
АГ, степень		
1	6,5% (n = 5)	11,1% (n = 2)
2	14,3% (n = 11)	16,7% (n = 3)
3	68,8% (n = 53)	44,4% (n = 8)
ХСН ФК (NYHA)		
I	5,2% (n = 4)	5,6% (n = 1)
II	79,2% (n = 61)	66,7% (n = 12)
III	15,6% (n = 12)	27,8% (n = 5)
Дислипидемия	94,8% (n = 73)	94,4% (n = 17)
Ожирение		
0	32,5% (n = 25)	16,7% (n = 3)
I	46,8% (n = 36)	50,0% (n = 9)
II	15,6% (n = 12)	22,2% (n = 4)
III	5,2% (n = 4)	11,1% (n = 2)
Возраст, годы	60,47 ± 9,54	57,17 ± 10,11

концентрации ММР-9 спустя 12 мес после ангиопластики, не отмечено достижения целевого уровня маркёра. В пределах нормативного диапазона выявлено статистически значимое снижение значений цитокинового каскада (ИЛ -1β, ИЛ-6, ИЛ-8, CD 40, sCD 40L) и повышение уровня TIMP-1. Динамика параметров эндотелиальной дисфункции проявилась сохранившимся повышенным уровнем эндотелина-1 и достоверным увеличением содержанием нитритов спустя 12 мес после ангиопластики. В ходе проспективного анализа воспалительных маркёров у пациентов в группе с постриваскуляризационным эпизодом НС выявлено повышенное содержание вч-СРБ, ФНОα и гомоцистеина спустя 3 мес и достоверное снижение значений вышеуказанных показателей до нормативного диапазона спустя 12 мес после ангиопластики со стентированием. Несмотря на достоверное сни-

Таблица 3

**Сравнительная характеристика параметров липидного спектра пациентов со стабильной стенокардией и с постриваскуляризационным эпизодом нестабильной стенокардии (M±SD)**

Показатель	Пациенты со СС (n = 77)		Пациенты с эпизодом НС (n = 18)	
	3 мес	12 мес	3 мес	12 мес
ОХС, ммоль/л	4,91 ± 0,88	4,64 ± 0,85*	4,71 ± 1,22	4,70 ± 1,15
ЛПВП, ммоль/л	1,13 ± 0,26	1,18 ± 0,28	1,03 ± 0,2	1,08 ± 0,21
ЛПНП, ммоль/л	2,82 ± 0,78	2,46 ± 0,81*	2,77 ± 1,02	2,62 ± 0,96
ЛПОНП, ммоль/л	0,69 ± 0,23	0,63 ± 0,25*	0,77 ± 0,19	0,55 ± 0,23*
ТГ, ммоль/л	1,87 ± 0,65	1,74 ± 0,45	1,95 ± 0,54	1,76 ± 0,5
Апо В, мг/дл	102,94 ± 27,72	94,23 ± 24,6*	95,52 ± 18,8	97,73 ± 22,9
Апо А-I, мг/дл	142,15 ± 30,32	151,47 ± 26,5*	135,67 ± 31,92	147,08 ± 16,9
Апо В/Апо А-I	0,74 ± 0,3	0,66 ± 0,32*	0,72 ± 0,2	0,65 ± 0,19
ЛП (а), мг/дл	35,33 ± 22,01	27,01 ± 10,61	25,58 ± 20,6	24,46 ± 17,55

Примечание. n - количество пациентов; достоверность различий в группе пациентов со стабильной стенокардией и эпизодом нестабильной стенокардии в точках 3 и 12 мес после ангиопластики со стентированием; \* - p < 0,05.

Таблица 4

**Сравнительная характеристика воспалительных маркёров и параметров дисфункции эндотелия пациентов со стабильной стенокардией и постстреваскуляризационным эпизодом нестабильной стенокардии (M ± SD)**

Показатель	Пациенты со СС (n = 77)		Пациенты с эпизодом НС (n = 18)	
	3 мес	12 мес	3 мес	12 мес
CD 40, нг/мл	104,42 ± 38,2	90,81 ± 28,42*	86,53 ± 21,9	77,98 ± 21,65
sCD40L, нг/мл	3,64 ± 0,83	3,24 ± 0,72	3,35 ± 0,72	2,99 ± 0,91
CD 40/sCD 40L	29,25 ± 8,76	29,15 ± 8,73	24,85 ± 7,06	26,53 ± 9,11
ТИМР-1, нг/мл	96,59 ± 19,98	106,44 ± 28,0*	97,88 ± 23,3	105,48 ± 23,5
ММР-9, нг/мл	115,68 ± 29,0	88,19 ± 31,12*	129,8 ± 16,6	85,72 ± 28,0*
ИЛ-1β, пг/мл	5,07 ± 1,77	4,47 ± 1,85*	4,43 ± 1,74	4,1 ± 1,2
ИЛ-6, пг/мл	3,89 ± 2,32	3,18 ± 1,50*	4,27 ± 2,95	3,40 ± 1,89
ИЛ-8, пг/мл	23,52 ± 20,48	17,92 ± 14,64*	19,65 ± 13,00	15,32 ± 9,45
ФНОα, пг/мл	11,26 ± 4,81	6,99 ± 3,19*	11,41 ± 4,69	7,02 ± 2,67*
вч-СРБ, мг/л	3,47 ± 0,81	2,78 ± 0,94*	3,40 ± 0,94	2,52 ± 0,93*
Гомоцистеин, мкмоль/л	17,94 ± 5,99	10,77 ± 5,44*	16,72 ± 4,95	10,42 ± 3,60*
Нитриты, нмоль/мл	2,59 ± 1,06	3,29 ± 0,98*	2,67 ± 1,12	3,07 ± 0,91
Эндотелин-1, фмоль/л	1,07 ± 0,50	1,05 ± 0,55	0,95 ± 0,51	1,05 ± 0,41

Примечание. n – количество пациентов; достоверность различий в группах пациентов со стабильной стенокардией и эпизодом нестабильной стенокардии в точках 3 и 12 мес после ангиопластики со стентированием: \* –  $p < 0,05$ .

жение уровня ММР-9, отмечена повышенная концентрация маркёра спустя 12 мес. Сохранилось постоянство гиперпродукции эндотелина-1 при параллельной тенденции к увеличению уровня нитритов к конечной точке наблюдения после ангиопластики со стентированием.

Характерными в ходе анализируемого срока наблюдения явились прямые корреляционные взаимосвязи пролонгированной активации маркёров сосудистого воспалительного ответа и эндотелиальной дисфункции с клинико-анамнестическими показателями. Так, в группе пациентов со СС уровень ЛПОНП и ЛП-а положительно взаимосвязаны с уровнем гомоцистеина ( $p = 0,02$ ,  $r = 0,3$ ;  $p = 0,01$ ,  $r = 0,4$  соответственно), уровень гомоцистеина с табакокурением и функциональным классом СН ( $p = 0,01$ ,  $r = 0,4$ ;  $p = 0,01$ ,  $r = 0,4$  соответственно), уровень вч-СРБ с функциональным классом СН и комплаентностью к терапии ( $p = 0,02$ ,  $r = 0,4$ ;  $p = 0,001$ ,  $r = 0,8$  соответственно), уровень ФНОα с функциональным классом СН ( $p = 0,03$ ,  $r = 0,4$ ), а уровень эндотелина-1 со степенью АГ ( $p = 0,02$ ,  $r = 0,4$ ).

В группе пациентов с постстреваскуляризационным эпизодом НС уровень ФНОα положительно взаимосвязан с индексом массы тела, ХСН ФК (NYHA), отягощённой наследственностью по ИБС ( $p = 0,02$ ,  $r = 0,4$ ;  $p = 0,02$ ,  $r = 0,4$ ;  $p = 0,01$ ,  $r = 0,8$  соответственно), уровень вч-СРБ с ХСН ФК (NYHA), многососудистым характером значимого поражения коронарного русла, числом ангинозных приступов ( $p = 0,01$ ,  $r = 0,3$ ;  $p = 0,03$ ,  $r = 0,4$ ;  $p = 0,03$ ,  $r = 0,4$  соответственно), уровень гомоцистеина с наличием СД 2-го типа ( $p = 0,03$ ,  $r = 0,4$ ), уровень эндотелина-1 с наличием ИМ в анамнезе ( $p = 0,01$ ,  $r = 0,6$ ).

Выявленные корреляционные взаимосвязи перекликаются с данными исследований, указывающих на тесную взаимосвязь клинических и лабораторных показателей. [11-14]

Согласно цели проводимой нами работы, для выявления основных предикторов, максимально определяющих развитие НС в постстреваскуляризационном периоде у пациентов со ЗКС после стентирования, был использован мультивариантный анализ – бинарная логистическая регрессии. В исходную совокупность переменных были включены: параметры липидного профиля и маркёры сосудистого воспаления. В предварительную модель вошли следующие признаки: ЛПНП, ТГ, ОХС и эндотелин-1. В результате анализа переменных были отобра-

ны самые существенные признаки и создана окончательная модель с тремя переменными – ЛПНП, ТГ и ОХС.

Технический результат был выражен формулой уравнения полученной линейной функции:

$$F = 0,927 + 2,000 \times \text{ЛПНП} + 1,355 \times \text{ТГ} - 2,288 \times \text{ОХС}.$$

Для возможности классификации всей совокупности на подгруппы, используя полученную линейную функцию, применено логит - преобразование с расчётом точки разделения:

$$P = 1/(1+e^{-F}),$$

где P – вероятность того, что произойдет интересующее событие – нестабильная стенокардия; e – математическая константа, равная 2,718; F – значение уравнения регрессии.

Показатель Exp (B) для коэффициентов логистической регрессии уточняет степень изменения относительного риска возникновения интересующего события для конкретной переменной B. Так, увеличение значения холестерина ЛПНП повышает вероятность возникновения интересующего события в 7,387 раза относительно базового риска (относительный риск исхода).

Специфичность данной модели составила 70,1%, чувствительность – 75%; в среднем классифицирован правильно 71,1% исходных сгруппированных наблюдений. Индикатором точности прогноза развития эпизода постстреваскуляризационной НС является площадь под кривой ROC, которая для нашей модели составила 0,715 ( $p < 0,001$ ), что соответствует хорошему качеству модели (см. рисунок).

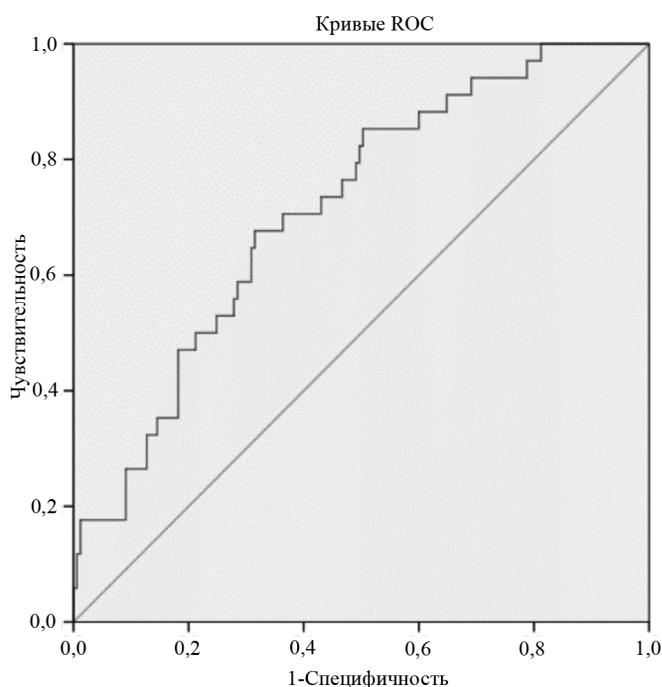
Таким образом, в общей группе пациентов с ЗКС увеличение значения холестерина ЛПНП на 1 ммоль/л повышает вероятность возникновения постстреваскуляризационной НС в 7,387 раза относительно базового риска (ОШ = 1,76; 95% ДИ 1,95 - 27,8353;  $p = 0,027$ ). Наши данные косвенно согласуются с данными В.Михайлова и соавт., которые показали, что снижение уровня холестерина ЛПНП на 1 ммоль/л уменьшает риск развития сердечно-сосудистых осложнений на 20% [16].

Надо отметить, что на основании клинико-анамнестических данных методом бинарной логистической регрессии установлено, что в общей группе пациентов с ИБС у мужчин риск возникновения ЗКС увеличивается в 2,8 раза (ОШ = 2,761; 95% ДИ: 1,41 - 5,39;  $p = 0,003$ ); при росте у мужчин уровня холестерина ЛПНП на 1 ммоль/л риск ЗКС увеличивается дополнительно в 1,8 раза (ОШ = 1,76; 95% ДИ 1,23 - 2,53;  $p = 0,002$ ).

Кроме того, этим же методом было установлено, что у пациентов с эпизодом НС на исходном этапе исследования вероятность развития нестабильности коронарного кровотока в постстреваскуляризационном периоде увеличивается в 4,1 раза (ОШ = 4,07; 95% ДИ 1,32 - 12,59;  $p = 0,02$ ).

Все случаи повторных эпизодов НС ( $n = 13$ ) в группе с исходной НС зарегистрированы при гипергомоцистеинемии ( $>15$  мкмоль/л), выявленной на начальном этапе исследования, при среднем значении гомоцистеина, равном 16,52 мкмоль/л, или на 10,1% превышающем верхнюю границу нормативного интервала.

Гипергомоцистеинемия коррелировала одновременно с повторным эпизодом НС ( $p = 0,04$  и  $r = 0,4$ ) и гиперпродукцией вч-СРБ ( $p = 0,02$  и  $r = 0,5$ ), что свидетельствует о порочном круге взаимодействия между локальным воспалением в атеросклеротической бляшке, повторным неблагоприятным



#### ROC-кривая.

Площадь под ROC-кривой составляет 0,715 ( $p < 0,001$ ).

По оси абсцисс - чувствительность модели (в %); по оси ординат - специфичность модели (в %)

коронарным событием и активацией системного воспалительного ответа, согласуясь с данными литературы [9–11].

Таким образом, систематизация имеющихся данных лабораторного исследования крови может позволить уже на исходном этапе обследования, при поступлении пациентов в стационар, до проведения ангиопластики со стентированием, при различном клиническом варианте течения ИБС выделить совокупность биохимических маркеров, по которым можно достоверно прогнозировать наличие значимого коронарного стеноза и развитие нежелательных событий в постреваскуляризационном периоде – это мужской пол, повышенный уровень холестерина ЛПНП и гипергомоцистеинемия.

**Обсуждение.** С практической точки зрения врачу-клиницисту, работающему с пациентами, важно знать, какие сроки после перенесённого чрескожного вмешательства являются максимально опасными для развития нежелательных коронарных осложнений. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что практически весь послеоперационный год может быть опасным в плане развития осложнений. Так, зарегистрированный максимально повышенный уровень атерогенных липидных параметров и маркеров сосудистого воспаления вч-СРБ, ФНО $\alpha$ , гомоцистеина, эндотелина -1 и ММР-9 к точке наблюдения «3 мес» после ангиопластики может стать провоцирующим фактором для развития ранних нежелательных коронарных явлений, таких как ранний рестеноз, а отсутствие достижения целевых уровней изучаемых параметров к конечному этапу наблюдения (эндотелин-1, нитриты, ММР-9) может свидетельствовать о сохранении у пациентов с ИБС вялотекущего сосудистого воспалительного ответа с реальной возможностью развития поздних атеротромботических осложнений. Осуществление в условиях реальной клинической практики оптимальной программы по повышению приверженности пациентов к терапии, в частности статинами и антиагрегантами, обеспечивающими поддержание целевого уровня холестерина ЛПНП и снижающими риск атеротромбо-

за, на фоне проведения динамического наблюдения за лабораторными маркерами – это два основных направления, которые позволят максимально обезопасить послеоперационный период в плане развития нежелательных коронарных событий.

**Заключение.** Выявлена совокупность биохимических маркеров для прогнозирования наличия значимого коронарного стеноза и развития нежелательных сосудистых коронарных событий после ангиопластики со стентированием у больных ИБС - это мужской пол, повышенный уровень холестерина ЛПНП и гипергомоцистеинемия. Однако, несмотря на большое количество уже имеющихся данных, полученных при изучении развития сосудистых коронарных осложнений после ангиопластики со стентированием, остаётся актуальным поиск новых маркеров и взаимосвязей с целью выявления других патогенетических механизмов, позволяющих существенно повлиять на решение данной проблемы.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 2,8-14 см. REFERENCES)

1. Карпов Ю.А., Самко А.Н., Буза В.В. Коронарная ангиопластика и стентирование М.: Медицинское информационное агентство; 2010.
3. Зыков К.А., Нуралиев Э.Ю., Казначеева Е.И., Кузнецова Т.В., Яровая Е.Б., Масенко В.П., Кухарчук В.В. Динамика воспалительного процесса у больных с острым коронарным синдромом и стабильной стенокардией. *Кардиологический вестник*. 2011;1: 23-33.
4. Гусев Д.Е., Потиевский Б.Г., Райчевич Н., Сыркин А.Л. Маркеры воспаления при различных формах ишемической болезни сердца. *Кардиология*. 2012;4: 4-8.
5. Голухова Е.З., Кузнецова Е.В. Реваскуляризация миокарда у больных ИБС в сочетании с сахарным диабетом 2 типа: обзор современных технологий. *Сахарный диабет*. 2016;19(5): 406-13.
6. Голухова Е.З., Григорян М.В., Рябинина М.Н., Булаева Н.И. Клинические и лабораторные предикторы неблагоприятных кардиальных событий у больных ишемической болезнью сердца после планового чрескожного коронарного вмешательства. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2016; 5:528-35.
7. Томилова Д.И., Карпов Ю.А., Лопухова В.В. Клинические исходы пациентов со стабильной стенокардией после планового чрескожного вмешательства с имплантацией стента с лекарственным покрытием. *Российский кардиологический журнал*. 2017;(8):7-12.
15. Габбасов З.А., Козлов С.Г., Сабурова О.С., Титов В.Н., Лякишев А.А. Стромальные клетки-предшественники и лейкоциты крови после имплантации стентов с лекарственным покрытием. *Кардиология*. 2010;1: 36-41.

#### REFERENCES

1. Karpov Yu.A., Samko A.N., Buza V.V. *Coronary angioplasty and stenting [Koronarnaya angioplastika i stentirovanie]*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2010.
2. Kang W.C., Ahn T.H., Moon C.I., Han S.H., Shin E.K., Kim J.S., Ko Y.G., Choi D., Jang Y., Kim B.K., Oh S.J., Jeon D.W., Yang J.Y. Comparison of inflammatory markers and angiographic outcomes after implantation of sirolimus and paclitaxel-eluting stents. *Heart*. 2009;95:970 -5.
3. Zykov K.A., Nuraly E.Y., Kaznacheeva E.I., Kuznetsova T.V., Spring E.B., Masenko V.P. Dynamics of the inflammatory process in patients with acute coronary syndrome and stable angina. *Kardiologicheskij vestnik*. 2011;1: 23-33. (in Russian)
4. Gusev D.E., Potievsky B.G., Raychevin N., Sirkin A.L. Markers of inflammation in various forms of coronary heart disease. *Kardiologiya*. 2012;4: 4-8. (in Russian)
5. Golukhova E.Z., Kuznetsova E.V. Myocardial revascularization in patients with coronary heart disease combined with type 2 diabetes

- mellitus: a review of modern technologies. *Sakharnyi diabet.* 2016;19(5):406-13. (in Russian)
- Golukhova E.Z., Grigoryan M.V., Ryabinina M.N., Bulaeva N.I. Clinical and laboratory predictors of adverse cardiac events in patients with coronary heart disease after planned percutaneous coronary intervention. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii.* 2016; 5; 528-35. (in Russian)
  - Tomilova D.I., Karpov YA., Lopukhova V.V. Clinical outcomes of percutaneous coronary intervention with drug eluting stent in stable angina patients. *Rossiyskiy zhurnal kardiologii.* 2017;(8):7-12. (in Russian)
  - Petelina T., Musikhina N., Gapon L., Kuznetsov V., Gorbatenko E., Emeneva I. Specific parameters of lipid spectrum and markers of vascular inflammation in patients with stable angina and significant coronary artery stenosis with or without diabetes mellitus type 2. A prospective follow-up after angioplasty. *Integrative Obesity and Diabetes.* 2017;3(2): 1-8.
  - Bibek S., Xie Y., Gao J., Wang Z., Wang J., Geng D. Role of Pre-procedural C-reactive Protein Level in the Prediction of Major Adverse Cardiac Events in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention: a Meta-analysis of Longitudinal Studies. *Inflammation.* 2015;38(1):159-69.
  - Ndrepepa G., Braun S., Tada T., Guerra E., Schunkert H., Laugwitz K-L. et al. Comparative prognostic value of low-density lipoprotein cholesterol and C-reactive protein in patients with stable coronary artery disease treated with percutaneous coronary intervention and chronic statin therapy. *Cardiovasc. Revasc. Med.* 2014; 15:131-136.
  - Moon A., Choi D., Jahng S. High-sensitivity C-reactive protein and mean platelet volume as predictive values after percutaneous coronary intervention for long-term clinical outcomes: a comparable and additive study. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2016; 27: 70-6.
  - Getz G.S., Reardon C.A. Myeloperoxidase-mediated dysfunctional high-density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014;34(4):695-6.
  - Cassese S., Byrne S., Tada T. et al. Incidence and predictors of restenosis after coronary stenting in 10 004 patients with surveillance angiography. *Heart.* 2014;100:153-9.
  - Chen J., Chen Y., Tian F., et al. Predictors of in-stent restenosis in coronary heart disease patients complicating with diabetes mellitus within 2 years after drug-eluting stents implantation. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 2014; 42: 14-8.
  - Gabbasov Z.A., Kozlov S.G., Saburova O.S., Titov V.N., Lyakishev A.A. Stromal progenitor cells and blood leukocytes after implantation of drug-eluting stents. *Kardiologiya.* 2010; (1) :36-41. (in Russian)
  - Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, Mihaylova B., Emberson J., Blackwell L., Keech A., Simes J., Barnes E., Voysey M., Gray A., Collins R., Baigent C. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet.* 2012;380:581-90.

Поступила 09.04.18  
Принята к печати 18.04.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.313.1+612.111.1].083

Бельская Л.В.<sup>1,2</sup>, Сарф Е.А.<sup>2</sup>, Косенок В.К.<sup>2,3</sup>

## КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ ВЗАИМОСВЯЗИ СОСТАВА СЛЮНЫ И ПЛАЗМЫ КРОВИ В НОРМЕ

<sup>1</sup> Омский государственный педагогический университет, 644043, Омск;

<sup>2</sup> ООО «ХимСервис», 143026, Москва;

<sup>3</sup> Омский государственный медицинский университет, 644099, Омск, Россия

В последнее время возросло внимание исследователей к изучению свойств слюны человека как материала с уникальными свойствами и диагностическими возможностями. Цель исследования – изучение взаимосвязи биохимического состава слюны и плазмы крови в норме. В исследовании приняли участие 107 добровольцев, в том числе 46 женщин (возраст  $37,2 \pm 3,9$  года) и 61 мужчина (возраст  $36,1 \pm 2,8$  года). Во всех образцах слюны и плазмы крови определяли 23 биохимических параметра, включая минеральный и белковый состав, активность ферментов, а также показатели эндогенной интоксикации и перекисного окисления липидов. Для обработки полученных данных применены непараметрические методы статистики. Показано, что однозначную взаимосвязь между биохимическими параметрами слюны и плазмы крови установить сложно. Расчёт коэффициентов корреляции по Спирмену показал, что только у 7 из 23 параметров отмечается слабая корреляция между содержанием в слюне и плазме. В целом определение состава слюны может иметь самостоятельное диагностическое значение, в этом случае проведение параллели с составом сыворотки и плазмы крови нецелесообразно. Тем не менее применение слюны в клинической лабораторной диагностике сопряжено с необходимостью установления критериев нормы и патологии для каждого биохимического параметра.

Ключевые слова: слюна; плазма крови; биохимический состав; корреляции.

**Для цитирования:** Бельская Л.В., Сарф Е.А., Косенок В.К. Корреляционные взаимосвязи состава слюны и плазмы крови в норме. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2018;63 (8): 477-482. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-477-482>

Bel'skaya L.V.<sup>1,2</sup>, Sarf E.A.<sup>2</sup>, Kosenok V.K.<sup>2,3</sup>

CORRELATION INTERRELATIONS BETWEEN THE COMPOSITION OF SALIVA AND BLOOD PLASMA IN NORM

<sup>1</sup> Omsk State Pedagogical University, Omsk, 644043, Russian Federation;

<sup>2</sup> LLC "ChemService", Moscow, 143026, Russian Federation;

<sup>3</sup> Omsk State Medical University, Omsk, 644099, Russian Federation

Recently, the attention of researchers to the study of the properties of human saliva as a material with unique properties and diagnostic capabilities has increased. The purpose of the study: the study of the relationship between the biochemical composition of saliva and blood plasma is normal. 107 volunteers participated in the study, including 46 women (age  $37.2 \pm 3.9$  years) and 61 men (age  $36.1 \pm 2.8$  years). In all samples of saliva and blood plasma, 23 biochemical parameters were determined,

Для корреспонденции: Бельская Людмила Владимировна, канд. хим. наук, доц.; e-mail: [ludab2005@mail.ru](mailto:ludab2005@mail.ru)

including mineral and protein composition, enzyme activity, as well as indices of endogenous intoxication and lipid peroxidation. Nonparametric statistical methods are used to process the data obtained. It is shown that it is difficult to establish a unique relationship between the biochemical parameters of saliva and blood plasma. The calculation of the Spearman correlation coefficients has shown that only 7 of the 23 parameters demonstrate a weak correlation between the content in saliva and plasma. In general, the definition of saliva can have an independent diagnostic value, in this case, the parallel with the composition of serum and plasma is not appropriate. Nevertheless, the use of saliva in clinical laboratory diagnostics is associated with the need to establish criteria for the norm and pathology for each biochemical parameter.

**Key words:** saliva; blood plasma; biochemical composition; correlations.

**For citation:** Bel'skaya L.V., Sarf E.A., Kosenok V.K. Correlation interrelations between the composition of saliva and blood plasma in norm. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63(8): 477-482 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-477-482>

**For correspondence:** Bel'skaya L.V., PhD in Chemistry, Associate Professor; e-mail: ludab2005@mail.ru

**Information about authors:**

Bel'skaya L.V., <http://orcid.org/0000-0002-6147-4854>

Sarf E.A., <http://orcid.org/0000-0003-4918-6937>

Kosenok V.K., <http://orcid.org/0000-0002-2072-2460>

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

Received 23.03.2018  
Accepted 03.04.2018

В последнее время возросло внимание исследователей к изучению свойств слюны человека как материала с уникальными свойствами и диагностическими возможностями. Исследование слюны относится к неинвазивным методам и проводится для оценки возрастного и физиологического статуса, выявления соматических заболеваний, патологии слюнных желёз и тканей полости рта, генетических маркёров, мониторинга лекарственных средств и др. [1–4].

Слюна содержит множество биологических молекул, в том числе ДНК, матричную РНК (мРНК), микроРНК, белок, метаболиты и микробиоту. Изменение их концентрации в слюне может быть использовано для выявления системных заболеваний и заболеваний полости рта на ранних стадиях, а также для оценки прогноза течения заболеваний и контроля ответа на лечение [5]. В 2008 г. предложен термин «саливаомика», который объединяет знания о различных компонентах в слюне, включая геном, эпигеном, транскриптом, протеом, метаболом и микробиом [6, 7].

Слюна является ультрафильтратом плазмы крови и содержит белки, которые синтезируются в слюнных железах или попадают в неё из крови. На сегодняшний день исследователи выявили 2340 белков в протеоме слюны, из которых 20–30% также обнаружены в крови [8], что является обнадеживающим показателем клинической полезности слюны. В отличие от плазмы крови, протеом которой на 99% от общего содержания белка формируется за счёт 22 основных белков, в слюне 20 основных белков составляют лишь 40% от общего содержания белка [9]. Вследствие этого обнаруживать биомолекулы с высокой чувствительностью и специфичностью в слюне практически проще, чем в крови. Слюна также может быть использована для обнаружения веществ, поступающих из крови, например стероидных гормонов [10].

Тем не менее вопрос о взаимосвязи биохимического состава слюны и крови остаётся не до конца изученным [11–14], а наличие корреляции между содержанием отдельных компонентов недоказанным [15–17]. В связи с этим актуальным, на наш взгляд, является сопоставление биохимического состава слюны и плазмы крови для установления наличия/отсутствия взаимосвязи между составом данных биологических жидкостей в норме.

Цель исследования – изучение взаимосвязи биохимического состава слюны и плазмы крови в норме.

**Материал и методы.** В исследовании приняли участие 107 добровольцев, в том числе 46 женщин (возраст  $37,2 \pm 3,9$  года) и 61 мужчина (возраст  $36,1 \pm 2,8$  года). Забор кро-

ви и слюны проведён на станции переливания крови БУЗОО «Клинический онкологический диспансер».

Во всех образцах слюны и плазмы крови определяли 23 биохимических параметра, включая минеральный и белковый

Таблица 1

**Описательная статистика биохимического состава слюны и плазмы крови**

Показатель	Слюна		Плазма крови	
	n	min–max	n	min–max
pH	107	4,93–7,25	107	6,54–7,99
Кальций, ммоль/л	104	0,28–3,02	106	0,70–6,74
Фосфор, ммоль/л	105	0,60–6,92	107	0,54–4,55
Хлориды, ммоль/л	104	4,04–41,48	105	58,85–92,35
Магний, ммоль/л	103	0,034–0,621	105	0,358–1,230
Белок, г/л	107	0,04–1,41	107	25,00–102,50
Альбумин, ммоль/л	102	0,038–1,624	106	28,36–52,59
Мочевина, ммоль/л	107	1,10–17,27	107	1,84–9,30
Мочевая кислота, мкмоль/л	102	4,59–451,83	107	110,09–392,86
NO, мкмоль/л	106	11,93–230,35	107	15,09–165,79
Диазосоединения, мкмоль/л	106	0,023–1,214	107	0,167–0,910
Сиаловые кислоты, ммоль/л	107	0,031–0,513	107	0,90–7,84
АЛТ, Е/л	107	0,85–14,54	107	2,69–16,62
АСТ, Е/л	107	0,67–19,33	107	3,17–17,08
АСТ/АЛТ	107	0,31–3,20	107	0,52–3,43
ЩФ, Е/л	107	15,21–517,17	107	117,34–727,96
ЛДГ, Е/л	102	193,6–2849,0	99	334,0–1154,4
ГГТ, Е/л	102	13,8–30,6	101	16,0–124,3
Каталаза, мкат/л	107	1,64–8,96	107	13,5–72,3
МСМ 254 нм, усл. ед.	107	0,040–0,635	107	0,009–0,408
МСМ 280 нм, усл. ед.	107	0,039–0,545	107	0,048–0,460
Диеновые конъюгаты, усл. ед.	107	3,29–4,22	107	3,39–4,28
Триеновые конъюгаты, усл. ед.	107	0,650–1,354	107	0,696–1,510
Основания Шиффа, усл. ед.	107	0,397–0,729	107	0,391–1,195

Таблица 2

**Коэффициенты корреляции между показателями плазмы крови и слюны**

Показатель	Слюна Me [LQ; UQ]	Плазма крови Me[LQ; UQ]	Коэффициент корреляции
pH	6,50 [6,32; 6,68]	7,60 [7,50; 7,80]	0,3015*
Кальций, ммоль/л	1,19 [0,88; 1,51]	2,39 [2,08; 2,67]	0,3213*
Фосфор, ммоль/л	2,96 [2,39; 3,61]	1,15 [0,95; 1,58]	0,0990
Хлориды, ммоль/л	20,73 [15,70; 24,42]	70,77 [65,26; 76,29]	0,0741
Магний, ммоль/л	0,254 [0,192; 0,338]	0,824 [0,730; 0,902]	-0,2481*
Белок, г/л	0,47 [0,35; 0,65]	60,00 [52,50; 67,50]	0,0456
Альбумин, ммоль/л	0,259 [0,169; 0,394]	40,69 [37,89; 44,38]	-0,1086
Мочевина, ммоль/л	8,28 [5,48; 10,35]	4,09 [3,17; 4,75]	0,1977*
Мочевая кислота, мкмоль/л	59,58 [32,11; 107,14]	261,90 [216,67; 307,14]	0,2315*
NO, мкмоль/л	65,88 [56,49; 78,07]	39,65 [31,40; 57,02]	0,0977
Диазосоединения, мкмоль/л	0,281 [0,212; 0,379]	0,341 [0,266; 0,417]	-0,0660
Сиаловые кислоты, ммоль/л	0,122 [0,098; 0,171]	3,15 [2,54; 3,72]	-0,1570
АЛТ, Е/л	3,38 [2,23; 4,38]	8,15 [6,92; 10,00]	0,4077*
АСТ, Е/л	3,92 [2,83; 5,67]	8,08 [6,83; 9,50]	0,1193
АСТ/АЛТ	1,30 [0,96; 1,59]	0,94 [0,81; 1,19]	0,0898
ЩФ, Е/л	69,54 [47,81; 99,96]	323,78 [271,63; 386,79]	0,0002
ЛДГ, Е/л	1281,5 [905,6; 1911,0]	690,5 [596,6; 762,6]	0,3521*
ГГТ, Е/л	19,6 [17,5; 22,3]	32,3 [27,1; 38,2]	0,1032
Каталаза, мкат/л	3,65 [2,84; 4,85]	22,9 [17,3; 39,2]	0,0641
МСМ 254 нм, усл. ед.	0,197 [0,140; 0,281]	0,085 [0,042; 0,110]	-0,0648
МСМ 280 нм, усл. ед.	0,167 [0,116; 0,224]	0,125 [0,103; 0,162]	-0,0123
Диеновые конъюгаты, усл. ед.	3,87 [3,74; 3,96]	3,86 [3,74; 3,97]	0,1035
Триеновые конъюгаты, усл. ед.	0,846 [0,806; 0,893]	0,889 [0,806; 0,984]	0,1106
Основания Шиффа, усл. ед.	0,523 [0,494; 0,560]	0,563 [0,511; 0,612]	0,0412

Примечание. \* – коэффициент корреляции статистически достоверен ( $p < 0,05$ ).

состав, активность ферментов, а также показатели эндогенной интоксикации и перекисного окисления липидов. Содержание общего кальция (в ммоль/л) определяли фотометрически на полуавтоматическом биохимическом анализаторе StatFax 3300 по реакции с Арсеназо III, магния – по реакции с ксилитидоловым синим, фосфора – по реакции с молибденовокислым аммонием, хлоридов – по реакции с роданидом ртути с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) [18]. Концентрацию мочевины (в ммоль/л) определяли фотометрически уреазно-салицилатным методом по Бертлоту, общего белка (в г/л) – по реакции с пирогаллоловым красным [19], альбумина (в ммоль/л) – по реакции с бромкрезоловым зеленым, диазосоединений (мкмоль/л) – по реакции диазотирования в присутствии сульфаниловой кислоты [20], сиаловых кислот (в ммоль/л) – по методу Гесса [21]. Концентрацию мочевой кислоты (в мкмоль/л) определяли уриказным методом, интенсивность синтеза оксида азота оценивали по содержанию стабильных продуктов его окисления – нитрат-ионов (в мкмоль/л) методом капиллярного электрофореза (КАПЕЛЬ-105М, Люмэкс) [22]. Активность АЛТ и АСТ определяли колориметрическим динитрофенилгидразиновым методом по Райтману–Френкелю, ЩФ – методом конечной точки по Бессею–Лоури–Броку, ЛДГ – кинетическим УФ-методом по скорости окисления НАДН, ГГТ – кинетическим методом с использованием L-гамма-глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида в качестве субстрата по Зейцу–Персину [18], каталазы (в мкат/л) по Короллоку и соавт. [23]. Дополнительно оценивали значение коэффициента де Ритиса, рассчитанного как соотношение активности АСТ/АЛТ (в усл.ед.). Содержание субстратов для процессов липопероксидации (диеновых конъюгатов, триеновых конъюгатов и оснований Шиффа) определяли спектрофотометрически

по методу И.А. Волчегорского [24]. Уровень МСМ определяли методом УФ-спектрофотометрии при длинах волн 254 и 280 нм [25]. Результаты выражали в единицах, количественно равных показателям экстинкции. Дополнительно оценивали значение коэффициента распределения (МСМ 280/254 нм) как отношение экстинкций при длинах волн 280 и 254 нм соответственно.

Исследования одобрены на заседании комитета по этике БУЗ Омской области «Клинический онкологический диспансер» от 21 июля 2016 г., протокол № 15.

Статистический анализ выполнен при помощи программ Statistica 10.0 (StatSoft, США) и пакета R (версия 3.2.3) непараметрическим методом с использованием U-критерия Манна–Уитни. Описание выборки производили путём подсчёта медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го процентилей [LQ; UQ]. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Многомерный статистический анализ проведён с помощью дискриминантного метода, в основе которого лежит построение дискриминирующих (канонических) функций, позволяющих провести наилучшую дискриминацию (разделение) между всеми группами. Характер дискриминации оценивают по диаграммам рассеяния канонических значений, на которых по осям отложены значения соответствующих дискриминантных функций (основание 1 и 2), при этом чем больше расстояние между центрами групп на диаграмме, тем больше различий между группами.

*Результаты и обсуждение.* На первом этапе проведена проверка характера распределения и гомогенности дисперсий в группах. Согласно тесту Шапиро–Уилка содержание

по методу И.А. Волчегорского [24]. Уровень МСМ определяли методом УФ-спектрофотометрии при длинах волн 254 и 280 нм [25]. Результаты выражали в единицах, количественно равных показателям экстинкции. Дополнительно оценивали значение коэффициента распределения (МСМ 280/254 нм) как отношение экстинкций при длинах волн 280 и 254 нм соответственно.

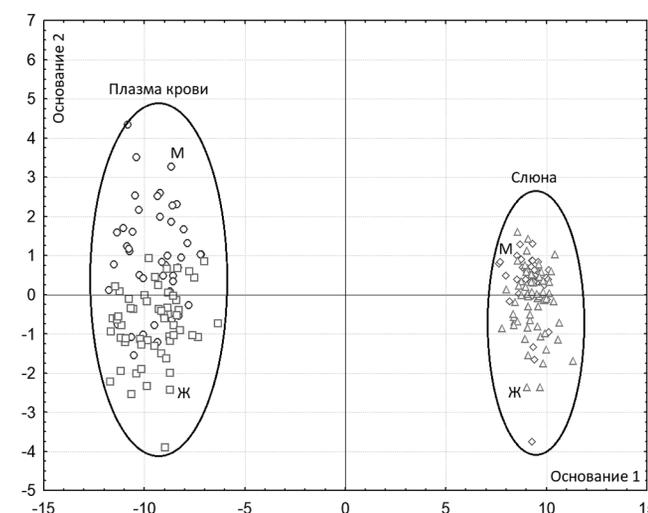


Рис.1. Результаты дискриминантного анализа состава плазмы крови и слюны.

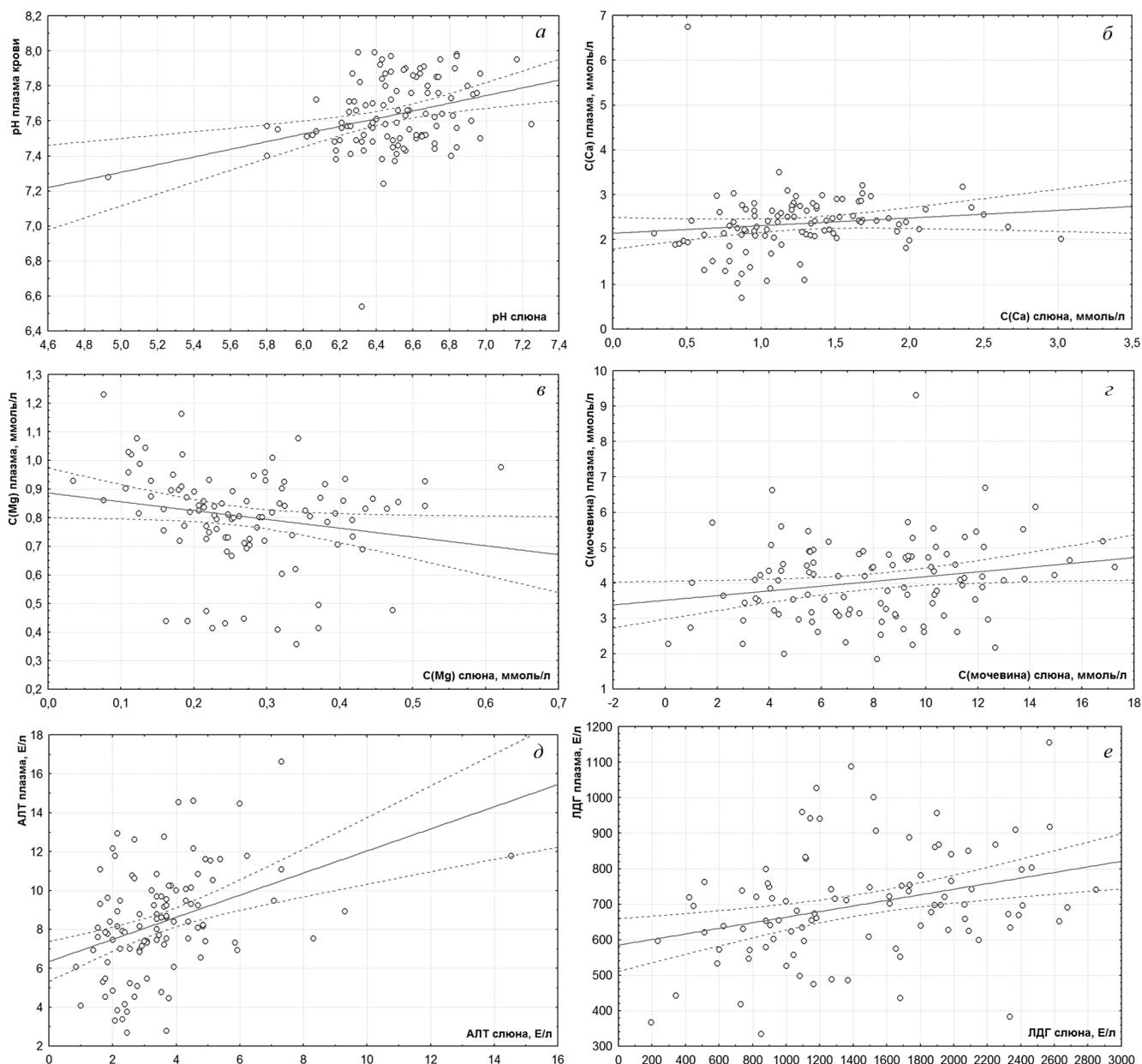


Рис.2. Корреляции между составом плазмы крови и слюны.

а – pH; б – кальций; в – магний; г – мочевины; д – аланинаминотрансфераза; е – лактатдегидрогеназа.

всех определяемых параметров не соответствует нормальному распределению ( $p < 0.05$ ). Проведённый тест на гомогенность дисперсий в группах (тест Барлетта) позволил отклонить гипотезу, что дисперсии гомогенны по группам ( $p = 0,00017$ ). Поэтому для обработки полученных данных были применены непараметрические методы статистики.

Минимальные и максимальные значения определяемых параметров приведены в табл.1. Показано, что для большинства параметров диапазоны определяемых концентраций перекрываются, исключение составляют общий белок, альбумин и сиаловые кислоты, для которых содержание в плазме крови на порядок выше, чем в слюне.

Результаты дискриминантного анализа показали, что по совокупности определяемых параметров плазма крови и слюны полностью различаются (рис. 1). Дополнительные расчёты показали, что по каждому параметру наблюдаются статистически достоверные различия ( $p < 0,0001$ ) за исклю-

чением диеновых конъюгатов, для которых статистически достоверные различия между плазмой крови и слюной не выявлены ( $p = 0,9639$ ).

Сопоставление медиан и интерквартильного размаха для каждого параметра приведено в табл. 2.

Расчёт коэффициентов корреляции по Спирмену показал, что только у семи из 23 параметров отмечается слабая корреляция между содержанием в слюне и плазме (табл. 2). При этом все выявленные корреляционные взаимосвязи положительные, кроме концентрации магния (рис. 2).

По результатам проведённого исследования сложно установить однозначную взаимосвязь между биохимическими параметрами, включая минеральный и белковый состав, активность ферментов, а также показатели эндогенной интоксикации и перекисного окисления липидов, слюны и плазмы крови.

Несмотря на это многочисленные исследования наглядно

показывают, что определение перечисленных параметров информативно при использовании слюны в качестве субстрата. В частности, важными показателями являются кислотность среды [26, 27] и минеральный состав [28]. Известно, что определение концентрации неорганических ионов является важным с медицинской точки зрения [29, 30]. Так, обмену неорганических ионов принадлежит существенная роль в таких жизненно важных процессах, как сердечная деятельность, кислотно-основное равновесие, регуляция внутриклеточного гомеостаза [31]. Показана важная роль уровня кальция и неорганического фосфора в поддержании равновесия процессов минерализации и деминерализации в полости рта [32, 33].

Для изучения оксидативного стресса наравне с кровью можно использовать слюну, поскольку она содержит антиокислительные ферменты (каталазу, супероксиддисмутазу, глутатионпероксидазу), витамины-антиоксиданты (А, Е, С), в слюну поступают из крови продукты перекисного окисления липидов (диеновые и триеновые конъюгаты, основания Шиффа) [34–37]. Важную информацию может дать определение в слюне уровня оксида азота [38, 39], а также концентрации мочевой кислоты, которая относится к антиоксидантной системе организма [40].

Известно, что концентрация большинства электролитов и микроэлементов в слюне сопоставима с их концентрацией в сыворотке и плазме крови [41]. Однако многие органические компоненты содержатся в слюне в гораздо меньших концентрациях, чем в плазме крови, в частности концентрация альбумина в слюне составляет лишь 0,1–1% его концентрации в плазме. Выявлены расхождения с данными литературы, согласно которым активность щелочной фосфатазы и АЛТ в слюне почти в 2 раза ниже, чем в крови, тогда как активность АСТ практически одинакова [41]. По нашим данным, активность щелочной фосфатазы в слюне в 4–5 раз ниже, чем в плазме, тогда как активность АЛТ и АСТ в слюне уменьшается пропорционально примерно в 2–2,5 раза (см. табл. 1, 2). Интересным является практически полное совпадение показателей липидной пероксидации в крови и слюне, что ранее не было освещено в литературе.

Таким образом, слюна является клинически информативной биологической жидкостью, но необходимо дальнейшее изучение и проверка биомаркеров слюны для внедрения в клиническую лабораторную диагностику [1–8, 42–44].

**Заключение.** Определение состава слюны может иметь самостоятельное диагностическое значение, в этом случае проведение параллели с составом сыворотки и плазмы крови не всегда необходимо. Тем не менее применение слюны в клинической лабораторной диагностике сопряжено с необходимостью установления критериев нормы и патологии для каждого биохимического параметра. Перспективным направлением исследований, на наш взгляд, является увеличение перечня биомаркеров, определяемых в слюне, а также проверка чувствительности и точности их обнаружения, повышение чувствительности и воспроизводимости анализов и оценка экономической эффективности их внедрения в рутинную клиническую диагностику.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-17,26,27,29-33,37-40,42-44 см. REFERENCES)

1. Кочурова Е.В. Диагностические возможности слюны. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 1: 13–6.
2. Хаустова С.А., Шкурников М.Ю., Гребенюк Е.С., Артюшенко В.Г., Тоневичский А.Г. Определение биохимических показателей слюны с помощью Фурье-спектроскопии средней инфракрасной

- области. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009; 148(11): 597–600.
18. Клиническая биохимия. Сборник инструкций. Новосибирск: ЗАО «Вектор-Бест»; 2011.
19. Островский О.В., Храмов В.А., Попова Т.А. Биохимия полости рта. Волгоград: Изд-во ВолГМУ; 2010.
20. Храмов В.А., Пригода Е.В. Уровень аминокислот и имидазольных соединений в ротовой жидкости человека. *Стоматология*. 2002; 6: 10–1.
21. Романенко Е.Г., Руденко А.И. Методика определения силовой кислоты в слюне. *Мир биологии и медицины*. 2013; 1: 139–42.
22. Бельская Л.В. Применение капиллярного электрофореза для определения минерального состава слюны человека. *Бюллетень науки и практики*. 2017; 2(15): 132–40.
23. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988; 1: 16–9.
24. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г. Сопоставление различных подходов к определению продуктов в гептан-изопрופןольных экстрактах крови. *Вопросы медицинской химии*. 1989; 1: 127–31.
25. Гаврилов В.Б., Бидула М.М., Фурманчук Д.А., Конев С.В., Алейникова О.В. Оценка интоксикации организма по нарушению баланса между накоплением и связыванием токсинов в плазме. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1999; 2: 13–7.
28. Каминская Л.А. Перспективы изучения биохимических показателей ротовой жидкости в лабораторной диагностике. *Российская стоматология*. 2010; 3: 36–42.
34. Борисенков М.Ф., Ерунова Л.А., Люсева Е.М., Поздеева Н.В. Суточная динамика общей антиоксидантной активности слюны человека. *Физиология человека*. 2007; 33 (3): 137–138.
35. Волчегорский И.А., Корнилова Н.В., Бутюгин И.А. Сравнительный анализ состояния системы «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» в слюне больных хроническим пародонтитом легкой и средней тяжести. *Стоматология*. 2010; 6: 24–28.
36. Камиллов Р.Ф., Ханов Т.В., Яппаров Р.Н., Шакиров Д.Ф. Хемилюминесценция как метод оценки общей антиоксидантной активности крови, слюны, слезной жидкости и мочи. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009; 2: 21–2, 35–6.
41. Носков В.Б. Слюна в клинической лабораторной диагностике (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 6: 14–7.

## REFERENCES

1. Kochurova Ye.V. Diagnosis of saliva. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 1: 13–6. (in Russian)
2. Khaustova S.A., Shkurnikov M.Yu., Grebenyuk Ye.S., Artyushenko V.G., Tonevitskiy A.G. Determination of biochemical parameters of saliva with the help of Fourier infrared spectroscopy. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2009; 148(11): 597–600. (in Russian)
3. Pereira Lima D., Garcia Diniz D., Adas S., Moimaz S. Saliva: Reflection of the body. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010; 14: 184–8.
4. Chiappin S., Antonelli G., Gatti R., De Palo E.F. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*. 2007; 383: 30–40.
5. Spielmann N., Wong D.T. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Diseases*. 2011; 17: 345–54.
6. Zhang Y., Sun J., Lin C., Abemayor E., Wang M.B., Wong D.T. The Emerging Landscape of Salivary Diagnostics. *OHD*. 2014; 13 (2): 200–10.
7. Wong D.T. Salivaomics. *Journal of the American Dental Association*. 2012; 143: 19S–24S.
8. Bandhakavi S., Stone M.D., Onsongo G., Van Riper S.K., Griffin T.J. A dynamic range compression and three-dimensional peptide fractionation analysis platform expands proteome coverage and the diagnostic potential of whole saliva. *J. Proteome Res.* 2009; 8: 5590–600.
9. Loo J.A., Yan W., Ramachandran P., Wong D.T. Comparative human salivary and plasma proteomes. *J. Dent. Res.* 2010; 89: 1016–23.

10. Goswami Y., Mishra R., Agrawal A.P., Agrawal L.A. Salivary Biomarkers-A Review of Powerful Diagnostic tool. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*. 2015; 14 (3): 80-7.
11. Ialongo C. Preanalytic of total antioxidant capacity assays performed in serum, plasma, urine and saliva. *Clinical Biochemistry*. 2017; 50(6): 356-63.
12. Riis J.L., Bryce C.I., Ha T., Hand T., Stebbins J.L., Matin M., Jaedicke K.M., Granger D.A. Adiponectin: Serum-Saliva Associations and Relations with Oral and Systemic Markers of Inflammation. *Peptides*. 2017; 91: 58-64.
13. Byrne M.L., O'Brien-Simpson N.M., Reynolds E.C., Walsh K.A., Laughton K., Waloszek J.M., Woods M.J., Trinder J., Allen N.B. Acute phase protein and cytokine levels in serum and saliva: A comparison of detectable levels and correlations in a depressed and healthy adolescent sample. *Brain, Behavior and Immunity*. 2013; 34: 164-75.
14. Sun Y., Liu S., Qiao Z., Shang Z., Xia Z., Niu X., Qian L., Zhang Y., Fan L., Cao C.-X., Xiao H. Systematic comparison of exosomal proteomes from human saliva and serum for the detection of lung cancer. *Analytica Chimica Acta*. 2017; 982: 84-95.
15. Fernandez-Botran R., Miller J.J., Burns V.E., Newton T.L. Correlations among inflammatory markers in plasma, saliva and oral mucosal transudate in postmenopausal women with past intimate partner violence. *Brain Behavior and Immunity* 2011; 25: 314-21.
16. Williamson S., Munro C., Pickler R., Grap M.J., Elswick R.K. Comparison of biomarkers in blood and saliva in healthy adults. *Nurs. Res. Pract.* 2012; Article ID 246178: 4.
17. Cullen T., Thomas A.W., Webb R., Hughes M.G. The relationship between interleukin-6 in saliva, venous and capillary plasma, at rest and in response to exercise. *Cytokine*. 2015; 71(2): 397-400.
18. Clinical biochemistry. Collection of instructions. Novosibirsk: ZAO «Vektor-Best»; 2011. (in Russian)
19. Ostrovskiy O.V., Khranov V.A., Popova T.A. *Biochemistry of the oral cavity* [Biohimiya polosti rta]. Volgograd: Volgogradskiy gosudarstvennyi meditsinskiy universitet; 2010. (in Russian)
20. Khranov V.A., PrigodaYe.V. The level of amino nitrogen and imidazole compounds in human oral fluid. *Stomatologiya*. 2002; 6: 10-1. (in Russian)
21. RomanenkoYe.G., Rudenko A.I. The procedure for determining sialic acid in saliva. *Mir biologii I meditsiny*. 2013; 1: 139-42. (in Russian)
22. Bel'skaya L.V. The use of capillary electrophoresis to determine the mineral composition of human saliva. *Byulleten' nauki I praktiki*. 2017; 2(15): 132-40. (in Russian)
23. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.Ye. Method for determination of catalase activity. *Laboratornoye delo*. 1988; 1: 16-9. (in Russian)
24. Volchegorskiy I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G. Comparison of different approaches to the determination of products in heptane-isopropanol extracts of blood. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1989; 1: 127-31. (in Russian)
25. Gavrillov V.B., Bidula M.M., Furmanchuk D.A., Konev S.V., Aleynikova O.V. Assessment of organism intoxication due to imbalance between the accumulation and binding of toxins in plasma. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1999; 2: 13-7. (in Russian)
26. Cohen M., Khalaila R. Saliva pH as a biomarker of exam stress and a predictor of exam performance. *Journal of Psychosomatic Research*. 2014; 77(5): 420-5.
27. Ramya A.S., Uppala D., Majumdar S., Surekha Ch., Deepak K.G.K. Are salivary amylase and pH – Prognostic indicators of cancers? *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2015; 5(2): 81-5.
28. Kaminskaya L.A. Prospects for studying the biochemical parameters of oral fluid in laboratory diagnostics. *Rossiyskaya stomatologiya*. 2010; 3: 36-42. (in Russian)
29. Rodrigues V.P., Franko M.M., Marques C.P.C., de Carvalho R.C.C., Leite S.A.M., Pereira A.L.A., Benatti B.B. Salivary levels of calcium, phosphorus, potassium, albumin and correlation with serum biomarkers in hemodialysis patients. *Archives of oral biology*. 2016; 62: 58-63.
30. Mori M., Iwata T., Satori T., Ohira S-I., Itabashi H., Tanaka K. Ion-exclusion/cation-exchange chromatographic determination of common inorganic ions in human saliva by using an eluent containing zwitterionic surfactant. *Journal of Chromatography A*. 2008; 1213: 125-9.
31. Shirzaei M., Heidari F., Dalirsani Z., Dehghan J. Estimation of salivary sodium, potassium, calcium, phosphorus and urea in type II diabetic patients. *Diabetes&Metabolic Syndrome: clinical research&reviews*. 2015; 9 (4): 332-6.
32. Meyer-Lueckel H., Chatzidakis A.J., Kielbassa A.M. Effect of various calcium/phosphates ratios of carboxymethylcellulose-based saliva substitutes on mineral loss of bovine enamel in vitro. *Journal of Dentistry*. 2007; 35: 851-7.
33. Tanaka T., Kobayashi T., Takii H., Kamasaka H., Ohta N., Matsuo T., Yagi N., Kuriki T. Optimization of calcium concentration of saliva with phosphoryl oligosaccharides of calcium (POs-Ca) for enamel remineralization in vitro. *Archives of Oral Biology*. 2013; 58: 174-80.
34. Borisenkov M.F., Yerunova L.A., LyusevaYe.M., Pozdeyeva N.V. Daily dynamics of the total antioxidant activity of human saliva. *Fiziologiya cheloveka*. 2007; 33 (3): 137-8. (in Russian)
35. Volchegorskiy I.A., Kornilova N.V., Butyugin I.A. Comparative analysis of the state of the system "lipid peroxidation - antioxidant protection" in the saliva of patients with chronic periodontitis of mild and moderate severity. *Stomatologiya*. 2010; 6: 24-8. (in Russian)
36. Kamilov R.F., Khanov T.V., Yapparov R.N., Shakirov D.F. Chemiluminescence as a method of assessing the overall antioxidant activity of blood, saliva, tear fluid and urine. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2009; 2: 21-2, 35-6. (in Russian)
37. Tartaglia G.M., Gagliano N., Zarbin L., Tolomeo G., Sforza C. Antioxidant capacity of human saliva and periodontal screening assessment in healthy adults. *Archives of Oral Biology*. 2017; 78: 34-8.
38. Mobarak E.H., Abdallah D.M. Saliva nitric oxide levels in relation to caries experience and oral hygiene. *Journal of Advanced Research*. 2011; 2(4): 357-62.
39. Korde (Choudhari) Sh., Sridharan G., Gadbaal A., Poornima V. Nitric oxide and oral cancer: A review. *Oral Oncology*. 2012; 48(6): 475-83.
40. Rocha B.S., Lundberg J.O., Radi R., Laranjinha J. Role of nitrite, urate and pepsin in the gastroprotective effects of saliva. *Redox Biology*. 2016; 8: 407-14.
41. Noskov V.B. Saliva in clinical laboratory diagnostics (literature review). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2008; 6:14-7. (in Russian)
42. Pfafe T., Cooper-White J., Beyerlein P., Kostner K., Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva. Currentstate and futureapplications. *Clin. Chem*. 2011; 57: 675-87.
43. Javaid M.A., Ahmed A.S., Durand R., Tran S.D. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *Journal of Oral Biology and Craniofacial research*. 2016; 6(1): 67-76.
44. Shipper R.G., Silletti E., Vingerhoeds M.H. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of oral biology*. 2007; 52: 1114-35.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.8-009.24-02:618.3/.7]-07:618.346-074

Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А., Михельсон А.А., Аллилуев И.А., Михельсон А.М.

## ДИСБАЛАНС ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ОКОЛОПЛОДНЫХ ВОДАХ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

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

*Изучены показатели проокислительных и антиокислительных процессов в околоплодных водах в динамике физиологической беременности и при преэклампсии. С помощью спектрофотометрических и флуориметрических методов оценивали активность НАДФН-оксидазы, ксантинооксидазы, супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, системы глутатионзависимых ферментов, содержание антиокислительных витаминов – ретинола и α-токоферола, продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов и оснований Шиффа, а также параметры перекисной хемилюминесценции. Установлено, что при преэклампсии имеет место повышение активности проокислительных ферментов – НАДФН-оксидазы и ксантинооксидазы, снижение активности антиокислительных ферментов – СОД, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы, содержания жирорастворимых витаминов. Между проокислительными и антиокислительными показателями, содержанием продуктов ПОЛ, интенсивностью хемилюминесценции установлена корреляционная связь, степень которой различна во II и в III триместрах беременности, отличающимися особенностями роста и развития плода в эти периоды. Выявленные изменения, очевидно, играют патогенетическую роль в формировании и дальнейшем развитии преэклампсии, а показатели окислительно-восстановительных процессов могут служить информативными маркерами пре- и постнатальной патологии.*

**Ключевые слова:** окислительно-восстановительный баланс; проокислительные и антиокислительные ферменты; антиокислительные витамины; продукты перекисного окисления липидов; околоплодные воды; преэклампсия.

**Для цитирования:** Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А., Михельсон А.А., Аллилуев И.А., Михельсон А.М. Дисбаланс окислительно-восстановительных процессов в околоплодных водах при преэклампсии. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (8): 483-489. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-483-489>

Pogorelova T.N., Gunko V.O., Nikashina A.A., Mikhelson A.A., Alliluev I.A., Mikhelson A.M.

DISBALANCE OF REDOX PROCESSES IN AMNIOTIC FLUID AT PRE-ECLAMPSIA

Rostov State Medical University, 344012, Rostov-on-Don, Russia

*The parameters of pro and antioxidant processes in the amniotic fluid in the dynamics of physiological pregnancy and pre-eclampsia were studied. Spectrophotometric and fluorimetric methods were used to evaluate the activity of NADPH-oxidase, xanthine-oxidase, superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione-dependent enzyme systems, the content of antioxidant vitamins – retinol and α-tocopherol, lipid peroxidation products (LPP) – diene conjugates and Schiff bases, and parameters of peroxide chemiluminescence. It was found that with preeclampsia there is an increase in the activity of prooxidant enzymes NADPH-oxidase and xanthine-oxidase, a decrease in the activity of antioxidant enzymes SOD, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione transferase, and the content of fat-soluble vitamins. Between pro- and antioxidant indices and the content of LPP, intensity of chemiluminescence a correlation is established, the degree of which is different in the II and III trimesters of pregnancy. The revealed changes obviously play a pathogenetic role in the formation and further development of preeclampsia, and the indicators of oxidation-reduction processes can serve as informative markers of pre- and postnatal pathology.*

**Key words:** redox balance; pro- and antioxidant enzymes; antioxidant vitamins; lipid peroxidation products; amniotic fluid; pre-eclampsia.

**For citation:** Pogorelova T.N., Gunko V.O., Nikashina A.A., Mikhelson A.A., Alliluev I.A., Mikhelson A.M. Disbalance of redox processes in amniotic fluid at pre-eclampsia. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (8): 483-489 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-483-489>

**For correspondence:** Pogorelova Tatyana Nikolaevna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Researcher of Department of Biomedical Problems in Obstetrics, Gynecology and Pediatrics; e-mail: [tnp.rniiap@yandex.ru](mailto:tnp.rniiap@yandex.ru)

### Information about authors:

Pogorelova T.N.: <https://orcid.org/0000-0002-0400-0652>

Gunko V.O.: <https://orcid.org/0000-0001-8607-9052>

Nikashina A.A.: <https://orcid.org/0000-0001-8099-9093>

Alliluev I.A.: <https://orcid.org/0000-0001-7654-0650>

Mikhelson A.A.: <https://orcid.org/0000-0002-8282-2248>

Mikhelson A.M.: <https://orcid.org/0000-0003-1680-8509>

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 03.04.2018  
Accepted 11.05.2018

**Для корреспонденции:** Погорелова Татьяна Николаевна, д-р биол. наук, проф., гл. науч. сотр. отдела медико-биологических проблем в акушерстве, гинекологии и педиатрии; e-mail: [tnp.rniiap@yandex.ru](mailto:tnp.rniiap@yandex.ru)

*Введение.* Соотношение окислительно-восстановительных реакций в организме играет важную роль в регуляции многих молекулярно-клеточных процессов. Изменение этого соотношения может приводить к нарушению практически всех видов обмена веществ и энергетического обеспечения клеток [1, 2]. Теоретическая ценность изучения характера окислительно-восстановительных процессов определяется необходимостью понимания механизмов формирования патологических состояний. Кроме того, значение анализа показателей редокс-процессов обусловлено возможностью использования этих данных в диагностических и прогностических целях в качестве критериев оценки развития патологии. Особую важность состояние редокс-процессов имеет в период гестации, когда интенсивность метаболизма повышается в связи с необходимостью обеспечения трофических и энергетических потребностей не только материнского организма, но и плода, и удовлетворение этих потребностей необходимо для нормального течения и исхода беременности [3].

Весьма информативным объектом изучения состояния биологической системы мать–плацента–плод являются околоплодные воды – одна из сред организма, быстро реагирующая изменением своего состава на любые отклонения, происходящие в организмах матери, плода и плаценте, осуществляющей взаимосвязь между ними. При этом глубина и длительность изменений находятся в прямой зависимости от характера патологии и эффективности проводимого лечения. Биохимический анализ околоплодных вод может представить весьма ценные сведения о течении беременности, состоянии плода и дать возможность прогнозировать состояние новорождённого. Следует отметить, что взаимосвязь между матерью и плодом, помимо основного плацентарного обмена, происходит также с помощью параплацентарного обмена, в котором именно околоплодные воды играют ведущую роль [4]. В то же время исследования окислительно-восстановительных процессов в околоплодных водах при патологической беременности отражены в современной литературе крайне недостаточно [5, 6]. Большая часть из них выполнена в плацентарной ткани и сыворотке крови.

В числе факторов, осложняющих беременность и нарушающих нормальное развитие плода, важная роль принадлежит преэклампсии, которая до настоящего времени остаётся важной проблемой современного акушерства. Частота преэклампсии во всём мире достигает 5–8% и не имеет тенденции к снижению [7, 8]. У женщин, перенёсших преэклампсию в период беременности, в последующем наблюдается развитие ожирения, хронической артериальной гипертензии, сахарного диабета, метаболического синдрома, ишемической болезни сердца. Различными метаболическими, гормональными, сердечно-сосудистыми заболеваниями в отдельные периоды развития страдают и дети, рождённые этими женщинами [9].

Высокая частота материнской и перинатальной заболеваемости и смертности при преэклампсии связана с отсутствием точных знаний о патогенезе заболевания и достоверных диагностических критериев, что приводит к неадекватной терапии и различным осложнениям при данной патологии [10, 11]. Это обосновывает актуальность дальнейшего изучения биохимических механизмов формирования преэклампсии и своевременного выявления пациенток с повышенным риском её развития с учётом того, что клинические симптомы преэклампсии обычно не проявляются до 20 недель гестации [12]. Поскольку преэклампсия сопровождается развитием внутриутробной гипоксии, периодически чередующейся с реперфузией в фетоплацентарном комплексе [13], соотношение окислительно-восстановительных процессов в околоплодных водах при данном осложнении беременности приобретает особую важность.

В связи с вышеуказанным настоящая работа посвящена

изучению окислительно-восстановительных характеристик околоплодных вод при физиологической беременности и преэклампсии с целью выяснения роли выявленных нарушений в развитии этой акушерской патологии и их значения в диагностике возможных пре- и постнатальных осложнений.

*Материал и методы.* В проспективное исследование включили 58 женщин в возрасте 24–30 лет, из которых составили 2 группы. В 1-ю группу вошли 28 клинически здоровых женщин с неосложнённым течением беременности и родов (контрольная группа). Во 2-ю (основную) группу включили 30 женщин, у которых беременность осложнилась преэклампсией средней степени в соответствии с международной классификацией болезней МКБ-10, код O14.0. По возрасту, индексу массы тела, соматическому, акушерско-гинекологическому анамнезу, паритету беременностей и родов женщины обеих групп были сопоставимы. Из исследования исключались пациентки с декомпенсированными формами соматических заболеваний, многоплодной беременностью, аутоиммунной патологией и женщины, не давшие информированного согласия на расширенный алгоритм обследования. Критериями включения в исследование был возраст женщин до 35 лет и клинические признаки преэклампсии, приведённые в МКБ и появившиеся у обследованных нами женщин после 22–24 нед гестации. Обследованные женщины наблюдались в консультативной поликлинике Ростовского НИИ акушерства и педиатрии в рамках программы «Акушерский мониторинг». Пациентки с преэклампсией получали амбулаторное лечение, а в случае необходимости их госпитализировали в отделение патологии беременности института.

Материалом для исследования служили околоплодные воды, взятые в сроки 16–18 нед и 39–40 нед. В первом случае околоплодные воды получали путём трансабдоминального амниоцентеза. Проведение этой процедуры осуществлялось для исключения хромосомной патологии плода\*. У всех плодов женщин, включённых в исследование, был нормальный хромосомный набор. Во втором случае околоплодные воды получали при вскрытии плодного пузыря в первом периоде родов.

Для суждения о прооксидантных процессах в околоплодных водах изучали активность НАДФН-оксидазы и ксантиноксидазы, которые оценивали с помощью спектрофотометрических методов [14]. Об активности ксантиноксидазы (КФ 1.2.3.2.) судили по усилению степени окисления ксантина и определению уровня образовавшейся мочевой кислоты в ультрафиолетовой области при длине волны 293 нм, используя коэффициент молярной экстинкции  $7,59 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Активность ферментов выражали в нмоль/мин  $\times$  мг белка. Активность НАДФН-оксидазы (КФ 1.11.1.2) определяли по восстановлению 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФДФ) в присутствии НАДФН при 600 нм. Коэффициент молярной экстинкции для 2,6-ДХФДФ –  $21 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Состояние антиоксидантной системы оценивали по показателям активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР), глутатион-S-трансферазы (ГСТ), а также содержанию а-токоферола и ретинола. Активность СОД (КФ 1.1.5.11) определяли по степени торможения реакции восстановления нитросиногетразолия в результате ферментативной дисмутации генерируемого супероксидного анион-радикала при 540 нм [14]. За единицу активности принимали количество фермента, вызывающее 50% торможение реакции, и выражали в усл. ед./мг белка. Об активности каталазы (КФ 1.11.1.6) судили по убыли  $\text{H}_2\text{O}_2$  при длине волны 230 нм, учитывая коэффициент молярной экстинкции  $\text{H}_2\text{O}_2$ , равный 0,071 [15]. Активность выражали в нмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ /мин  $\times$  мг белка. Активность глутатион-

\*Приказ Минздрава России от 01.11.2012 г. № 572н

зависимых ферментов определяли с помощью общепринятых спектрофотометрических методов [16]. Активность ГПО (КФ 1.11.1.9) оценивали в реакции расщепления гидроперекиси третбутила при длине волны 412 нм, используя в качестве субстрата восстановленный глутатион. Активность GST (КФ 2.1.5.18) определяли по скорости реакции образования GS-2,4-динитробензола в реакции восстановленного глутатиона с 1-хлор-динитробензолом при 340 нм. Активность ГР (КФ 1.6.4.2) измеряли по степени окисления НАДФН при длине волны 340 нм в присутствии окисленного глутатиона. Активность этих ферментов выражали в нмоль/мин×мг белка.

Содержание  $\alpha$ -токоферола определяли спектрофотометрическим методом после его экстракции ксилолом в реакции с 4,7-дифенил-1,10-фенантролином, измеряя окраску образовавшегося продукта при длине волны 539 нм [17]. Содержание ретинола оценивали по величине абсорбции ксилоловой фазы в УФ-зоне спектра при 335 нм, используя коэффициент поглощения 1% раствора ретинола в ксилоле 22,23 [17]. Концентрацию  $\alpha$ -токоферола и ретинола выражали в мкг/л.

Об интенсивности свободно-радикального окисления липидов судили по содержанию диеновых конъюгатов и оснований Шиффа. Определение диеновых конъюгатов осуществляли спектрофотометрически при длине волны 233 нм [18] в гептановой фазе экстрагирующей смеси (гептан с изопропиловым спиртом в объёмном соотношении 1:1). Содержание диеновых конъюгатов рассчитывали, исходя из величины молярного коэффициента, равного  $2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , и выражали в мкмоль/л. Основания Шиффа определяли по флуоресценции хлороформных экстрактов из образцов околоплодных вод при длине волны возбуждения 360 нм и максимума испускания при длине волны 440 нм. Калибровку шкалы флуориметра (RF-5101, «Shimadzu», Япония) строили по стандартному раствору хирина сульфата. Относительное содержание оснований Шиффа выражали в условных единицах.

Кроме того, оценку степени выраженности свободно-радикальных процессов в околоплодных водах проводили методом хемилюминесценции. Регистрацию параметров хемилюминесценции осуществляли на люминометре Emilite («BioRad», США) со спектральным диапазоном 350–950 нм, динамическим диапазоном 10 квант/с. Измерения проводили при длине волны 425 нм и стандартизации сигнала при 5000 мВ, что соответствовало световому потоку интенсивностью 6,5–10 квант/с. Оценивали интенсивность и светосумму (за 1 мин) перекисной хемилюминесценции.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью лицензионного пакета программ Statistica (версия 6.0 фирмы «StatSoft Inc.»). Степень соответствия закона распределения данных нормальному распределению оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Однородность дисперсий проверяли по критерию Фишера. При заданных объёмах выборок ( $n_1 = 28$ ;  $n_2 = 30$ ) значение F-критерия Фишера для различных параметров изменялось от 2,1 до 3,2, что давало уровень значимости  $p < 0,05$ . Достоверность различий между сравниваемыми показателями определяли по критерию Стьюдента ( $t$ -критерий) для независимых выборок. Корреляционный анализ выполнен с использованием критерия Пирсона и расчёт коэффициента корреляции  $r$ . Результаты оценивали как статистически значимые при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Полученные данные свидетельствуют о значительном изменении интенсивности окислительно-восстановительных процессов в околоплодных водах при преэклампсии по сравнению с аналогичными показателями при физиологической гестации, причём степень этих изменений зависит от её срока (см. таблицу). В околоплодных водах у женщин основной группы относительно пациенток контрольной группы увеличивалась активность прооксидантных ферментов, к числу которых относится НАДФН-оксидаза, приво-

дущая к образованию супероксидного анион-радикала, и ксантинооксидаза, также приводящая к образованию активных форм кислорода (АФК): супероксидного анион-радикала и перекиси водорода. Активность НАДФН-оксидазы при преэклампсии повышается во II триместре на 62,5%, а в III триместре – на 44,1%. Для ксантинооксидазы установлено повышение активности на 52,6 и 40,0% соответственно – во II триместре и к концу беременности. Активность антиоксидантных ферментов СОД и каталазы, участвующих в утилизации супероксидного анион-радикала и перекиси водорода, напротив, снижается, для СОД снижение составляет 48,2 и 43,5%, а для каталазы – 35,5 и 31,5% – соответственно во II и III триместрах.

Что касается антиоксидантных ферментов, сопряженных с глутатионом и участвующих в регуляции редокс-зависимых процессов, то их активность также уменьшается в околоплодных водах женщин, беременность которых осложнилась преэклампсией. Наиболее выраженное уменьшение активности характерно для ГПО: на 41,3 и 50,3% во II и III триместрах соответственно. Несколько в меньшей степени снижается активность ГР и GST – в среднем на 35 и 45% во II и III триместрах соответственно. В состав многокомпонентной антиоксидантной системы наряду с ферментами входят жирорастворимые витамины  $\alpha$ -токоферол и ретиноиды. Содержание ретинола снижается на 32 и 38%, а  $\alpha$ -токоферола – на 19 и 25% во II и III триместрах гестации.

Из полученных нами данных следует, что дисбаланс прооксидантной и антиоксидантной систем при преэклампсии приводит к усилению процессов свободнорадикального окисления, важной частью которого является перекисное окисление липидов (ПОЛ). Количество первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов в околоплодных водах женщин с преэклампсией увеличивается во II триместре на 36%, а в III – на 42% по сравнению с таковыми при неосложнённой беременности. Содержание конечных продуктов перекисаации – оснований Шиффа – повышено на 29 и 37% во II и III триместрах соответственно.

Ещё одним подтверждением нарушения баланса процессов свободнорадикального окисления при преэклампсии являются показатели перекисной хемилюминесценции. Уровень интенсивности её свечения в околоплодных водах повышен на 36 и 53% в середине и в конце беременности, а показатель светосуммы увеличен соответственно на 22 и 34%.

Зависимость между показателями ПОЛ, повышением интенсивности прооксидантных и снижением антиоксидантных процессов подтверждается результатами корреляционного анализа. Прямая корреляционная связь выявлена между содержанием диеновых конъюгатов и активностью НАДФН-оксидазы ( $r = 0,86$  во II триместре и  $0,79$  – в III триместре;  $p < 0,01$ ), а также активностью ксантинооксидазы ( $r = 0,81$  и  $0,75$ ;  $p < 0,01$ ). Коэффициенты корреляции между содержанием оснований Шиффа и активностью НАДФН-оксидазы и ксантинооксидазы равны соответственно  $0,82$  и  $0,77$  ( $p < 0,01$ ) во II триместре и  $0,80$  и  $0,78$  ( $p < 0,01$ ) – в III триместре.

Для антиоксидантного фермента СОД установлена обратная корреляционная связь его активности с показателями ПОЛ, более значимая во II триместре по сравнению с III триместром. В сопоставлении с содержанием диеновых конъюгатов коэффициент корреляции составляет  $-0,87$  ( $p < 0,01$ ) во II триместре и  $-0,84$  – в III триместре ( $p < 0,01$ ), в сопоставлении с содержанием оснований Шиффа  $r = -0,80$ ;  $p < 0,01$  (II триместр) и  $r = -0,79$ ;  $p < 0,01$  (III триместр). Коэффициент корреляции между активностью каталазы и уровнем диеновых конъюгатов составил  $-0,85$  ( $p < 0,01$ ) во II триместре и  $-0,78$  ( $p < 0,01$ ) в III триместре. Сопоставление активности каталазы и содержания оснований Шиффа также подтверждает тесную взаимосвязь между ними: во II триместре  $r = -0,82$ , в III триместре  $-0,76$  ( $p < 0,01$ ). Отрицательная взаимосвязь различной степени установлена между продуктами

ПОЛ и глутатион-зависимыми ферментами, а также жирорастворимыми витаминами. Коэффициенты корреляции при этом находятся в пределах  $-0,82...-0,71$  ( $p < 0,01$ ).

*Обсуждение.* Патологические механизмы развития преэклампсии закладываются уже на ранних этапах беременности задолго до появления её клинических признаков и обусловлены нарушением инвазии трофобласта и неполноценной трансформацией стенок спиральных артерий с последующей системной активацией эндотелия [19]. Развивающиеся вследствие этих процессов патологические нарушения связаны прежде всего с внутриутробной гипоксией, дисбалансом материнско-плацентарного и плодово-плацентарного кровотока и окислительным стрессом. Последний рассматривается в настоящее время как основное связующее звено между этапами морфофункциональных повреждений при преэклампсии [13]. Причём для окислительного стресса при данной акушерской патологии характерна не только его локальная активация в плаценте, но и системная активация в фетоплацентарном комплексе, о чём свидетельствуют полученные нами данные анализа околоплодных вод.

Повышение активности прооксидантных ферментов НАДФН-оксидазы и ксантинооксидазы во II и III триместрах приводит к усиленной генерации супероксидного анион-радикала и перекиси водорода. Такими же последствиями сопровождается снижение активности СОД и каталазы. Разнонаправленная динамика вышеуказанных ферментов усиливает свободнорадикальные процессы, приводя к значительному накоплению АФК. Важно отметить, что более выраженное повышение активности прооксидантных ферментов при преэклампсии происходит во II триместре по сравнению с III триместром. В это же время значительно уменьшается антиоксидантная активность СОД и каталазы. Поэтому в 16–18 недель осложнённой беременности может иметь место особенно интенсивная продукция свободных радикалов. Очевидно, это связано с тем, что данный период является весьма важным в развитии плода и фетоплацентарной системы в целом [3]. Подтверждением данного предположения является выраженная пероксидация во II триместре по сравнению с III триместром и физиологической беременности. Изменение указанных реакций на этой стадии внутриутробного онтогенеза связано с модификацией темпов роста, клеточной дифференцировки, интенсивными пролиферативными, анаболическими процессами, реакциями ангиогенеза и апоптоза, происходящими прежде всего в плаценте и организме плода. Именно нарушения, возникающие в указанные сроки, зачастую являются причиной осложнённого течения беременности в последующем.

Существенный вклад в генерацию АФК и развитие окислительного стресса при преэклампсии вносит установленное нами снижение в околоплодных водах активности антиоксидантных ферментов, участвующих в регуляции редокс-зависимых процессов, главным образом путём поддержания баланса между восстановленным и окисленным глутатионом. Как известно, сохранение оптимального для клетки соотношения восстановленного глутатиона и окисленного служит важным условием для её жизнедеятельности. Восстановленный глутатион, являясь внутриклеточным антиоксидантом, выполняет роль косубстрата в реакциях детоксикации пероксидов, катализируемых ГПО и GST [20]. Однако при преэклампсии происходит уменьшение активности данных ферментов, особенно ГПО, поэтому возможность «обезвреживания»  $H_2O_2$ /пероксидов в этих условиях значительно снижается, что имеет весьма негативные последствия для баланса окислительно-восстановительных процессов.

Что касается GST, образующей суперсемейство изоформ, катализирующих конъюгацию глутатиона с целым спектром неполярных компонентов эндогенного и экзогенного происхождения, то она вносит существенный вклад в защиту клет-

ки от возможного токсического действия этих соединений [21]. В числе продуктов окисления полиненасыщенных жирных кислот, фосфолипидов, белков, нуклеотидов, биогенных аминов и других соединений появляются вещества с токсическими свойствами, которые будут субстратами изоформ GST. Наряду с важной ролью в системе детоксикации GST участвует в работе антиоксидантной системы благодаря способности восстанавливать различные органические гидроперекиси (в отличие от ГПО, взаимодействующей с  $H_2O_2$ ). В физиологических условиях GST служит существенным блоком развитию деструктивного действия окислительного стресса в связи с её высокой активностью по отношению к продуктам ПОЛ. Снижение активности GST при преэклампсии нарушает эффективность всех этих механизмов.

Для ГР – фермента, восстанавливающего окисленный глутатион в присутствии НАДФН, характерно аналогичное по степени уменьшение активности, что приводит к накоплению окисленного глутатиона и, следовательно, к нарушению клеточного редокс-статуса и изменению редокс-зависимой регуляции многих биологически важных процессов в фетоплацентарной системе. Совокупность модификации активности изученных про- и антиоксидантных ферментов при преэклампсии, очевидно, приводит к усилению внутриутробной гипоксии и развитию окислительного стресса.

Изменение содержания  $\alpha$ -токоферола и ретиноидов, обладающих антиоксидантными свойствами, усугубляет дисбаланс окислительно-восстановительных процессов, особенно к концу осложнённой беременности. Обращает на себя внимание более выраженное уменьшение уровня ретинола в разные периоды гестации по сравнению с аналогичными величинами  $\alpha$ -токоферола, по-видимому, связанное с чрезвычайно лёгкой его окисляемостью. Недостаток данного витамина во время беременности может приводить к серьёзным пренатальным нарушениям, поскольку внутриутробный плод самостоятельно не синтезирует его и зависит от материнской и плацентарной доставки [22]. Дополнительный вклад в ухудшение снабжения плода витамином А вносит снижение в околоплодных водах при преэклампсии содержания ретинол-связывающего белка 4, который участвует в доставке ретинола плоду [23].

Динамика содержания изученных нами витаминов в разные сроки физиологической беременности свидетельствует о том, что во II триместре потребность в них, вероятно, более высока. Это ещё раз подтверждает важность данного триместра во внутриутробном периоде развития. К концу физиологической беременности количество токоферола и ретинола ниже, чем в 16–18 недель. При преэклампсии изменение уровня антиоксидантных витаминов более значимо в III триместре по сравнению со II триместром. По данным литературы, при преэклампсии уменьшение содержания  $\alpha$ -токоферола установлено также в сыворотке крови [24], причём авторы обнаружили тесную отрицательную корреляцию между уровнем этого витамина, продуктами ПОЛ и степенью окислительного стресса, что дало им основание рекомендовать женщинам с преэклампсией дополнительно принимать этот антиоксидантный витамин.

Сопоставление степени изменений показателей антиоксидантной системы защиты при физиологической беременности и при преэклампсии свидетельствует о том, что в первом случае основную роль в усилении свободнорадикальных процессов играют ферменты, сопряженные с глутатионом. При преэклампсии снижение всех изученных показателей как ферментативной, так и неферментативной антиоксидантных систем способствует активации свободнорадикального окисления, что подтверждается обратной корреляционной связью между этими показателями и уровнем продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов и оснований Шиффа. Об увеличении интенсивности свободнорадикальных процессов

**Показатели окислительно-восстановительных процессов в околоплодных водах при физиологической беременности и преэклампсии**

Показатель	Физиологическая беременность		Преэклампсия		p
	II триместр	III триместр	II триместр	III триместр	
НАДФН-оксидаза, нмоль/ мин·мг белка	0,24 ± 0,02 (0,20 – 0,28)	0,34 ± 0,03 (0,28 – 0,40)	0,39 ± 0,04 (0,31 – 0,47)	0,49 ± 0,06 (0,37 – 0,61)	p <sub>1</sub> = 0,08 p <sub>2</sub> = 0,02 p <sub>3</sub> = 0,033
Ксантинооксидаза (нмоль/ мин·мг белка)	0,19 ± 0,02 (0,15 – 0,23)	0,25 ± 0,02 (0,21 – 0,29)	0,29 ± 0,03 (0,23 – 0,35)	0,35 ± 0,04 (0,27 – 0,43)	p <sub>1</sub> = 0,039 p <sub>2</sub> = 0,08 p <sub>3</sub> = 0,033
Супероксиддисмутаз (о.ед./ мг белка)	1,61 ± 0,11 (1,39 – 1,83)	2,34 ± 0,21 (1,93 – 2,75)	0,83 ± 0,09 (0,65 – 1,01)	1,32 ± 0,12 (1,08 – 1,56)	p <sub>1</sub> = 0,003 p <sub>2</sub> = 0,001 p <sub>3</sub> = 0,002
Каталаза (нмоль/мин·мг белка)	0,48 ± 0,05 (0,38 – 0,58)	0,70 ± 0,06 (0,58 – 0,82)	0,31 ± 0,03 (0,25 – 0,37)	0,48 ± 0,05 (0,38 – 0,58)	p <sub>1</sub> = 0,007 p <sub>2</sub> = 0,04 p <sub>3</sub> = 0,006
Глутатионпероксидаза (нмоль/ мин·мг белка)	0,97 ± 0,08 (0,81 – 1,13)	1,83 ± 0,25 (1,34 – 2,32)	0,57 ± 0,05 (0,47 – 0,67)	0,91 ± 0,07 (0,77 – 1,05)	p <sub>1</sub> = 0,002 p <sub>2</sub> = 0,002 p <sub>3</sub> = 0,002
Глутатионредуктаза (нмоль/ мин·мг белка)	0,36 ± 0,04 (0,28 – 0,44)	0,52 ± 0,04 (0,44 – 0,60)	0,24 ± 0,02 (0,20 – 0,28)	0,31 ± 0,03 (0,25 – 0,37)	p <sub>1</sub> = 0,007 p <sub>2</sub> = 0,008 p <sub>3</sub> = 0,000
Глутатион-S-трансфераза (нмоль/мин·мг белка)	0,54 ± 0,04 (0,46 – 0,62)	0,75 ± 0,08 (0,59 – 0,91)	0,34 ± 0,04 (0,26 – 0,42)	0,39 ± 0,04 (0,31 – 0,47)	p <sub>1</sub> = 0,023 p <sub>2</sub> = 0,001 p <sub>3</sub> = 0,001
α-Токоферол (мкг/л)	58,2 ± 4,2 (49,97 – 66,43)	40,3 ± 3,8 (2,85 – 47,75)	47,1 ± 3,5 (40,24 – 53,96)	30,2 ± 2,2 (25,89 – 34,51)	p <sub>1</sub> = 0,003 p <sub>2</sub> = 0,046 p <sub>3</sub> = 0,023
Ретинол (мкг/л)	6,23 ± 0,46 (5,33 – 7,13)	3,44 ± 0,29 (2,87 – 4,01)	4,21 ± 0,28 (3,66 – 4,76)	2,12 ± 0,14 (1,85 – 2,39)	p <sub>1</sub> = 0,002 p <sub>2</sub> = 0,002 p <sub>3</sub> = 0,001
Диеновые конъюгаты (мкмоль/л)	11,4 ± 0,8 (9,83 – 12,97)	14,6 ± 0,9 (12,84 – 16,36)	15,5 ± 1,2 (13,15 – 17,85)	20,7 ± 1,3 (18,15 – 23,25)	p <sub>1</sub> = 0,010 p <sub>2</sub> = 0,007 p <sub>3</sub> = 0,001
Основания Шиффа (о.ед./л)	18, ± 1,2 (15,85 – 20,55)	23,4 ± 2,1 (19,28 – 27,52)	23,5 ± 1,7 (20,17 – 26,83)	32,1 ± 2,2 (27,79 – 36,41)	p <sub>1</sub> = 0,036 p <sub>2</sub> = 0,015 p <sub>3</sub> = 0,006
Интенсивность перекисной хемилюминесценции (× 10 <sup>5</sup> квант/с)	9,3 ± 0,6 (8,12 – 10,48)	13,4 ± 1,2 (11,05 – 15,75)	12,6 ± 0,7 (11,23 – 13,97)	20,7 ± 1,3 (18,15 – 23,25)	p <sub>1</sub> = 0,003 p <sub>2</sub> = 0,001 p <sub>3</sub> = 0,002
Светосумма перекисной хемилюминесценции (× 10 <sup>6</sup> квант/с)	19,2 ± 1,5 (16,26 – 22,14)	29,2 ± 2,7 (23,91 – 34,49)	23,4 ± 1,4 (20,66 – 26,14)	39,3 ± 2,6 (34,20 – 44,40)	p <sub>1</sub> = 0,002 p <sub>2</sub> = 0,045 p <sub>3</sub> = 0,009

Примечание. p<sub>1</sub> – достоверность различий между показателями II и III триместров физиологической беременности; p<sub>2</sub> – между показателями при физиологической беременности и при преэклампсии во II триместре; p<sub>3</sub> – между показателями при физиологической беременности и при преэклампсии в III триместре. Данные представлены в виде средней величины ± ошибка среднего (в скобках – 95% доверительный интервал).

свидетельствуют и динамика параметров перекисной хемилюминесценции, светосумма которой отражает общую антиоксидантную активность околоплодных вод.

Поскольку работы по изучению свободнорадикальных процессов в околоплодных водах в течение беременности, осложнённой преэклампсией, в информационных базах отсутствуют, мы сопоставили наши данные с аналогичными исследованиями в околоплодных водах, но при других акушерских патологиях – гестационном сахарном диабете, преждевременных родах и гипертонии, также приводящих к развитию окислительного стресса [5, 6]. Авторы этих работ установили повышение содержания продуктов ПОЛ и снижение некоторых показателей антиоксидантной защиты, к сожалению, без учёта изменений антиоксидантных ферментов, сопряжённых с глутатионом. Данные исследования подтверждают высокую реактивность метаболизма околоплодных вод в ответ на развитие осложнённой беременности и их активное участие в формировании повреждённых в фетоплацентарном комплексе.

Важное значение среди последствий окислительно-восстановительного дисбаланса могут иметь изменения структуры и свойств белков, наблюдающиеся при накоплении

АФК, в частности усиление окислительного карбонилирования белков [25]. Эта посттрансляционная модификация сопровождается повышением чувствительности белков к действию пептидгидролаз, активность которых увеличивается в околоплодных водах при преэклампсии [26]. Особенно негативным представляется то, что повреждённый окисленный белок будет продолжать участвовать в межклеточной коммуникации, передаче сигнала в искажённом виде, нарушая тем самым многочисленные регуляторные процессы. Помимо этого в результате данной модификации происходит изменение соотношения белково-связанных и свободных аминокислот, в том числе обладающих антиоксидантной активностью [27].

Окислительная деструкция белков, по-видимому, отражается и на протеомном спектре околоплодных вод и плаценты, дисбаланс которых при преэклампсии установлен нами ранее [23]. Выявленное в этих исследованиях с помощью масс-спектрометрии снижение уровней неферментативного антиоксиданта гаптоглобина и антиоксидантного фермента пероксиредоксина-2 будет, в свою очередь, способствовать усилению окислительных процессов. Кроме того, усиление внутриутробной гипоксии, повышение генерации АФК, уве-

личение количества метаболитов окислительной модификации липидов способны приводить к развитию эндотелиальной дисфункции, являющейся составной частью мультисистемного воспалительного ответа при преэклампсии [28].

Подытоживая причины и последствия выявленных нарушений, можно ещё раз отметить, что дисбаланс окислительно-восстановительных процессов при данной акушерской патологии приводит к развитию окислительного стресса, сопровождающегося снижением фетоплацентарного и параплацентарного обменов. Это, по принципу обратной связи, ещё в большей степени усиливает метаболические повреждения в течение пренатального периода развития и в дальнейшем приводит к осложнениям в развитии новорождённого. Наблюдения за новорождёнными основной группы, которые были переведены из родильного блока в отделение патологии и реабилитации новорождённых, показали, что у 25% из них появились признаки постнатальной энцефало- и кардиопатии. Причём в первом случае наиболее информативными прогностическими тестами служат показатели содержания ксантинооксидазы и ГПО, во втором – НАДФ-оксидазы и GST.

Таким образом, изученные показатели свободнорадикальных реакций в околоплодных водах, особенно активность НАДФ-оксидазы, ксантинооксидазы, ГПО и GST, степень которых наиболее значима, могут быть маркерами развития окислительного стресса при преэклампсии и прогнозирования постнатальных повреждений.

**Заключение.** Резюмируя полученные данные, можно заключить, что развитие преэклампсии происходит на фоне нарушения баланса окислительно-восстановительных процессов в околоплодных водах. Повышение активности прооксидантных ферментов и снижение антиоксидантных показателей ферментативной и неферментативной систем, очевидно, являются важными причинами развития окислительного стресса и, как следствие, дальнейших метаболических нарушений в фетоплацентарном комплексе, имеющих место при этой акушерской патологии. Разные триместры беременности отличаются различной степенью участия прооксидантных и антиоксидантных процессов в накоплении продуктов свободнорадикального окисления, как при физиологической, так и при осложнённой гестации, что может быть связано с особенностями роста и развития плода в эти периоды. Результаты настоящего исследования позволяют расширить наши представления о биохимических механизмах развития преэклампсии, а также предложить информативные диагностические и прогностические тесты для пренатальной и постнатальной диагностики.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 5-7, 9, 11, 13, 15, 17, 19-22, 24, 25, 27-28 см. REFERENCES)

3. Арутюнян А.В., Шестопалов А.В., Буштырева И.О., Микашинович З.И. *Биохимические механизмы формирования плаценты при физиологической и осложнённой беременности*. СПб.: «Литография»; 2010.
4. Радзинский В.Е., Милованов А.П. ред. *Экстраэмбриональные и околоплодные структуры при нормальной и осложнённой беременности*. М.: МИА; 2004.
8. Ходжаева З.С., Акатъева А.С., Холин А.М., Сафонова А.Д., Вавина О.В., Муминова К.Т. Молекулярные детерминанты развития ранней и поздней преэклампсии. *Акушерство и гинекология*. 2014; (6): 14-9.
10. Сидорова И.С., Никитина Н.А. Современный взгляд на проблему преэклампсии: аргументы и факты. *Акушерство и гинекология*. 2013; (5): 10-6.
12. Стародубцева Н.Л., Попов А.А., Николаев Е.Н., Иванец Т.Ю., Алексеева М.Л., Логинова Н.С. и др. Поиск воспроизводимых биомаркеров для диагностики преэклампсии. *Акушерство и гинекология*. 2013; (2): 10-7.

14. Карпищенко А.И., ред. *Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике*. 3-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. т.2.
16. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободно-радикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации. СПб.: ИКФ «Фоллиант»; 2000.
18. Стальная И.Д. *Современные методы в биохимии*. Орехович В.Н., ред М.: Медицина; 1977.
23. Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Линде В.А. Протеомный профиль плаценты при физиологической беременности и беременности, осложнённой преэклампсией. *Акушерство и гинекология*. 2013; (7): 24-8.
26. Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Линде В.А. Роль процессов деградации и окислительной модификации белков в развитии преэклампсии. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2015; 15(2): 10-3.

## REFERENCES

1. Ye Z.W., Zhang J., Townsend D.M., Tew K.D. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015; 1850(8):1607-21.
2. McDonagh B. Detection of ROS induced proteomic signatures by mass spectrometry *Front. Physiol*. 2017; 8(470). Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.00470/full> (accessed 7 July 2017).
3. Arutyunyan A.V., Shestopalov A.V., Bushtyeva I.O., Mikashinovich Z.I. *Biochemical mechanisms of placenta formation in physiological and complicated pregnancy*. [Биохимические механизмы формирования плаценты при физиологической и осложнённой беременности]. St.Petersburg: «Литография»; 2010. (in Russian)
4. Radzinskiy V.Ye., Milovanov A.P., eds. *Extraembryonic and amniotic structures in normal and complicated pregnancy*. [Jekstrajembrional'nye i okoloplodnye struktury pri normal'noy i oslozhnyonnoy beremennosti]. Moscow: MIA; 2004. (in Russian)
5. Bogavac M., Lakic N., Simin N., Nikolic A., Sudji J., Bozin B. Biomarkers of oxidative stress in amniotic fluid and complications in pregnancy. *J. Matern. Fetal Neonatal Med*. 2012; 25(1): 104-8.
6. Cim N., Tolunay H.E., Karaman E., Boza B., Bilici M., Çetin O. et al. Amniotic fluid oxidant-antioxidant status in foetal congenital nervous system anomalies. *J. Int. Med. Res*. 2017; 46(3): 1146-52.
7. Ghulmiyyah L., Sibai B. *Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia*. *Semin. Perinatol*. 2012; 36(1): 56-9.
8. Khodzhayeva Z.S., Akat'yeva A.S., Kholin A.M., Safonova A.D., Vavina O.V., Muminova K.T. Molecular determinants of the development of early and late preeclampsia. [Molekuljarnye determinanty razvitiya rannej i pozdney prejeklampsii]. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2014; (6): 14-9. (in Russian)
9. Young B., Hacker M.R., Rana S. *Preeclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis*. *Hypertens. Pregnancy*. 2012; 31(1): 50-8.
10. Sidorova I.S., Nikitina N.A. Modern view on the problem of preeclampsia: arguments and facts. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2013; (5): 10-6. (in Russian)
11. El-Sayed A.A.F. Preeclampsia: A review of the pathogenesis and possible management strategies based on its pathophysiological derangements. *Taiwan J. Obstet. Gynecol*. 2017; 56(5): 593-8.
12. Starodubtseva N.L., Popov A.A., Nikolayev Ye.N., Ivanets T.YU., Alekseyeva M.L., Loginova N.S. et al. Search for reproducible biomarkers for the diagnosis of preeclampsia. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2013; (2): 10-7. (in Russian)
13. Redman C. The six stages of pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2014; 4(3): 246. DOI:10.1016/j.preghy.2014.04.020. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210778914000798?via%3Dihub> (accessed 9 July 2014).
14. Karpishchenko A.I., ed. *Medical laboratory technologies: a guide to clinical laboratory diagnostics [Meditsinskie laboratornye tekhnologii: rukovodstvo po klinicheskoy laboratornoy diagnostike]* 3<sup>rd</sup> ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. V.2. (in Russian)
15. Leff J.A., Oppgaard M.A., Curiel T.J., Brown K.S., Schooley R.T., Repine J.E. Progressive increases in serum catalase activity in advancing human immunodeficiency virus infection. *Free Radic. Biol. Med*. 1992; 13(2): 143-9.
16. Arutyunyan A.V., Dubinina Y.Y., Zybina N.N. Methods for assessing free radical oxidation and the body's antioxidant system. Guidelines. [Metody otsenki svobodno-radikal'nogo okisleniya i antioksidantnoy sistemy organizma. Metodicheskie rekomendatsii]. St.Petersburg: IKF «Foliant»; 2000. (in Russian)

17. Rutkowski M., Grzegorzczak K. Modifications of spectrophotometric methods for antioxidative vitamins determination convenient in analytic practice. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 2007; 6(3): 17-28.
18. Stal'naya I.D. Modern methods in biochemistry. [Sovremennyye metody v biokhimii]. Orekhovich V.N., ed. Moscow: Meditsina; 1977. (in Russian)
19. Roberts J.H., Hubel C.A. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta.* 2009; 30(A): 32-7.
20. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1830: 3217-66.
21. Wu B., Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 2012; 33: 656-68.
22. Spiegler E., Kim Y.K., Wassef L., Shete V., Quadro L. Maternal-fetal transfer and metabolism of vitamin A and its precursor  $\beta$ -carotene in the developing tissues (2012) *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1821(1), 88-98.
23. Pogorelova T.N., Gunko V.O., Linde V.A. Proteomic profile of the placenta during physiological pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia. *Akusherstvo i ginekologiya.* 2013; (7): 24-8. (in Russian)
24. Asha Rani N., Naidu J.N. Protein carbonylation, lipid peroxidation and serum alpha tocopherol activity in preeclampsia. *International Journal of Recent Trends in Science and Technology.* 2013; 8(3): 163-6.
25. Gao H.J., Zhu Y.M., He W.H., Liu A.X., Dong M.Y., Jin M. et al. Endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress in decidual cells: a possible mechanism of early pregnancy loss. *Mol. Biol. Rep.* 2012; 39(9): 9179-86.
26. Pogorelova T.N., Gunko V.O., Linde V.A. The role of the processes of destruction and oxidative modification of proteins in the development of preeclampsia. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa.* 2015; 15(2): 10-3. (in Russian)
27. Qian Y., Zhang L., Rui C., Ding H., Mao P., Ruan H. et al. Peptidome analysis of amniotic fluid from pregnancies with preeclampsia. *Mol. Med. Rep.* 2017; 16(5): 7337-44.
28. Possomato-Vieira J.S., Khalil R.A. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. *Adv. Pharmacol.* 2016; 77: 361-431.

Поступила 03.04.18

Принята к печати 11.05.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.313.1

Колсанов А.В., Чаплыгин С.С., Соколов А.В., Власов М.Ю., Мьякишева Ю.В.

## ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТАБОЛИЗМА В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

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

*Поиск новых способов диагностики заболеваний различной этиологии и внедрение их в практическое здравоохранение остаётся одним из приоритетных направлений современной медицины. Среди известных методов анализа биологических жидкостей особое место занимают методы экспресс-диагностики различных патологических состояний по маркерам, обнаруживаемым в ротовой жидкости (РЖ). В данной статье представлен критический обзор последних разработок отечественных и зарубежных исследователей (проанализировано 56 источников), касающихся как уже существующих и широко применяемых, так и находящихся на стадии разработки устройств. Обсуждаются перспективы использования РЖ в качестве диагностической среды, а также различные методы быстрого определения маркеров патологических состояний. Приведены основные принципы, преимущества и недостатки иммунохроматографических тестов, электрохимического, микрофлюидного анализа, изотермической амплификации и устройств на основе смартфонов для экспресс-диагностики различных маркеров в РЖ.*

**Ключевые слова:** экспресс-диагностика; ротовая жидкость; метаболизм; биомаркеры; обзор.

**Для цитирования:** Колсанов А.В., Чаплыгин С.С., Соколов А.В., Власов М.Ю., Мьякишева Ю.В. Экспресс-методы определения показателей метаболизма в ротовой жидкости. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2018; 63 (8): 489-495. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-489-495>

*Kolsanov A.V., Chaplygin S.S., Sokolov A.V., Vlasov M.Yu., Myakisheva Yu.V.*

EXPRESS METHODS FOR DETECTION THE INDICATORS OF METABOLISM IN THE ORAL LIQUID (A REVIEW)

Samara State Medical University, 443099, Russia, Samara

*The search for new ways to diagnose diseases of different etiologies and their introduction into practical health care remains one of the priority areas of modern medicine. Among the known methods for the analysis of biological fluids, a special place is occupied by the methods of express diagnostics of various pathological conditions by markers found in the oral fluid. This article presents a critical review of the latest developments of domestic and foreign researchers (56 sources are analyzed) concerning both existing and widely used devices and those that are at the development stage. The prospects of using oral fluid as a diagnostic medium, as well as various methods for the rapid detection of markers of pathological conditions, are discussed. The main principles, advantages and disadvantages of immunochromatographic tests, electrochemical, microfluidic analysis, isothermal amplification, and devices based on smartphones for express diagnostics of various markers in oral fluid are presented.*

**Key words:** express diagnostics, oral fluid, metabolism, biomarkers, review

**For correspondence:** Myakisheva Yu.V., Head of the Department of Medical Biology, Genetics and Ecology, MD, Associate Professor, e-mail: [myakisheva@yandex.ru](mailto:myakisheva@yandex.ru)

**For citation:** *Kolsanov A.V., Chaplygin S.S., Sokolov A.V., Vlasov M.Yu., Myakisheva Yu.V. Express METHODS FOR DETECTION THE INDICATORS OF METABOLISM IN THE ORAL LIQUID (A REVIEW). Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (8): 489-495 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-489-495>*

**Для корреспонденции:** Мьякишева Юлия Валерьевна, д-р мед. наук, доц., зав. каф. мед. биологии, генетики и экологии; e-mail: [myakisheva@yandex.ru](mailto:myakisheva@yandex.ru)

**Information about authors:**

Kolsanov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4144-7090>  
Chaplygin S.S., <http://orcid.org/0000-0002-9027-6670>  
Sokolov A.V., <http://orcid.org/0000-0003-4965-3136>  
Vlasov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4995-5839>  
Myakisheva Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-0947-511X>

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

**Acknowledgment.** *The study had no sponsorship.*

Received 13.03.2018

Accepted 13.04.2018

**Введение.** Разработка быстрых, неинвазивных и недорогих способов определения инфекционных заболеваний и критических состояний организма является одним из важных направлений в развитии экспресс-диагностики, основанной на анализе маркёров непосредственно у постели пациента. С растущим потенциалом развития данного направления Всемирная организация здравоохранения представила основополагающие критерии, согласно которым проектируемые устройства должны быть доступными, чувствительными, специфичными, удобными для пользователя, без сложного оборудования, быстрыми и надёжными. Время проведения исследования и получения результата с помощью таких устройств должно составлять не более 30 мин [1, 2].

Традиционный подход в тестировании ограничивается медицинской лабораторией, что влечёт за собой отправку образцов из стационаров в специализированные лаборатории (особенно в случае проведения редких и дорогостоящих анализов), а затем ожидание результатов несколько часов или дней, в течение которых лечение должно продолжаться без желаемой информации. Это привело к возникновению предпосылок для смещения проводимых анализов из централизованной лаборатории к анализам непосредственно у постели больного, что обусловлено стремлением врачей как можно быстрее получить результат и дать предварительную оценку состояния пациента.

Методы экспресс-диагностики позволяют диагностировать вне лаборатории некоторые патологические состояния организма в течение достаточно короткого промежутка времени. Особую ценность «быстрый анализ» приобретает в районах, где населению недоступна лабораторная служба из-за расстояний либо финансовых возможностей населения. Несомненным преимуществом является сокращение времени с момента постановки диагноза до начала лечения либо первой неотложной помощи. Для пациентов, особенно детей, первостепенным при сдаче анализа является минимальный риск заражения и отсутствие физического и эмоционального дискомфорта.

Сегодня экспресс-тесты рассматриваются как «простые» исследования, не требующие специальной подготовки и навыков. Однако при всей кажущейся простоте большая часть экспресс-тестов представляет собой высокотехнологичный продукт, созданный на основе современных представлений в области иммунологии и электрохимии. Актуальным также является вопрос о выборе диагностической среды для экспресс-определения показателей, характеризующих состояние обменных процессов в организме. Рассматриваются как традиционные, так и альтернативные биологические жидкости. В настоящее время в литературе накоплено достаточно данных, свидетельствующих о том, что РЖ является ценной диагностической средой, своеобразным индикатором, отражающим как локальное состояние ротовой полости, так отдельных систем организма. Установлено, что в РЖ содержится более 2000 пептидов и белков [3, 4] и с каждым годом спектр обнаруживаемых биомолекул дополняется. Среди большого количества биомолекул, присутствующих в РЖ,

многие являются маркёрами физиологических изменений состояния организма и находятся в плазме крови и слюне в корреляционных соотношениях.

Одним из основных ограничений использования РЖ является то, что по сравнению с сывороткой крови биомаркёры обычно присутствуют в ней в более низкой концентрации. Вследствие этого аналитические системы должны быть очень высокоточными и чувствительными. Таким образом, качественный анализ маркёров РЖ в настоящее время выполним, но количественная оценка данных параметров является реальной проблемой. Кроме того, наличие муцинов и продуктов жизнедеятельности клеток делает слюну сложной для работы биологической жидкостью [5]. В связи с этим особую ценность приобретают методы диагностики с использованием РЖ, не требующие предварительной обработки пробы. Известно, что некоторые биомолекулы синтезируются и секретируются исключительно слюнными железами и не имеют корреляции с уровнями в крови [6].

Главное преимущество диагностики РЖ по сравнению с отбором сыворотки крови – простое и неинвазивное взятие образцов для анализа. Экспресс-тесты существенно сокращают время проведения диагностических процедур и дают возможность принять экстренные меры по оказанию помощи пациенту. Исследование РЖ обеспечивает также повышенную экономическую эффективность и удобство. Всё чаще РЖ используется для психосоциальных исследований, включающих определение стероидных гормонов (кортизола), участники которых могут собирать несколько образцов, находясь в комфортной среде, исключающей воздействие стресса [7–9]. Неинвазивность и удобство получения позволяют использовать данную биологическую среду в исследованиях с участием детей. Взятие РЖ не требует подготовленного медицинского персонала и оборудования, снижен риск инфицирования медицинских работников, участвующих в обработке и анализе её параметров [10]. Данные биологические образцы можно хранить и транспортировать при температуре окружающей среды, что в целом позволяет уменьшить затраты на исследование.

Целью данной работы является анализ и обобщение современных научных сведений, приведённых в отечественных и зарубежных источниках, в базах данных PubMed-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), eLibrary (<https://elibrary.ru/>), посвящённых методам и инструментальному обеспечению экспресс-определения показателей метаболизма в РЖ.

**Методология взятия проб ротовой жидкости.** РЖ представляет собой смесь секрета слюнных желез, околодесневой жидкости (гингивальная кревикулярная жидкость), трансудата слизистой оболочки полости рта, слизи из носовой полости и глотки, микрофлоры полости рта и продуктов бактериального метаболизма [9]. В качестве диагностического образца в клинике РЖ имеет много преимуществ в плане взятия, хранения, транспортировки и преаналитической подготовки проб. РЖ не обладает свертываемостью, как кровь, за счёт чего её легче обрабатывать во время диагностических процедур, что уменьшает количество требуемых манипуляций.

Таблица 1

Способы взятия РЖ [4]

Тип РЖ	Метод взятия
Нестимулированная РЖ	<p><i>Накопление и сплевывание.</i> В течение 5 мин осуществляют накопление РЖ в ротовой полости. После этого примерно 5 мл сплевывают в пластиковый флакон или пробирку.</p> <p><i>Свободное слюнотечение.</i> РЖ в данном случае свободно стекает с нижней губы в пробирку до требуемого количества.</p> <p><i>Дренажное (абсорбция).</i> В ротовую полость, чаще всего под язык, на 1–2 мин помещают небольшой цилиндрический тампон, впитывающий РЖ. Затем тампон извлекается, помещается в специальную пробирку и центрифугируется, после чего РЖ используется для анализа.</p>
Стимулированная РЖ	<p>Для стимуляции слюноотделения испытуемому дают жевать воск, натуральные смолы. С этой же целью используют кристаллы лимонной кислоты либо ее 10% раствор, которые наносят на поверхность языка.</p>

Для взятия РЖ предлагаются различные способы и устройства [4, 5, 11, 12], которые можно классифицировать в зависимости от способа стимуляции слюноотделения. Стимулированную слюну обычно собирают путём индукции жевательного воздействия на парафиновый воск или жевательную резинку для увеличения скорости потока слюны. Очевидно, что этот метод, влияет на количество и pH слюны и обычно используется только у пациентов с затрудненной секрецией слюны, при ксеростомии, сахарном диабете, в старческом возрасте.

Общими процедурами перед взятием РЖ являются отказ от приёма пищи за 1 ч и полоскание ротовой полости дистиллированной водой в течение 1 мин. Дальнейшие процедуры описаны в табл. 1.

Для взятия нестимулированной РЖ путём сплевывания и свободного слюнотечения используют стерильные или нестерильные контейнеры. Слюна собирается без экзогенной стимуляции, и скорость её потока в основном зависит от степени гидратации. Наиболее распространёнными подходами к взятию нестимулированной слюны являются методы дренажного, сплевывания и свободного истечения. Независимо от используемого метода испытуемые тщательно промывают рот водой, чтобы избежать загрязнения пробы [5].

В работе W. Schramm и соавт. [13] описано устройство для взятия РЖ путём адсорбции. Это устройство состоит из целлюлозной прокладки, прикреплённой к пластмассовому стержню, который содержит индикаторный краситель, уведомляющий человека, собирающего образец, о том, что получено соответствующее количество образца. Прокладка помещается в рот пациента сублингвально, пока индикаторная панель не станет синей. Это происходит, когда впитывается около 1 мл образца. Устройство далее помещают в трубку, содержащую модифицированный фосфатный буфер с физиологическим pH, азидом натрия и неионным детергентом. Слюна обрабатывается (экстрагируется из оставшегося целлюлозного материала и смешивается с буфером) с помощью поршневого фильтра, который вручную вдавливается в трубку.

Так получают около 1 мл прозрачного раствора, состоящего примерно из равных объёмов слюны и буфера.

Имеются сведения о зависимости значений аналитических характеристики РЖ от метода её взятия. Так, исследование T. Robles и соавт. [14] показало, что активность альфа-амилазы слюны сохранялась в пределах физиологических значений даже после промежуточных этапов обработки (замораживания, оттаивания, центрифугирования) при получении РЖ методом пассивного слюнотечения.

Одним из преимуществ РЖ является возможность её длительного хранения. Показано, что слюна стабильна 5 дней при комнатной температуре, но может храниться в течение более длительного времени при температуре от 4 до -20°C [15]. С целью проведения более точной количественной оценки маркеров в РЖ и исключения влияния муцинов на результаты анализа для её первичной обработки используют буферные растворы, содержащие муколитические ферменты [11].

На сегодняшний день для исследования показателей в РЖ используются различные методы (табл. 2).

*Методы иммунной хроматографии.* Иммунный хроматографический анализ (ИХА) основан на реакции антиген-антитело при движении жидкости под воздействием капиллярных сил по тонкой абсорбирующей полосе из нитроцеллюлозы, на которую наносятся специфические видовые антитела или антигены в комплексе с красителем, которым являются наночастицы коллоидного золота [16, 17].

Иммунохроматографические экспресс-тесты, являются наиболее распространёнными и востребованными на сегодняшний день. Самое широкое применение находят тест-системы для определения ВИЧ в околодесневой жидкости и слюне [13, 18–20], гепатита С (анти-НСV) в слюне [21], наркотических [22] и лекарственных веществ [23], а также *Helicobacter pylori* в РЖ [24]. В целом, основной тенденцией в экспресс-диагностике инфекционных заболеваний является использование новых перспективных методов молекулярной биологии с применением тестирования неинвазивных биосред на портативных устройствах [2].

Наиболее часто для тестирования околодесневой жидкости на ВИЧ и гепатит С применяются тест-полоски, позволяющие получить результат в течение 20–30 мин. В исследованиях M. Jaspard и соавт. [25] показано, что чувствительность и специфичность иммунохроматографического анализа (ИХА) на ВИЧ в капиллярной крови выше, чем аналогичный показатель для тестов околодесневой жидкости. Однако малозатратные технологии для диагностики и мониторинга ВИЧ являются основным предметом текущих исследований в сфере здравоохранения. Учитывая значительную потребность в расширении доступа к недорогим способам мониторинга ВИЧ в сельских районах, была проделана большая работа в развитии технологий экспресс-диагностики, которые доступны по цене, эффективны, просты в использовании, мобильны и обеспечивают достаточную точность количественных данных, необходимых для принятия клинических решений. Данные преимущества и особенности применения недорогих тестов для диагностики и мониторинга ВИЧ-инфекции в условиях ограниченных ресурсов представлены в обзорной статье [1]. Кроме того, по данным N. Rakesh и соавт. [26] образцы слюны можно использовать для тестирования на ВИЧ с помощью диагностических наборов для сыровотки и

Таблица 2

Методы определения показателей в РЖ

Метод	Принцип	Исследуемые показатели РЖ
Иммунная хроматография	Реакция комплекса антиген-антитело с красителем на нитроцеллюлозном носителе	Антитела и антигены к ВИЧ 1 и 2 типов; гепатит С, корь и другие инфекционные маркеры; матриксные металлопротеиназы
Электрохимия	Электрохимическая реакция	Глюкоза, α-амилаза, иммуноглобулины

цельной крови. В работе L. Warrener и соавт. [27] предложен экспресс-тест для диагностики кори. Отмечено, что внедрение разработанной тест-системы в глобальных программах борьбы с корью требует дальнейших исследований.

Тестирование на наркотические вещества широко применяется при проведении предварительных и периодических медицинских осмотров. При определении наркотических веществ в РЖ, как правило, в корпус устройства помещаются хроматографические полоски для определения 3–5 анализов. Большинство доступных устройств для тестирования РЖ могут обнаруживать метамфетамин, амфетамины и опиаты, с меньшей точностью – кокаин и каннабиноиды [22], а также лекарственные препараты [23]. В судебной медицине используется простой ИХА-тест на наличие РЖ в исследуемом образце по качественной реакции на  $\alpha$ -амилазу [28].

*Электрохимические методы.* Данные методы определения молекул в исследуемом образце основаны на распознавании характерного электрического сигнала, который появляется в ходе химической реакции. Наиболее часто используются тест-полоски с нанесёнными на них реагентами и прибор, переводящий электрический сигнал в цифровую форму на экране. Принцип метода позволяет создавать ферментативные и неферментативные сенсоры для определения различных маркеров в РЖ. Так, с использованием электрохимического метода разработана простая в использовании автоматизированная система, обеспечивающая одновременное и точное обнаружение большого количества белков и нуклеиновых кислот в РЖ. Система может использоваться для экстренной диагностики заболеваний полости рта [29]. Появляются сообщения о потенциальных возможностях применения нанобиосенсоров для контроля по слюне гликемических отклонений у больных сахарным диабетом [30].

В обзоре S. Mishra и соавт. [31] приведены современные технологии и устройства, которые обнаруживают в слюне специфические биомаркеры, связанные с различными видами рака. Подробно рассмотрены характеристики методов обнаружения. Устройства разделены на 5 групп, в числе которых электрохимические и микрофлюидные методы.

Предложен электрохимический метод обнаружения в РЖ одного из психоактивных компонентов каннабиса – тетрагидроканнабинола, оказывающего, в частности, неблагоприятное влияние на способность вождения транспортных средств [32]. Разработан одноразовый датчик (печатный углеродный электрод) с нанесённым реагентом, который вступает во взаимодействие с наркотическим веществом с образованием продукта, обнаруживаемого хроноамперометрическим восстановлением. Специфичность датчиков к тетрагидроканнабинолу составила 99%, однако чувствительность – лишь 28%. Время реакции составило 30 с, а концентрация исследуемого вещества – 25–50 нг/мл. Авторы пришли к выводу о необходимости дальнейшей оптимизации формата анализа. Подобные тест-системы могут быть в первую очередь востребованными специалистами экстренных служб для подтверждения факта употребления водителями наркотических веществ.

Разработан новый высокочувствительный электрохимический иммуносенсор для простой и быстрой детекции антигена фактора некроза опухоли в РЖ и сыворотке крови. В качестве иммобилизационной матрицы электрода использован конъюгированный полимер поли(3-тиофен) уксусной кислоты, содержащий карбоксильные группы на своей поверхности, которые обеспечивают большую поверхность биологического распознавания. Иммуносенсор показал низкий предел обнаружения (3,7 мкг/мл), приемлемую специфичность и селективность [33].

Среди неферментативных сенсоров интерес представляют устройства для определения концентрации глюкозы [34, 35]. Исследование проводят с использованием колло-

идных наночастиц серебра, нанесённых на сульфид молибдена ( $\text{MoS}_2$ ). Простой в исполнении, обладающий высокой воспроизводимостью (97,5%), высокой чувствительностью, низким пределом обнаружения и высокой селективностью, данный биосенсор может обладать большим потенциалом для неинвазивного обнаружения глюкозы в различных биосредах организма человека, в том числе РЖ [34].

Однако производительность неферментативных электрохимических датчиков имеет недостатки в виде медленной кинетики электродов и низкой стабильности сигнала. G. Dutta и соавт. [36] сообщили о новом датчике на основе уникальной конкурентной схемы обнаружения с использованием метилевого синего, гидразина и платиновых наночастиц. В присутствии обнаруживаемого антигена поверхностно иммобилизованный метиленовый синий потребляет межфазный гидразин, тем самым уменьшая электроокисление гидразина на наночастицах платины. Таким образом, концентрация антигена прямо пропорциональна уменьшению электрохимического сигнала. Для доказательства концепции этот датчик использовался для обнаружения в РЖ богатого гистидином белка *Plasmodium falciparum*, важного биомаркера малярии. Показано, что биосенсор демонстрирует высокую специфичность и хорошую воспроизводимость, что делает его подходящим для многих исследований, включая неинвазивное диагностическое тестирование.

Впервые предложен высокочувствительный электрохимический иммуноанализ РЖ с целью диагностики целиакии [37]. Данный метод позволяет исключить проблемы, связанные с высокой вязкостью и низкой концентрацией антител IgA к трансглутаминазе в РЖ. Система детекции использует магнитные шарики, покрытые антигенами к трансглутаминазе, которые реагируют с антителами, присутствующими в образцах. В качестве метки использовано антитело против человеческого IgA, конъюгированное со щелочной фосфатазой. В качестве электрохимического преобразователя используется полоса из восьми намагниченных экранированных электродов. Исследование показало, что можно проводить скрининг целиакии с помощью быстрого, недорогого, чувствительного и неинвазивного метода, способного обнаруживать антитела к трансглутаминазе в РЖ. Это имеет принципиальное значение для скрининга большого количества пациентов, особенно в педиатрии.

*Изотермическая петлевая амплификация.* Данный метод позволяет проводить амплификацию ДНК в изотермических условиях без использования устройства для термоциклирования [38]. Высокий уровень специфичности обеспечивается использованием большего количества праймеров по сравнению с традиционной полимеразной цепной реакцией.

Разработана и протестирована одноразовая кассета для обнаружения нуклеиновых кислот, выделенных из патогенов [39]. В кассете использована одна реакционная камера для изотермической амплификации нуклеиновых кислот. Камера оснащена интегрированной проточной мембраной для изоляции, концентрации и очистки ДНК или РНК. Нуклеиновые кислоты, захваченные мембраной, непосредственно используются в качестве шаблонов для амплификации без элюирования, что упрощает управление потоком кассеты. Мембрана также служит для удаления ингибиторов, которые значительно уменьшают чувствительность обнаружения. Устройство снабжено внешним тонкоплёночным нагревателем. Процесс амплификации контролировался в реальном времени с помощью портативного компактного флуоресцентного считывателя. РНК ВИЧ подвергали обратной транскрипции и петлевой изотермической амплификации. При этом предел обнаружения составил менее 10 частиц ВИЧ в образцах РЖ. Авторы указывают на возможность модификации кассеты для обнаружения нуклеиновых кислот других патогенов не только в слюне, но в других жидкостях организма.

Z. Chen и соавт. [40] предложена система, состоящая из одноразового устройства и портативного блока с программным управлением, автоматически выполняющая все этапы анализа без вмешательства пользователя после первоначальной загрузки образцов и реагентов. Микрофлюидный картридж имеет несколько микроканалов, клапанов, насосов и резервуаров, которые изолируют вирусную РНК, проводят изотермическую амплификацию с участием обратной транскриптазы. Данная система способна обнаруживать антитела против ВИЧ, вирусную РНК в образце крови или РЖ, и может являться важным инструментом для борьбы с эпидемией ВИЧ.

Применение системы обратной изотермической амплификации для обнаружения арбовируса Зика в РЖ показало, что специфичность и чувствительность метода на порядок выше, чем у традиционной полимеразной реакции в реальном времени. Предел обнаружения образцов соответствовал таковому при использовании коммерческих наборов для экстракции нуклеиновой кислоты. Это позволило авторам разработать прийти к заключению о ценности данного метода для быстрой первичной диагностики вируса вне лаборатории [41]. N. Chotiwan и соавт. [42], а также M. Mauk и соавт. [43] предложили быстрое, чувствительное и недорогое обнаружение вируса Зика в слюне с использованием отдельных специфичных праймеров. Предел обнаружения может составлять всего 11 копий в пробе РЖ объёмом 30 мкл. Для изотермического проведения изотермической реакции амплификации без необходимости в электроэнергии использовался химически нагреваемый контейнер [42].

*Микрофлюидные методы.* Данное направление определения показателей в альтернативных биологических жидкостях является весьма перспективным, поскольку микрофлюидные системы оперируют очень малыми объёмами исследуемых проб (от микро- до нанолитров) в заданном ограниченном пространстве и интегрируются в недорогие, компактные приборы для экспресс-тестирования «на чипе» [31, 44, 45].

Микрофлюидные технологии, характеризующиеся манипуляциями с жидкостями в каналах с характерной длиной в десятки микрометров, обладают возможностями улучшения иммунологических анализов, которые могли бы преодолеть такие ограничения, как длительное время обработки, высокая стоимость, техническая сложность. Комбинация микрофлюидики и иммуноанализа может обнаруживать биомаркеры за короткий промежуток времени при значительном снижении объёмов реагентов и характеризуется низкими потребностями в энергии и более высокими уровнями интеграции и автоматизации по сравнению с традиционными подходами [46]. Пороги обнаружения биомаркеров в РЖ обычно находятся в фемто- и пиколярном диапазоне. Поэтому измерение в значительной степени зависит от высокотехнологичного, громоздкого и автоматизированного оборудования. Первые микрожидкостные устройства, способные измерять белковые биомаркеры в миниатюрных иммунологических анализах, обладали высокой чувствительностью и автоматизацией в компактном формате [44].

Описано устройство компактного оптического микрофлюидного биосенсора с высокочувствительными фотоприемниками, выполненными из гетероциклов полипифена- $C_{70}$  в качестве фотоактивного слоя. Биосенсор за короткое время с высокой специфичностью обнаружил интерлейкины 8, 1 $\beta$  и матриксную металлопротеиназу-8 в РЖ в пределах 80–120 мкг/л. Результаты измерения были статистически подтверждены результатами, полученными традиционными методами иммуноферментного анализа [47]. Представленный микрофлюидный биосенсор может быть эффективным инструментом для экспресс-диагностики и скрининга кардиоваскулярных, онкологических, системных заболеваний.

С целью непрерывного мониторинга уровня кортизола в РЖ во время циркадного цикла может использоваться диме-

тилсилоксановый иммуносенсор, в микрожидкостных каналах которого сорбируются антитела к кортизолу. Меченный пероксидазой кортизол измеряется по реакции фермента с субстратом – тетраметилбензидином. Количественную оценку проводят колориметрическим детектированием меченого кортизола путём оптического поглощения при 450 нм с использованием кремниевого фотодиода в качестве фотоприёмника [48].

Для определения неорганических метаболитов (тиоцианата, нитрита и нитрата) в РЖ разработан метод капиллярного электрофореза [49]. Селективное отделение данных веществ от других сосуществующих компонентов РЖ можно получить в течение 14 мин в буфере (pH 3,7) при напряжении разделения 18 кВ. Пределы количественного определения аналитов составили 10–16 нг/мл. По мнению авторов, метод представляет собой потенциальный инструмент быстрого неинвазивного анализа метаболитов оксида азота и цианида в РЖ.

С помощью микрофлюидных методов определены продукты жизнедеятельности *Helicobacter pylori* в РЖ. В устройстве используются органические красители с микрошариками ионообменной смолы.  $CO_2$  и  $NH_3$  реагируют с разными красителями, изменение окраски в микрожидкостной камере регистрируется с помощью оптического датчика [50].

*Экспресс-тестирование с помощью смартфона.* В последние годы ведутся разработки устройств, позволяющих провести персонализированный экспресс-анализ с применением смартфона. Данное направление обусловлено широким распространением устройства среди практически всех категорий населения. В этом отношении обнаружение отдельных аналитов РЖ методом «сухой химии» с последующей колориметрией бумажной тест-полоски в отражённом свете будет являться популярным, простым и недорогим способом. Несмотря на достаточное количество научных публикаций [51, 52], связанных с подобными биосенсорами, по-прежнему существуют проблемы низкой воспроизводимости, вызванной неоднородностью развития окраски, что приводит к низкому качеству анализа.

Разработан потенциометрический биосенсор на базе смартфонов для определения  $\alpha$ -амилазы РЖ как чувствительного показателя активности вегетативной нервной системы, являющегося перспективным неинвазивным биомаркером психического здоровья [53]. В систему измерения входит смартфон, имеющий приложение для обнаружения амилазы, потенциометрический ридер и чувствительный чип с предварительно загруженными реагентами. РЖ проникает в зону реакции, активность фермента приводит к превращению электронного медиатора  $Fe(CN)_6^{3-}$  в  $Fe(CN)_6^{4-}$ . Потенциал, измеренный считывателем на смартфоне, преобразуется в концентрацию  $\alpha$ -амилазы на основе калибровочной кривой. Активность фермента в образце слюны количественно анализируется в течение 5 мин. Полученные результаты согласовались с результатами, полученными с использованием эталонного метода, и коррелировали с психологическими состояниями обследуемых.

Предложен метод точного определения концентрации этилового спирта в РЖ путём колориметрии в устройстве на основе смартфона. Анализ гистограмм на основе канальной визуализации цветового пространства и насыщенности оттенка обеспечивает однозначное определение концентрации алкоголя в РЖ и соотношение её с концентрацией в крови. Данная технология может быть использована для проведения анализа изменения цвета и адаптирована к любому смартфону [54].

Используя технологию 3D-печати, A. Roda и соавт. [55] разработали одноразовый мини-картридж, который можно легко прототипировать, чтобы использовать любой смартфон или планшет в качестве портативного люминометра. В данном случае устройство обнаруживает хемиллюминесценцию, происходящую от фермент-связанных реакций в течение короткого промежутка времени (до 5 мин). В частности, для

определения концентрации лактата в РЖ с помощью данной тест-системы регистрировали хемилюминесценцию при взаимодействии лактат-оксидазы с пероксидазой хрена. Показано, что устройство на базе смартфона демонстрирует адекватную аналитическую производительность и может стать экономически эффективной альтернативой для неинвазивного измерения лактата у спортсменов и для мониторинга лактоацидоза при различных патологических состояниях [56].

**Заключение.** Разработка устройств для экспресс-определения биомаркеров в ротовой жидкости обеспечит их широкую доступность всем категориям населения, низкую стоимость, быстроту и удобство в использовании. Парадигма внедрения «быстрых тестов» смещается от непосредственной диагностики заболевания в сторону улучшения качества жизни в целом. Несмотря на многие исследования и разработки в отношении экспресс-тестов, полученные результаты являются преимущественно качественными или полуквантитетными и по-прежнему требуют совершенствования. Прежде всего это касается наиболее распространённых иммунохроматографических носителей. Для коммерческого внедрения и стабильного массового производства других устройств использование новейших технологий и снижение цены конечного продукта являются очень важными. Исследование биосенсоров проложит путь для их применения в персонализированной диагностике, что может в конечном итоге снизить заболеваемость и повысить качество жизни.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-17, 19-56 см. REFERENCES)

18. Царев В.Н., Шестакова И.В., Балмасова И.П. и др. Опыт применения экспресс-теста для определения антител к вирусу иммунодефицита человека в ротовой жидкости. *Стоматолог.* 2008; 2: 14 – 8.

#### REFERENCES

1. Wu G., Zaman M. Low-cost tools for diagnosing and monitoring HIV infection in low-resource settings. *Bull. World Health Organ.* 2012; 90: 914–20.
2. John A., Price C. Existing and emerging technologies for point-of-care testing. *Clin. Biochem. Rev.* 2014; 35(3): 155–67.
3. Bandhakavi S., Stone M.D., Onsongo G. et al. A dynamic range compression and three-dimensional peptide fractionation analysis platform expands proteome coverage and the diagnostic potential of whole saliva. *J. Proteome Res.* 2009; 8: 5590–600.
4. Khurshid Z., Zohaib S., Najeeb S. et al. Human saliva collection devices for proteomics: an update. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17: 846.
5. Lee Yu-H., Wong D.T. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *Am. J. Dent.* 2009; 22(4): 241–8.
6. Lazaro A.S., Mussavira S., Bindhu O.S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochemia Medica.* 2015; 25(2): 177–92.
7. Thorn L., Hucklebridge F., Evans P., Clow A. The cortisol awakening response, seasonality, stress and arousal: a study of trait and state influences. *Psychoneuroendocrinology.* 2009; 34: 299–306.
8. Stalder T., Evans P., Hucklebridge F., Clow A. Associations between psychosocial state variables and the cortisol awakening response in a single case study. *Psychoneuroendocrinology.* 2009; 35: 209–14.
9. Farnaud S., Kosti O., Getting S., Renshaw D. Saliva: Physiology and diagnostic potential in health and disease. *The Scientific World Journal.* 2010; 10: 434–56.
10. Srivastava N., Nayak P.A., Rana S. Point of care - a novel approach to periodontal diagnosis – a review. *J. Clin. Diagn. Res.* 2017; 11(8): ZE01–06.
11. Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent. Clin. N. Am.* 2011. 55: 159–78.
12. Yamaguchi M., Tezuka Y., Takeda K., Shetty V. Disposable collection kit for rapid and reliable collection of saliva. *Am. J. Hum. Biol.* 2015; 27(5): 720–3.

13. Schramm W., Angulo G. B., Torres P.C., Burgess-Cassler A. A Simple saliva-based test for detecting antibodies to human immunodeficiency virus. *Clin. Vaccine Immunol.* 1999; 6(4): 577–80.
14. Robles T.F., Sharma R., Harrell L. et al. Saliva sampling method affects performance of a salivary  $\alpha$ -amylase biosensor. *Am. J. Hum. Biol.* 2013; 25(6): 719–24.
15. Hodinka R. L., Nagashunmugam T., Malamud D. Detection of human immunodeficiency virus antibodies in oral fluids. *Clin. Vaccine Immunol.* 1998; 5(4): 419–26.
16. Murdock R.C., Shen L., Griffin D.K. et al. Optimization of a paper-based ELISA for a human performance biomarker. *Anal. Chem.* 2013; 85: 11634–42.
17. Johnson N., Ebersole J.L., Kryscio R.J. et al. Rapid assessment of salivary MMP-8 and periodontal disease using lateral flow immunoassay. *Oral Dis.* 2016; 22(7): 681–7.
18. Tsarev V.N., Shestakova I.V., Balmasova I.P. et al. Experience of using the rapid test to determine antibodies to the human immunodeficiency virus in the oral cavity. *Stomatolog.* 2008; 2: 14-8. (in Russian)
19. Jyoti B., Devi P. Detection of human immunodeficiency virus using oral mucosal transudate by rapid test. *Indian J. Sex. Transm. Dis.* 2013; 34(2): 95–101.
20. Gaydos C.A., Solis M., Hsieh Y.H. et al. Use of tablet-based kiosks in the emergency department to guide patient HIV self-testing with a point-of-care oral fluid test. *Int. J. STD AIDS.* 2013; 24(9): 716–21.
21. Visseaux B., Larrouy L., Calin R. et al. Anti-hepatitis C virus antibody detection in oral fluid: influence of human immunodeficiency virus co-infection. *J. Clin. Virol.* 2013; 58(2): 385–90.
22. Walsh J.M. New technology and new initiatives in U.S. workplace testing. *Forensic Sci. Int.* 2008; 174(2-3): 120–4.
23. Kuwayama K., Miyaguchi H., Yamamoto T. et al. Effectiveness of saliva and fingerprints as alternative specimens to urine and blood in forensic drug testing. *Drug. Test. Anal.* 2016; 8(7): 644–51.
24. Pellicano R., Vanni E., Palmas F. et al. Diagnosis of Helicobacter pylori infection: validation of a commercial noninvasive salivary test against urea breathe test and serology. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 2001; 47(3): 111–6.
25. Jaspard M., Le Moal G., Saberan-Roncato M. et al. Finger-stick whole blood HIV-1/2 home-use tests are more sensitive than oral fluid-based in-home HIV tests. *PLoS One.* 2014; 9(6): e101148.
26. Rakesh N., Shetty S., Sujatha S. et al. Assessment of the accuracy of whole blood/serum Point-of-care HIV three-dot test for oral fluid specimens. *Curr. HIV Res.* 2016; 14(4): 354–9.
27. Warren L., Slibinskas R., Chua K.B. et al. A point-of-care test for measles diagnosis: detection of measles-specific IgM antibodies and viral nucleic acid. *Bull. World Health Organ.* 2011; 89(9): 675–82.
28. Old J.B., Schweers B. A., Boonlayangoor P.W., Reich K.A. Developmental validation of RSIDTM-Saliva: a lateral flow immunochromatographic strip test for the forensic detection of saliva. *J. Forensic Sci.* 2009; 54(4): 866–73.
29. Soong R.K., Bachand G.D., Neves H.P. et al. Powering an inorganic nanodevice with a biomolecular motor. *Science.* 2000; 290: 1555–8.
30. Du Y., Zhang W., Wang M.L. An on-chip disposable salivary glucose sensor for diabetes control. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2016. 10(6): 1344–52.
31. Mishra S., Saadat D., Kwon O. et al. Recent advances in salivary cancer diagnostics enabled by biosensors and bioelectronics. *Biosens. Bioelectron.* 2016; 81: 181–97.
32. Wanklyn C., Burton D., Enston E. et al. Disposable screen-printed sensor for the electrochemical detection of delta-9-tetrahydrocannabinol in undiluted saliva. *Chem. Cent. J.* 2016; 10: eCollection 2016.
33. Aydin E.B., Aydin M., Sezgin M.K. A highly sensitive immunosensor based on ITO thin films covered by a new semi-conductive conjugated polymer for the determination of TNF $\alpha$  in human saliva and serum samples. *Biosens. Bioelectron.* 2017; 97: 169–76.
34. Anderson K., Poulter B., Dudgeon J. et al. A highly sensitive nonenzymatic glucose biosensor based on the regulatory effect of glucose on electrochemical behaviors of colloidal silver nanoparticles on MoS $_2$ . *Sensors (Basel).* 2017; 17(8): pii: E1807.
35. Du Y., Zhang W., Wang M.L. An on-chip disposable salivary glucose sensor for diabetes control. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2016; 10(6): 1344–52.
36. Dutta G., Nagarajan S., Lapidus L.J., Lillehoj P.B. Enzyme-free electrochemical immunosensor based on methylene blue and the

- electro-oxidation of hydrazine on Pt nanoparticles. *Biosens Bioelectron.* 2017; 92: 372–7.
37. Adornetto G., Fabiani L., Volpe G. et al. An electrochemical immunoassay for the screening of celiac disease in saliva samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015; 407(23): 7189–96.
  38. Gill P., Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies – a review. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2008; 27: 224–43.
  39. Liu C., Geva E., Mauk M. et al. An isothermal amplification reactor with an integrated isolation membrane for point-of-care detection of infectious diseases. *Analyst.* 2011; 136(10): 2069–76.
  40. Chen Z., Zhu H., Malamud D. et al. A rapid, self-confirming assay for HIV: simultaneous detection of anti-HIV antibodies and viral RNA. *J. AIDS Clin. Res.* 2016; pii: 540.
  41. Wang X., Yin F., Bi Y. et al. Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods.* 2016; 238: 86–93.
  42. Chotiwan N., Brewster C.D., Magalhaes T. et al. Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. *Sci Transl Med.* 2017; 9(388): pii: eaag0538.
  43. Mauk M.G., Song J., Bau H.H., Liu C. Point-of-care molecular test for Zika infection. *Clin. Lab. Int.* 2017; 41: 25–7.
  44. Barbosa A.I., Reis N.M. A critical insight into the development pipeline of microfluidic immunoassay devices for the sensitive quantitation of protein biomarkers at the point of care. *Analyst.* 2017; P. 142(6): 858–82.
  45. Morbioli G.G., Mazzu-Nascimento T., Stockton A.M., Carrilho E. Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices ( $\mu$ PADs) – a review. *Analytica Chimica Acta.* 2017; 970: 1–22.
  46. Mou L., Jiang X. Materials for microfluidic immunoassays: a review. *Adv. Healthc. Mater.* 2017; 6(15): 1601403.
  47. Dong T., Pires N.M.M. Immunodetection of salivary biomarkers by an optical microfluidic biosensor with polyethylenimine-modified polythiophene-C70 organic photodetectors. *Biosens. Bioelectron.* 2017; 94: 321–7.
  48. Pinto V., Sousa P., Catarino S.O., Correia-Neves M., Minas G. Microfluidic immunosensor for rapid and highly-sensitive salivary cortisol quantification. *Biosens Bioelectron.* 2017; 90: 308–13.
  49. Guo L., Wang Y., Zheng Y., et al. Study on the potential application of salivary inorganic anions in clinical diagnosis by capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2016; 1014: 70–4.
  50. Zilberman Y., Sonkusale S.R. Microfluidic optoelectronic sensor for salivary diagnostics of stomach cancer. *Biosens. Bioelectron.* 2015; 67: 465–71.
  51. Oncescu V., O'Dell D., Erickson D. Smartphone based health accessory for colorimetric detection of biomarkers in sweat and saliva. *Lab. Chip.* 2013; 13(16): 3232–8.
  52. Carrio A., Sampedro C., Sanchez-Lopez J.L. et al. Automated low-cost smartphone-based lateral flow saliva test reader for drugs-of-abuse detection. *Sensors (Basel).* 2015; 15(11): 29569–93.
  53. Zhang D, Liu Q. Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection. *Biosens. Bioelectron.* 2016; 75: 273–84.
  54. Jung Y., Kim J., Awofeso O. et al. Smartphone-based colorimetric analysis for detection of saliva alcohol concentration. *Appl. Opt.* 2015; 54(31): 9183–9.
  55. Roda A., Guardigli M., Calabria D. et al. A 3D-printed device for a smartphone-based chemiluminescence biosensor for lactate in oral fluid and sweat. *Analyst.* 2014; 139(24): 6494–501.
  56. Calabria D., Caliceti C., Zangheri M., et al. Smartphone-based enzymatic biosensor for oral fluid L-lactate detection in one minute using confined multilayer paper reflectometry. *Biosens. Bioelectron.* 2017; 94: 124–30.

Поступила 13.03.18

Принята к печати 13.04.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.12-008.331.1-092:612.67.06:612.015.3

Булгакова С.В., Гусякова О.А., Тренева Е.В., Захарова Н.О., Николаева А.В.

## ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА НА ТЕМП СТАРЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИЕЙ

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

В настоящее время атеросклероз всё чаще позиционируется как естественный наследственно-детерминированный процесс, определяющий темп старения организма и продолжительность жизни. Цель исследования – изучить корреляционные взаимосвязи между показателями липидного профиля и темпом старения мужчин с артериальной гипертензией (АГ). Нами проведено одномоментное исследование 123 пациентов мужского пола (средний возраст  $52,4 \pm 0,6$  года). Основную группу (I) составили пациенты с АГ II стадии высокого риска, контрольную (II) группу – 60 пациентов без клинико-инструментальных признаков сердечно-сосудистой патологии. Исследование липидного профиля осуществлялось на биохимическом автоанализаторе Hitastar 600 («Hitan GmbH», Германия) с изучением общего холестерина (ОХС), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), триглицеридов (ТГ), также проводился расчет коэффициента атерогенности (КА). Темп старения определялся на основании интегральной оценки биологического возраста (БВ) с использованием методики Киевского НИИ геронтологии. У пациентов с АГ прямая корреляционная зависимость умеренной силы между БВ и липидным обменом прослеживается с показателями ОХС ( $r = 0,364$ ;  $p = 0,003$ ), ЛПНП ( $r = 0,359$ ;  $p = 0,004$ ), ТГ ( $r = 0,324$ ;  $p = 0,010$ ) и КА ( $r = 0,488$ ;  $p < 0,001$ ). Обратная корреляционная связь отмечается с ЛПВП ( $-0,446$ ;  $p < 0,001$ ). У пациентов группы контроля прямая корреляционная зависимость умеренной силы БВ и липидного спектра отмечается также для атерогенных фракций липопротеидов и КА, обратная связь – для ЛПВП ( $-0,623$ ;  $p < 0,001$ ). На основании проведённого математического моделирования были составлены формулы для определения БВ рассмотренных групп пациентов с учётом показателей липидного профиля. Выполненный нами корреляционный анализ отражает вклад дислипидемии в развитие преждевременного старения организма, а математическое моделирование позволяет с помощью показателей липидного обмена проводить диагностику ускоренного старения пациентов.

Ключевые слова: липидный профиль; артериальная гипертензия; биологический возраст; ускоренное старение.

Для корреспонденции: Тренева Екатерина Вячеславовна, канд. мед. наук, ассистент кафедры гериатрии и возрастной эндокринологии; e-mail: eka1006@yandex.ru

**Для цитирования:** Булгакова С.В., Гусякова О.А., Тренева Е.В., Захарова Н.О., Николаева А.В. Влияние липидного обмена на темп старения пациентов с артериальной гипертензией. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (8): 495-499. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-495-499>

*Bulgakova S.V., Gusyakova O.A., Treneva E.V., Zakharova N.O., Nikolaeva A.V.*

#### THE IMPACT OF LIPID METABOLISM ON THE RATE OF AGING OF PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

*Now atherosclerosis is even more often positioned as the natural hereditary determined process determining the rate of aging of an organism and life expectancy. Research objective: to study correlation interrelations between indicators of a lipidic profile and rate of aging of men with an arterial hypertension. We have conducted a one-stage research of 123 male patients (middle age 52,4±0,60 years). The main group (I) was made by patients with the arterial hypertension (AH) of the II stage of high risk. The control (II) group was made by 60 patients without kliniko-tool symptoms of cardiovascular pathology. The research of a lipid profile was conducted on the biochemical autoanalyzer «Humastar 600» (Human GMBH, Germany) with studying of the general cholesterol (OHS), lipoproteid of the low density (LDL), lipoproteid of the high density (LPVP), triglycerides (TG), calculation of the aterogenost coefficient (AC) was also carried out. Rate of aging decided on the basis of integrated assessment of the biological age (BA) on use of a technique of the Kiev Scientific Research Institute Gerontology.*

*Patients with AG have a direct correlation dependence of moderate force between biological age and lipid exchange traces with OHS indicators ( $r=0,364$ ,  $p=0,003$ ), LDL ( $r=0,359$ ,  $p=0,004$ ), TG ( $r=0,324$ ,  $p=0,010$ ) and KA ( $r=0,488$ ,  $p<0,001$ ). The return correlation communication is noted with LPVP ( $-0,446$ ,  $p<0,001$ ). Patients have groups of control the direct correlation dependence of moderate force of BV and lipidic range is noted also for atherogenous fractions of lipoproteid and KA, feedback - for LPVP ( $-0,623$ ,  $p<0,001$ ).*

*On the basis of the carried-out mathematical modeling formulas for determination of biological age of the considered groups of patients taking into account indicators of a lipidic profile have been made. The correlation analysis which is carried out by us reflects a dislipidemiya contribution to development of the accelerated aging of an organism, and the executed mathematical modeling allows to carry out diagnostics of the accelerated aging of patients by means of indicators of lipid exchange.*

**Key words:** lipid profile; arterial hypertension; biological age; the accelerated aging.

**For citation:** *Bulgakova S.V., Gusyakova O.A., Treneva E.V., Zakharova N.O., Nikolaeva A.V. The impact of lipid metabolism on the rate of aging of patients with arterial hypertension. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (8): 495-499 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-495-499>*

**For correspondence:** *Treneva E.V.*, Ph.D. (Medicine), assistant of the chair of geriatrics and age-related endocrinology SamSMU, e-mail: [eka1006@yandex.ru](mailto:eka1006@yandex.ru)

#### Information about authors:

Bulgakova S.V., <http://orcid.org/0000-0003-0027-1786>  
Gusyakova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5619-4583>  
Treneva E.V., <http://orcid.org/0000-0003-0097-7252>  
Zakharova N.O., <http://orcid.org/0000-0001-7501-830X>  
Nikolaeva A.V. <http://orcid.org/0000-0002-3938-2777>

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

**Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

Received 10.05.2018  
Accepted 25.05.2018

Старение представляет собой генетически детерминированный биологический процесс, отражающий развитие живого организма во времени. Согласно существующей аккумуляционной модели старения, основная роль в нём отводится повреждающему действию продуктов метаболических реакций и процессов перекисного окисления липидов. В настоящее время именно атеросклероз всё чаще позиционируется как естественный наследственно-детерминированный процесс, определяющий темп старения организма и продолжительность жизни [1]. Кроме того, имеются данные о влиянии гиперлипидемии на капиллярный кровоток и агрегационную способность форменных элементов, способствующих ухудшению микроциркуляции в тканях. Следствием указанных нарушений является развитие тканевой гипоксии, являющейся одним из универсальных патологических процессов, в основе которого лежит недостаточность процессов митохондриального окислительного фосфорилирования, что ведёт к активизации свободнорадикального окисления в клетке [2]. В свою очередь нарушения липидного обмена представляют собой предикторы

развития сердечно-сосудистых заболеваний [3]. Заболевания системы кровообращения сами по себе носят возрастассоциированный характер, а артериальная гипертензия (АГ) – одно из самых распространённых сердечно-сосудистых заболеваний в мире и наиболее значимая причина инвалидизации и летальных исходов у лиц трудоспособного возраста, причём показатель смертности среди мужчин среднего возраста от сосудистых катастроф превышает таковой у женщин [4]. АГ независимо от её генеза характеризуется многообразными изменениями в структуре и функции клеточных мембран, что часто ассоциируется со значительными изменениями, включающими и нарушение метаболизма липидов [5].

Необходимость активной профилактики и ранней диагностики сердечно-сосудистых заболеваний диктует многоплановое и тщательное изучение различных факторов риска, связанных с развитием сосудистого старения, определяющего темп старения организма и продолжительность жизни в целом [6]. В связи с этим исследование влияния классических факторов риска на скорость биологического старения

и поиск новых биомаркёров старения является актуальной задачей геронтологических исследований, решение которой позволит своевременно проводить лечебно-профилактические мероприятия с целью увеличения продолжительности жизни населения, снизить риски и частоту возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений.

Цель исследования – изучить корреляционные взаимосвязи между показателями липидного профиля и темпом старения мужчин с АГ.

**Материал и методы.** Проведено одномоментное исследование 123 пациентов мужского пола (средний возраст  $52,4 \pm 0,6$  года). Основную группу (I) составили пациенты с АГ II стадии высокого риска, проходившие обследование и лечение в ГБУЗ «Самарский областной клинический госпиталь для ветеранов войн», ГБУЗ «Самарский областной гериатрический центр». В предшествующий обследованию месяц гипотензивных, антиагрегантных, липидснижающих препаратов по самостоятельному решению систематически больные не принимали, однако не исключался эпизодический приём гипотензивных препаратов короткого действия (каптоприл 25 мг, метопролола сулцинат 25–50 мг).

Критерии исключения: симптоматическая АГ, клинически выраженный атеросклероз, пороки сердца, острое нарушение мозгового кровообращения и инфаркт миокарда в анамнезе, хроническая сердечная недостаточность, нарушения ритма и проводимости, а также сопутствующая патология внутренних органов, которая могла существенным образом повлиять на прогноз пациентов (почечная и печёночная недостаточность, заболевания щитовидной железы, сахарный диабет, системные заболевания соединительной ткани, онкологические заболевания, бронхиальная астма, психические и гематологические заболевания). В исследование также не включались пациенты, страдающие алкогольной и никотиновой зависимостью.

В программу исследования входило изучение жалоб, сбор анамнеза заболевания, данных объективного осмотра, лабораторных и инструментальных методов исследования. Для исключения случайных колебаний артериального давления (АД) была стандартизована процедура измерения в соответствии с современными рекомендациями [7]. Регистрацию электрокардиограммы выполняли в 12 общепринятых отведениях (электрокардиограф Schiller Cardiovit AT-101, Швейцария).

Диагноз АГ установлен на основании критериев

диагностики, принятых ВОЗ совместно с Международным обществом гипертензии (NHO-ISH) с учётом рекомендаций экспертов Научного общества по изучению артериальной гипертензии Всероссийского научного общества кардиологов и Межведомственного совета по сердечно-сосудистым заболеваниям [7]. У больных обнаружено поражение органов-мишеней в виде гипертрофии миокарда левого желудочка, подтверждённой перкуторно, электрокардиографически и эхокардиографически.

Контрольную (II) группу составили 60 пациентов, средний возраст  $51,7 \pm 0,34$  года, без клинико-инструментальных признаков сердечно-сосудистой патологии.

Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Липидный профиль исследовали на биохимическом анализаторе Humastar 600 («Human GmbH», Германия) с оценкой уровня общего холестерина (ОХС), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), триглицеридов (ТГ), также проводился расчёт коэффициента атерогенности (КА).

Темп старения определяли на основании интегральной оценки биологического возраста (БВ) с использованием методики Киевского НИИ геронтологии с учётом параметров САД (в мм рт. ст.), продолжительности задержки дыхания после глубокого вдоха (в с), статической балансировки (в с), субъективной оценки здоровья (в баллах) [8]. Темп старения считался замедленным, если БВ был меньше календарного (КВ) (-3–7, 9 лет – II функциональный класс (ФК) старения, -8 и более лет – I ФК старения), физиологическим, если разница между БВ и КВ была в диапазоне от -2,9 до +2,9 года, ускоренным при опережении биологическим возрастом календарного (более чем на 3 года – IV ФК старения и более чем на 8 лет – V ФК старения). В исследования включались пациенты с ускоренным темпом старения: БВ пациентов превышал календарный на  $7,82 \pm 0,59$  года ( $p_{KB-БВ} < 0,001$ ).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программного пакета SPSS 21 (лицензия № 20130626-3). Оценку закона распределения признаков выполняли с помощью критериев  $\chi^2$  с поправкой Лиллиефорса и Шапиро – Уилка. Для анализа качественных или номинальных данных строили таблицы сопряжённости и рассчитывали критерий  $\chi^2$ . Анализ взаимосвязей проводился с помощью определения коэффициентов ранговой корреляции

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов

Показатель	Основная группа (n = 63)	Контрольная группа (n = 60)
Календарный возраст, годы	$52,4 \pm 0,60$	$51,7 \pm 0,34$
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	$28,12 \pm 0,32$	$26,31 \pm 0,52$
САД, мм рт. ст	$157,23 \pm 1,24$	$118,71 \pm 1,13$
ДАД, мм рт. ст	$98,42 \pm 1,76$	$76,20 \pm 1,14$
ПАД, мм рт. ст	$61,87 \pm 0,76$	$40,32 \pm 0,59$

Примечание. САД – систолическое артериальное давление; ДАД – диастолическое артериальное давление; ПАД – пульсовое артериальное давление.

Таблица 2

Результаты исследования липидного профиля

Показатель	Основная группа (n = 63)	Контрольная группа (n = 60)	Достоверность различий
ОХС, ммоль/л	$5,82 \pm 0,11$	$4,78 \pm 0,06$	$p_{1,2} = 0,001$
ЛПНП, ммоль/л	$3,85 \pm 0,07$	$2,90 \pm 0,04$	$p_{1,2} = 0,004$
ЛПВП, ммоль/л	$0,86 \pm 0,03$	$1,19 \pm 0,05$	$p_{1,2} < 0,001$
ТГ, ммоль/л	$2,27 \pm 0,08$	$1,47 \pm 0,03$	$p_{1,2} = 0,003$
КА	$4,76 \pm 0,24$	$3,34 \pm 0,18$	$p_{1,2} = 0,006$

Таблица 3

Показатели биологического возраста в исследуемых группах			
Показатель	Основная группа (n = 63)	Контрольная группа (n = 60)	Достоверность различий
КВ, годы	52,4 ± 0,60	51,7 ± 0,34	$p_{1-2} = 0,722$
БВ, годы	59,1 ± 0,67	52,11 ± 0,81	$p_{1-2} < 0,001$
рКВ-БВ	< 0,001	0,732	Достоверность внутригрупповая
БВ-КВ, годы	6,71 ± 0,49	0,41 ± 0,58	$p_{1-2} < 0,001$

Таблица 4

Корреляционный анализ показателей биологического старения и липидного обмена

Показатель	Основная группа (n = 63)	Контрольная группа (n = 60)
	БВ, годы, r (p)	
ОХС, ммоль/л	0,364 (0,003)	0,498 (< 0,001)
ЛПНП, ммоль/л	0,359 (0,004)	0,511 (< 0,001)
ЛПВП, ммоль/л	-0,446 (< 0,001)	-0,623 (< 0,001)
ТГ, ммоль/л	0,324 (0,010)	0,318 (0,013)
КА, ед.	0,488 (< 0,001)	0,641 (< 0,001)

Спирмена. Критическое значение уровня значимости при всех видах статистического анализа принимали равным 0,05.

**Результаты.** При обследовании дислипидемия была выявлена у 71,2% пациентов основной группы и у 26% исследуемых группы контроля. Результаты изучения липидного спектра представлены в табл. 2. У пациентов с АГ отмечается достоверное повышение атерогенных фракций липидов: ОХС на 21,75%, ЛПНП на 32,75%, ТГ на 54,42%, КА на 42,51% по сравнению с контрольной группой. Снижение ЛПВП на 27,73% у пациентов основной группы по сравнению с контролем также является неблагоприятным фактором в прогнозе прогрессирования сердечно-сосудистой патологии.

При исследовании темпов старения мужчин среднего возраста получены результаты, представленные в табл. 3. Несмотря на отсутствие достоверных различий в КВ между исследуемыми группами, статистически значимые различия отмечаются в БВ мужчин. У пациентов основной группы БВ достоверно превышает значения соответствующего параметра группы контроля на 13,4% ( $p_{1-2} < 0,001$ ). Также БВ основной группы достоверно опережает календарный на 12,8% ( $p < 0,001$ ), что говорит об ускорении темпов старения в группе пациентов с АГ и определяет IV функциональный класс старения.

С целью поиска новых биологических маркеров старения в работе определена корреляционная связь между показателями биологического старения и изученными параметрами липидного обмена. Анализ взаимосвязей проводился посредством определения коэффициентов ранговой корреляции Спирмена. В табл. 4 представлены только достоверные результаты.

Корреляционный анализ показателей липидного профиля и биологических возрастов у обследованных пациентов выявил следующие особенности. В группе пациентов с АГ прямая корреляционная зависимость

умеренной силы между БВ и липидным обменом прослеживается с показателями ОХС ( $r = 0,364$ ;  $p = 0,003$ ), ЛПНП ( $r = 0,359$ ;  $p = 0,004$ ), ТГ ( $r = 0,324$ ;  $p = 0,010$ ) и КА ( $r = 0,488$ ;  $p < 0,001$ ). Обратная корреляционная связь отмечается с ЛПВП ( $-0,446$ ;  $p < 0,001$ ).

У пациентов группы контроля прямая корреляционная зависимость умеренной силы БВ и липидного спектра отмечается также для атерогенных фракций липопротеидов и КА, обратная связь – для ЛПВП ( $-0,623$ ;  $p < 0,001$ ).

На основании математического моделирования были составлены формулы для определения БВ пациентов рассмотренных групп с учётом показателей липидного профиля.

БВ группы контроля =  $43,4 + 2,6 \cdot \text{КА}$ ;

БВ основной группы =  $58,4 + 1,6 \cdot \text{ЛПНП} - 5,5 \cdot \text{ЛПВП} + 1,13 \cdot \text{ТГ}$ .

**Обсуждение.** В проведённых ранее исследованиях показано, что нейроэндокринные изменения при АГ, связанные с интенсификацией адренергических влияний, являются важным триггерным фактором ускоренного развития гиперлипидемии, атеросклеротического процесса и связанных с ними заболеваний сердечно-сосудистой системы [9, 10]. Подобная гиперпродукция холестерина рассматривается как компенсаторная реакция, направленная на сдерживание перекисного окисления липидов, так как при гиперхолестеринемии облегчается включение холестерина в мембраны клеток, способствующее их стабилизации [1]. Учитывая характер дислипидемий у пациентов основной группы, ассоциированный с развитием атеросклероза коронарных и церебральных артерий, а также роль ускоренного старения в развитии метаболических нарушений, следует особенно тщательно осуществлять контроль и коррекцию липидного профиля у мужчин с АГ.

Полученные нами данные не противоречат результатам, опубликованным отечественными и зарубежными учёными при исследовании темпов старения лиц зрелого возраста, страдающих АГ [11, 12].

Разработанные нами формулы имеют достоверный коэффициент корреляции с КВ, что свидетельствует о возможности использования данной модели БВ для оценки скорости развития возрастных изменений у мужчин среднего возраста в норме и при наличии АГ.

Таким образом, выполненное нами исследование свидетельствует о том, что АГ ассоциируется со значительными патологическими изменениями в организме, включающими и нарушение липидного обмена. Дислипидемия способствует развитию тканевой гипоксии, активизирующей свободнорадикальное окисление в клетке. Формирующийся патогенетический круг запускает процессы ускоренного старения организма.

**Заключение.** Проведённый нами корреляционный анализ отражает вклад дислипидемии в развитие преждевременного старения организма, а выполненное математическое моделирование позволяет с помощью показателей липидного обмена проводить диагностику ускоренного старения пациентов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп.1, 12 см. REFERENCES)

2. Чернышева Е.Н., Панова Т.Н., Донская М.Г. Программируемая клеточная гибель и процессы свободнорадикального окисления липидов в рамках метаболического синдрома. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2013; 9(2): 277-81.
3. Торгашев М.Н., Мякотных В.С., Пальцев А.И. Возрастные аспекты выраженности нарушений липидного обмена и посттравматического стрессового расстройства у ветеранов современных боевых действий. *Успехи геронтологии*. 2013; 26(3): 525-32.
4. Оганов Р.Г., Концевая А.В., Калинина А.М. Экономический ущерб от сердечно - сосудистых заболеваний в Российской Федерации. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2011; 10 (4): 4-9.
5. Маковеева Е.А. Индекс атерогенности как интегральный показатель поражения органа-мишени (сердца) при гипертонической болезни. *Universum: Медицина и фармакология: электронный научный журнал*. 2013; 1(1).
6. Синкевич Д.А., Протасов К.В., Дзизинский А.А. Концепция «сосудистого возраста» как новый подход к оценке сердечно-сосудистого риска. *Сибирский медицинский журнал*. 2011;6: 9-13.
7. Кобалава Ж.Д., Котовская Ю.В. Европейские рекомендации по артериальной гипертонии 2013 года: неизменное, новое, нерешенное. *Кардиология*. 2013; 1: 83-95.
8. Войтенко В.П., Токарь А.В., Полохов А.М. Методика определения биологического возраста человека. *Геронтология и гериатрия 1984. Ежегодник. Биологический возраст. Наследственность и старение*. 1984; 133-7.
9. Пристром М.С., Сушинский В.Э., Семененков И.И. Старение физиологическое и преждевременное. Место статинов в предупреждении преждевременного старения. *Медицинские новости*. 2009; 6: 25-30.
10. Захарова Н.О., Николаева А.В., Тренева Е.В., Бердяшклина С.И., Ивкина О.Н., Овчинникова Е.А. и др. Значение нарушений в системе агрегатного состояния крови в развитии сердечно-сосудистых заболеваний в условиях физиологического и ускоренного старения. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2014; 5(2): 857-859.
11. Голованова Е. Д. Системный анализ факторов риска, биологических ритмов и ремоделирования сосудов в онтогенезе у мужчин с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Дисс. ... д-ра. мед. наук. Смоленск; 2009.

REFERENCES

1. Nadeem M., Ahmed S. S., Mansoor S. et al. Risk factors for coronary heart disease in patients below 45 years of age. *J. Med. Sci.* 2013; 29(1): 91-6.
2. Chernysheva E.N., Panova T. N., Donskaya M.G. Programmable cellular death and processes of free radical oxidation of lipids within a metabolic syndrome. *Saratovskiy nauchno-prakticheskiy zhurnal*. 2013; 9(2): 277-81. (in Russian)
3. Torgashev M.N., Myakotnykh V.S., Paltsev A.I. Age aspects of expressiveness of violations of lipidic exchange and post-traumatic stressful frustration at veterans of modern fighting. *Uspekhi gerontologii*. 2013; 26(3): 525-32. (in Russian)
4. Oganov R.G., Koncevaya A.V., Kalinina A.M. Economic damage from warmly - vascular diseases in the Russian Federation. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2011; 10 (4): 4-9. (in Russian)
5. Makoveeva E.A. The index of an atherogenesis as an integrated indicator of damage of a target organ (heart) at a hypertension. *Universum: Meditsina i farmakologiya: ehlektron. nauchn. zhurn.*. 2013; 1(1). (in Russian)
6. Sinkevich D.A., Protasov K.V., Dzizinskiy A.A. Concept of "vascular age" as new approach to assessment of cardiovascular risk. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2011; 6: 9 - 13. (in Russian)
7. Kobalava Zh. D., Kotovskaya Yu.V. European recommendations about an arterial hypertension of 2013: invariable, new, unresolved. *Kardiologiya*. 2013; 1: 83-95. (in Russian)
8. Voitenko V. P., Tokar A. V., Polyukhov of A.M. Metodik of determination of biological age of the person. *Gerontologiya i geriatriya 1984. Ezhegodnik. Biologicheskij vozrast. Nasledstvennost' i starenie*; 133-37. (in Russian)
9. Pristrom M.S., Sushinskiy V.E., Semenkov I.I. Aging physiological and premature. The place of statin in prevention of presenilation. *Meditsinskie novosti*. 2009; 6: 25-30. (in Russian)
10. Zakharova N.O., Nikolaeva A.V., Treneva E.V., Berdyashkina S.I., Ivkina O.N., Ovchinnikova E.A., etc. Value of violations in the system of aggregate state of blood in development of cardiovascular diseases in the conditions of the physiological and accelerated aging. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossijskoy akademii nauk*. 2014; 5(2): 857-9. (in Russian)
11. Golovanova E. D. The system analysis of risk factors, biological rhythms and remodeling of vessels in ontogenesis at men with cardiovascular diseases: yew. Diss. Smolensk, 2009. (in Russian)
12. Kanoore Edul V.S., Ince C., Estenssoro E. The Effects of Arterial Hypertension and Age on the Sublingual Microcirculation of Healthy Volunteers and Outpatients with Cardiovascular Risk Factors. *Microcirculation*. 2015; 22(6): 485-492.

Поступила 10.05.18  
Принята к печати 25.05.18

## КОАГУЛОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.132.2-089.86-07:616.151.5-074

Лисютенко Н.С.<sup>1</sup>, Морова Н.А.<sup>1</sup>, Цеханович В.Н.<sup>1,2</sup>

### ЛАБОРАТОРНЫЕ ПРИЗНАКИ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ КОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 644000, Омск, Россия;

<sup>2</sup>БУЗ Омской области «Областная клиническая больница», 644111, Омск, Россия

*У пациентов, перенёвших операцию коронарного шунтирования, высока вероятность тромбоза шунтов. Поэтому чрезвычайно актуальной задачей становится изучение факторов, способствующих наряду с оперативным вмешательством развитию гиперкоагуляционного состояния. Обследовано 85 пациентов, перенёвших операцию коронарного шунтирования, из них 40 – с сахарным диабетом 2-го типа. На 14-й день после операции у всех пациентов провели исследование содержания в крови фибриногена, растворимых фибрин-мономерных комплексов, D-димеров, фактора Виллебранда, индуцированной агрегации тромбоцитов. Между пациентами с сахарным диабетом и пациентами без диабета не выявлено значимых различий по содержанию в крови фибриногена, растворимых фибрин-мономерных комплексов, D-димеров, индуцированной агрегации тромбоцитов. Выявлена связь между отдельными изучаемыми показателями системы гемостаза и возрастом, ростом, весом, окружностью талии пациентов, давностью перенесённого инфаркта миокарда. Установлено, что показатели индуцированной агрегации тромбоцитов коррелируют с показателями липидного обмена и степенью стеноза коронарных артерий. Согласно полученным данным, развитие состояния гиперкоагуляции после операции коронарного шунтирования зависит от массы тела, окружности талии, возраста, давности перенесённого инфаркта миокарда, показателей липидного обмена и степени атеросклеротического поражения коронарных артерий.*

**Ключевые слова:** коронарное шунтирование; сахарный диабет; фибриноген; D-димеры; фактор Виллебранда; холестерин.

**Для цитирования:** Лисютенко Н.С., Морова Н.А., Цеханович В.Н. Лабораторные признаки активации системы гемостаза у больных ишемической болезнью сердца после операции коронарного шунтирования. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (8): 500-505. DOI <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-500-505>

Lisyutenko N.S.<sup>1</sup>, Morova N.A.<sup>1</sup>, Tsekhanovich V.N.<sup>1,2</sup>

#### LABORATORY SIGNS OF ACTIVATION OF THE HEMOSTASIS SYSTEM IN PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE, WHO HAD CORONARY ARTERY BYPASS SURGERY

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Omsk State Medical University" of the Ministry of Health. 644000, Omsk, Russia;

<sup>2</sup>Budgetary Health Care Institution of Omsk region "Regional Clinical Hospital". 644111, Omsk, Russia

*The hypercoagulable state is a risk factor for shunt thrombosis in patients who had coronary artery bypass surgery. That is why the study of factors and operative intervention which can lead to hypercoagulable states are extremely valuable and vital issues. 85 patients who had coronary artery bypass surgery were examined. 40 of them have 2 type diabetes mellitus. All patients underwent a study of the content of fibrinogen, soluble fibrin-monomer complexes, D-dimers, von Willebrand factor, induced platelet aggregation in the blood on the 14th day after the surgery. There were no significant differences in content of fibrinogen, soluble fibrin-monomer complexes, D-dimers, induced platelet aggregation in the blood between patients with diabetes mellitus and patient without diabetes mellitus. It was detected the connection between separate indicators of the hemostatic system studied and age, height, weight, waist circumference and how long ago myocardial infarction had occurred. It was detected that indicators of induced platelet aggregation correlate with indicators of lipid metabolism and degree of coronary artery stenosis. According to the information received, progression of hypercoagulable state after coronary artery bypass surgery is depends on weight, waist circumference, age, how long ago myocardial infarction had occurred, indicators of lipid metabolism and degree of atherosclerotic cardiovascular disease of coronary arteries.*

**Key words:** coronary artery bypass surgery; diabetes mellitus; fibrinogen; D-dimers; von Willebrand factor; cholesterol.

**For citation:** Lisyutenko N.S., Morova N.A., Tsekhanovich V.N. Laboratory signs of activation of the hemostasis system in patients with coronary heart disease, who had coronary artery bypass surgery. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (8): 500-505 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-500-505>

**For correspondence:** Lisyutenko N.S., postgraduate student of the Department of Hospital Therapy, Endocrinology ; e-mail [n.labuzina@mail.ru](mailto:n.labuzina@mail.ru)

#### Information about authors:

Lisyutenko N.S. <http://orcid.org/0000-0003-4088-240X>

Morova N.A. <https://orcid.org/0000-0003-0003-692X>  
Tsekhanovich V.N. <https://orcid.org/0000-0001-8300-1348>

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

**Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

Received 20.03.2018  
Accepted 24.04.2018

Проблема тромбоза различных локализаций в настоящее время чрезвычайно актуальна. Морфологическим субстратом большинства сердечно-сосудистых катастроф является атеротромбоз. Не вызывает сомнений тот факт, что развитию тромбоза предшествуют некоторые изменения системы гемостаза.

Гиперкоагуляция, способная привести к тромбозу, – универсальная реакция организма на чрезмерные воздействия различной природы [1, 2]. Безусловно, к таким дистрессорам относится оперативное вмешательство [3]. При проведении операции коронарного шунтирования (КШ) происходит повреждение сосудистой стенки во время забора кондуитов и имплантации шунта. Пациент, страдающий ишемической болезнью сердца, заведомо имеет предрасположенность к атеротромбозу. В связи с хирургическим вмешательством на сердце и сосудах с использованием искусственного кровообращения у этих больных система гемостаза претерпевает серьёзные изменения. В сложившихся условиях чрезвычайно неблагоприятным событием, сводящим на нет эффект дорогостоящего вмешательства, становится тромбоз шунта. Вероятность тромбоза наиболее высока в первые дни и недели после операции [4]. Именно поэтому изучение факторов, способных привести к тромбозу шунта, является актуальной проблемой коронарной хирургии.

Лабораторные маркеры, свидетельствующие об активации системы гемостаза, можно разделить на следующие патогенетические группы:

- признаки активации коагуляционного гемостаза;
- признаки активации фибринолиза;
- признаки активации тромбоцитов;
- признаки повреждения эндотелия.

Параметры системы гемостаза претерпевают серьёзные изменения в связи с проведением КШ. Данные литературы свидетельствуют о том, что концентрации фибриногена, растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) и D-димеров после КШ увеличиваются вдвое по сравнению с дооперационными значениями [5–7]. Связаны ли эти изменения исключительно с хирургическим вмешательством или имеют значение и некоторые другие факторы – наличие сахарного диабета, курение, индекс массы тела, показатели липидного обмена?

По имеющимся данным, сахарный диабет 2-го типа и перенесённое КШ являются независимыми факторами, способствующими повышению агрегации тромбоцитов [8]. Повышенной агрегации тромбоцитов у лиц с диабетом способствует и высокий индекс массы тела [9]. Установлено, что уровни фибриногена и D-димеров у человека увеличиваются прямо пропорционально возрасту и имеют максимальные значения у пациентов старшей возрастной группы [10]. На показатели тромбоцитарно-сосудистого и коагуляционного гемостаза оказывает существенное влияние уровень артериального давления – у пациентов с артериальной гипертензией значимо выше содержание в крови фибриногена и агрегационная способность тромбоцитов [11]. Исходя из вышесказан-

ного, можно сделать вывод, что у пациента, перенёвшего операцию коронарного шунтирования, может иметь место целый комплекс факторов, способствующих развитию состояния гиперкоагуляции.

Современная наука рассматривает атеросклероз как патологический процесс, отражающий не только нарушения липидного обмена, но и дисфункцию эндотелия, и патологию системы гемостаза. Доказано, что липиды крови оказывают влияние на гемостатические реакции. Построены математические модели этих функциональных связей [12, 13]. Поэтому большой интерес представляет практическая оценка зависимости между показателями липидного обмена, степенью атеросклеротического поражения сосудов и изменением показателей системы гемостаза у пациентов, перенёвших коронарное шунтирование.

Цель настоящего исследования – изучение факторов, способствующих активации системы гемостаза у пациентов, перенёвших операцию коронарного шунтирования.

**Материал и методы.** Исследование проведено на базе отделения кардиохирургии БУЗ Омской области «Областная клиническая больница» в 2015–2016 гг. и является поперечным, одномоментным. Обследованы 85 мужчин, перенёвших операцию коронарного шунтирования по поводу стабильной стенокардии высокого функционального класса. Возраст пациентов изменялся в пределах 43–76 лет (средний возраст –  $59,0 \pm 6,8$  года). Большая часть пациентов – 65 человек ( $76,0 \pm 4,6\%$ ) – ранее перенесли инфаркт миокарда (ИМ), в том числе 14 ( $16,0 \pm 3,9\%$ ) – повторный инфаркт миокарда; 40 из 85 обследованных – больные сахарным диабетом (СД) 2-го типа.

Критерии включения: перенесённая операция коронарного шунтирования по поводу стабильной стенокардии высокого функционального класса, мужской пол.

Критерии исключения: срок менее 12 нед после перенесённого ИМ, признаки нарушения функции печени и почек, тромбозы других локализаций в анамнезе.

Все пациенты получали ацетилсалициловую кислоту в дозе 100 мг/сут. Низкомолекулярные гепарины отменяли на 4-й день после вмешательства. На 14-й день после операции КШ у всех пациентов проведён забор крови для исследования ряда показателей системы гемостаза: фибриногена, РФМК, D-димеров, фактора Виллебранда (vWF), индуцированной агрегации тромбоцитов.

Исследование уровня фибриногена проводили на автоматическом коагулометре Sysmex CA-560 реагентами фирмы «Siemens». Уровень D-димеров оценивали диагностическими наборами Nycocard фирмы «Nicomed» на рефлектометре Nycocard Reader II. Для определения РФМК использовали реактивы фирмы «Технология-Стандарт». Исследование фактора Виллебранда проводили с помощью реагентов фирмы «Siemens» для определения активности ристоцетин-кофактора в плазме крови ручным методом.

Исследование агрегации тромбоцитов проводилось на оптическом агрегометре Chrono-log, модель 490 с

Таблица 1

**Сопоставление пациентов двух групп (с наличием или отсутствием сахарного диабета) по некоторым клиническим признакам**

Клинический признак	Значение, медиана [верхний и нижний квартили]		p для критерия Манна–Уитни
	1-я группа, пациенты с ИБС и СД (n = 40)	2-я группа, пациенты с ИБС, без СД (n = 45)	
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	30 [27,75; 32,8]	27 [25,8; 30,4]	<b>0,02</b>
Окружность талии, см	102 [94; 112]	90 [84; 95]	<b>0,000</b>
Наиболее высокое систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	185 [160; 205]	170 [145; 190]	<b>0,026</b>
Наиболее высокое диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	100 [95; 120]	100 [95; 101]	<b>0,049</b>
Давность артериальной гипертензии, годы	11 [7; 25]	10 [4; 15]	0,24
Давность инфаркта миокарда, мес	24 [7; 106]	12 [15; 101]	0,34

Примечание. ИБС – ишемическая болезнь сердца; полужирным шрифтом обозначены значения p для критерия Манна–Уитни, показавшие статистически значимые различия между группами.

Таблица 2

**Частота выявленных изменений гемостаза у пациентов с сахарным диабетом (1-я группа) в сравнении с лицами без диабета (2-я группа)**

Изучаемый показатель гемостаза	1-я группа, число пациентов с повышенным показателем гемостаза (n = 40), абс. (M ± m, %)	2-я группа, число пациентов с повышенным показателем гемостаза, (n = 45), абс. (M ± m, %)	p для точного критерия Фишера, двухсторонний вариант
Фибриноген	31 (78,0 ± 4,8)	27 (60,0 ± 7,7)	0,104
РФМК	28 (70,0 ± 7,2)	35 (79,0 ± 6,4)	0,463
D-димеры	30 (75,0 ± 6,8)	37 (82,0 ± 6,1)	0,438
Фактор Виллебранда	17 (43,0 ± 7,8)	33 (73 ± 7)	<b>0,005</b>
Агрегация тромбоцитов с АДФ, 5 мкг/мл*	33 (83,0 ± 5,9)	35 (78,0 ± 6,5)	0,786
Агрегация тромбоцитов с эпинефрином, 5 мкг/мл*	15 (38,0 ± 7,6)	12 (27 ± 7)	0,352

Примечание. Полужирным шрифтом обозначено значение p для критерия Манна–Уитни, показавшие статистически значимые различия между группами; \* – данные представлены с учётом референсных значений для пациентов, получающих антиагрегантную терапию.

применением индукторов (ADP, Epinephrine) фирмы «Chrono-log». Параметры индуцированной агрегации определяли по кривой светопропускания. В качестве индукторов агрегации использовали эпинефрин (5 мкг/мл) и аденозиндифосфат (АДФ) в разведениях 5 и 1,25 мкг/мл.

*Статистические методы.* Для оценки вида распределения количественных и качественных признаков использовали критерий Шапиро–Уилка. Сравнение независимых групп по количественным признакам проводили с помощью критерия Манна–Уитни, по качественным признакам – точного критерия Фишера, двухстороннего варианта. Для оценки связи между количественными показателями применяли расчёт коэффициента корреляции Спирмена. Критическим уровнем значимости принято значение  $p < 0,05$ . Вышеперечисленные статистические показатели вычисляли при помощи программы Statistica 6.1.

*Результаты.* В зависимости от наличия сахарного диабета 2-го типа пациентов разделили на 2 группы: 40 мужчин с СД и 45 мужчин без СД. Прежде чем проводить оценку системы гемостаза, группы сопоставили по ряду клинических признаков: индексу массы тела (ИМТ), окружности талии, максимальным значениям систолического и диастолического артериального давления, давности артериальной гипертензии (АГ) и ИМ. Поскольку распределение всех этих признаков отличалось от нормального (для критерия Шапиро–Уилка  $p < 0,05$ ), для сравнения групп применён критерий Манна–Уитни. Результаты представлены в табл. 1.

Как выяснилось, в группе пациентов с СД 2-го типа индекс массы тела, окружность талии и степень повышения артериального давления были значимо выше, чем у пациентов без диабета. Различий по давности артери-

альной гипертензии и инфаркта миокарда между группами не выявлено. Также не было различий и по числу курящих пациентов (p для точного критерия Фишера 0,65).

Представляют интерес особенности свёртывающей системы крови у лиц с ИБС и СД. Частота выявленных изменений гемостаза в обеих группах представлена в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, у пациентов без сахарного диабета чаще имело место повышение уровня фактора Виллебранда. Объяснение этому парадоксальному явлению представлено ниже. Повышение уровня других изучаемых показателей встречалось примерно с одинаковой частотой у пациентов обеих групп. Следует отметить, что группы не различались по числу пациентов, имеющих недостаточный ответ на антиагрегантную терапию.

Пациентов с СД и лиц без диабета сопоставили по содержанию в крови фибриногена, РФМК, D-димеров, фактора Виллебранда и уровню индуцированной агрегации тромбоцитов. Поскольку распределение всех этих признаков также отличалось от нормального (для критерия Шапиро–Уилка  $p < 0,05$ ), для сравнения групп был применён критерий Манна–Уитни. Результаты представлены в табл. 3.

Между пациентами с СД и пациентами без диабета выявлены статистически значимые различия только по уровню фактора Виллебранда, причём у лиц без диабета его содержание было выше. Значения других показателей системы гемостаза значимо не различались. В соответствии с литературными данными, у пациентов с СД уровень фактора Виллебранда должен быть значимо выше, чем у лиц без диабета. Такой парадокс не мог

Сравнение некоторых показателей системы гемостаза у пациентов двух исследуемых групп

Исследуемые показатели системы гемостаза	Значение, медиана [верхний и нижний квартили]		Референсные значения	p для критерия Манна–Уитни
	1-я группа, пациенты с ИБС и СД (n = 40)	2-я группа, пациенты с ИБС, без СД (n = 45)		
Фибриноген, г/л	4,7 [4,1; 5,5]	4,6 [3,7; 5,9]	2–4	0,68
РФМК, мг/100 мл	21 [12; 27]	24 [17; 26]	3,5–15,0	0,83
D-димеры, мг/мл	0,5 [0,4; 1]	0,5 [0,4; 0,9]	≤ 0,3	0,72
Фактор Виллебранда, %	150 [120; 160]	160 [120; 160]	70–150	<b>0,01</b>
Агрегация тромбоцитов с АДФ, 5 мкг/мл, %	61 [50; 71]	60 [50; 69]	69–88 (< 46%)*	0,78
Агрегация тромбоцитов с АДФ, 1,25 мкг/мл, %	27 [16; 42]	26 [18; 36]	49–8	0,76
Агрегация тромбоцитов с эпинефрином, 5 мкг/мл, %	43 [30; 64]	38,5 [24; 53]	78–88 (< 52%)*	0,33

Примечание. Полужирным шрифтом обозначено значение p для критерия Манна–Уитни, показавшие статистически значимые различия между группами; \* – референсные значения для лиц, получающих антиагрегантную терапию; под действием ацетилсалициловой кислоты (АСК) уровень индуцированной агрегации тромбоцитов должен снижаться на 1/3 от нижней границы нормы [14].

остаться без внимания. Обратил на себя внимание и тот факт, что длительность операции у пациентов без диабета (Me 201 мин) была значимо больше, чем у пациентов с диабетом (Me 186 мин). Корреляционный анализ показал прямую зависимость между длительностью операции коронарного шунтирования и уровнем фактора Виллебранда в послеоперационном периоде ( $r = 0,224$ ,  $p = 0,04$ ). При этом уровень vWF не был связан с временем искусственного кровообращения ( $r = 0,064$ ;  $p = 0,562$ ). Не выявлено зависимости между другими изучаемыми лабораторными показателями и длительностью операции, а также временем искусственного кровообращения ( $r < 0,25$ ;  $p > 0,05$ ).

Чтобы выяснить, какие клинические аспекты могли быть связаны с изменением уровня изучаемых показателей гемостаза, провели корреляционный анализ.

Установлено, что уровень фибриногена у пациентов с СД находится в обратной зависимости от роста пациента ( $r = -0,391$ ;  $p = 0,01$ ). У пациентов без диабета выявлена прямая связь умеренной силы между уровнем фибриногена и окружностью талии ( $r = 0,291$ ;  $p = 0,04$ ).

Уровень D-димера у пациентов обеих групп находится в прямой зависимости от роста, веса и окружности талии ( $r$  соответственно для каждой пары признаков: 0,426; 0,393; 0,363;  $p$  соответственно: 0,003; 0,006; 0,013). Примечательно, что корреляционный анализ не показал связи между индексом массы тела и изучаемыми показателями системы гемостаза. У лиц с сахарным диабетом уровень D-димеров отрицательно коррелировал с давностью перенесённого инфаркта миокарда ( $r = -0,327$ ;  $p = 0,04$ ). У лиц без диабета такой зависимости не наблюдалось. Следует отметить, что ни один из других изучаемых лабораторных показателей не был связан с перенесённым ранее инфарктом миокарда.

Установлено, что у лиц с диабетом уровень фактора Виллебранда находится в прямой зависимости от возраста пациента с СД ( $r = 0,369$ ;  $p = 0,018$ ). Для пациентов без диабета эта зависимость не характерна.

Такие клинически важные аспекты, как степень и давность повышения АД, по нашим данным, не влияли на изменения показателей гемостаза как у пациентов с СД, так и у пациентов без диабета ( $r < 0,25$ ;  $p > 0,05$ ).

Представляет интерес связь изучаемых показателей системы гемостаза с показателями липидного обмена и степенью атеросклероза коронарных артерий. Так, уровень адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов находился в обратной зависимости от содержания в

крови общего холестерина и холестерина ЛПВП у пациентов обеих групп ( $r = -0,324$  и  $-0,391$  соответственно;  $p = 0,031$  и  $0,026$  соответственно).

У пациентов с СД и у пациентов без диабета выявлены следующие взаимосвязи между атеросклеротическим поражением коронарных артерий и некоторыми показателями гемостаза: степень поражения ствола левой коронарной артерий (% стеноза) имеет отрицательную связь умеренной силы с уровнем адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов и АДФ-индуцированной агрегации в разведении 1,25 мкг/мл ( $r = -0,424$  и  $-0,465$  соответственно;  $p = 0,043$  и  $0,025$ ); степень стеноза огибающей ветви – в прямой связи с уровнем РФМК и АДФ-индуцированной агрегации в разведении 5 мкг/мл ( $r = 0,331$  и  $0,442$  соответственно;  $p = 0,039$  и  $0,011$ ).

Корреляционный анализ позволил выявить и некоторые особенности функционирования системы гемостаза. В группе пациентов с СД обнаружена связь между уровнем фибриногена и РФМК, уровнем фибриногена и D-димеров, уровнем РФМК и D-димеров. Коэффициенты корреляции Спирмена для каждой пары признаков равнялись: 0,705; 0,417; 0,471 ( $p = 0,000$ ; 0,012; 0,004 соответственно).

В группе пациентов без диабета выявлена взаимосвязь только между содержанием в крови фибриногена и РФМК ( $r = 0,731$ ;  $p = 0,000$ ). Корреляции между содержанием D-димеров и другими показателями не обнаружено ( $r = 0,266$  и  $0,098$  соответственно;  $p = 0,071$  и  $0,511$  соответственно).

Выявлена ещё одна особенность функционирования системы гемостаза у пациентов с диабетом: имела место прямая связь умеренной силы между уровнем РФМК и содержанием фактора Виллебранда ( $r = 0,335$ ;  $p = 0,045$ ). В группе пациентов без диабета такой зависимости не выявлено ( $r = 0,125$ ;  $p = 0,406$ ).

*Обсуждение.* Отсутствие различий по изучаемым параметрам системы гемостаза между лицами с СД и лицами без диабета можно связать с тем, что хирургическое вмешательство на сердце и сосудах является мощным дистрессором для системы гемостаза. Вероятно, на этом фоне нивелируются различия по содержанию в крови фибриногена, РФМК, D-димеров, уровню индуцированной агрегации тромбоцитов, обусловленные нарушениями углеводного обмена. В сложившихся условиях даже на уровень фактора Виллебранда как показателя эндотелиальной дисфункции оказывает большее значение длительность операции, а не наличие сахарного диабета.

Связь изменённых показателей гемостаза с такими конституциональными особенностями, как рост, вес и окружность талии, не противоречит литературным данным. Известно, что ожирение способствует развитию гиперкоагуляционного состояния. Молекулярные механизмы этих процессов связаны с повышением продукции тромбина и активацией фибриногена, но пока они раскрыты не до конца [15]. Возраст пациента тоже оказывает влияние на систему гемостаза. В соответствии с литературными данными, уровень фибриногена и D-димеров находится в прямой зависимости от возраста [10]. Как показало данное исследование, это утверждение у лиц с СД справедливо и для фактора Виллебранда.

Выше уже упоминалось, что атеросклеротический процесс следует рассматривать как совокупность нарушений липидного обмена, дисфункции эндотелия и изменений коагуляционных свойств крови. Наибольшее значение в патогенезе нарушений гемостаза под влиянием липопротеинов низкой плотности принадлежит простаглицлино-тромбоксановой системе крови, то есть нарушения затрагивают в первую очередь сосудисто-тромбоцитарное звено гемостаза [11]. Этим, вероятно, и объясняется связь между показателями липидного обмена и степенью индуцированной агрегации тромбоцитов у наших испытуемых.

Связь показателей агрегации тромбоцитов со степенью поражения коронарных артерий, возможно, является следствием вышеописанной корреляции между изменениями липидного обмена и нарушениями сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. Однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Выявлена интересная закономерность функционирования системы гемостаза у пациентов с СД в сравнении с таковой у лиц без диабета. D-димеры – маркеры активации коагуляционного звена гемостаза и продукты деградации фибрина. Безусловно, их содержание в крови патогенетически связано с продукцией фибрина. Тот факт, что у лиц с СД эта связь подтверждена статистическими методами, а у лиц без диабета – нет, может свидетельствовать о более интенсивных процессах тромбообразования и фибринолиза у пациентов с нарушениями углеводного обмена.

Закономерно предположить, что у лиц с диабетом повышение активности фактора Виллебранда способствует активации коагуляционного звена гемостаза и, как следствие, увеличению содержания в крови РФМК. Тот факт, что эта закономерность не реализуется у пациентов без диабета, несмотря на более высокие количественные показатели фактора Виллебранда, может свидетельствовать о более высокой активности противосвёртывающей системы крови в этой группе пациентов.

**Выводы.** Между пациентами с СД 2-го типа и пациентами без диабета в раннем послеоперационном периоде КШ не выявлено значимых различий по содержанию в крови фибриногена, РФМК, D-димеров и индуцированной агрегации тромбоцитов.

Развитие состояния гиперкоагуляции у пациентов, перенёвших операцию коронарного шунтирования, находится в прямой зависимости от окружности талии, веса, возраста, а у лиц с сахарным диабетом – в обратной зависимости от давности перенесённого инфаркта миокарда.

Показатели липидного обмена и степень атеросклероза коронарных артерий связаны с уровнем агрегации тромбоцитов и РФМК в раннем послеоперационном периоде коронарного шунтирования.

У пациентов с СД в сравнении с лицами без диабета выявлены некоторые особенности функционирования системы гемостаза – прямая связь умеренной силы между содержанием в крови D-димеров и фибриногена, РФМК, а также между концентрациями РФМК и фактора Виллебранда.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА ( пп. 4, 8-13, 15 см. REFERENCES )

1. Борисова О.Л., Видулов А.Д., Маргазин В.А. Влияние тренированности, характера физических нагрузок и состояния гуморального иммунитета на активацию сосудистого эндотелия и первичное звено гемостаза у спортсменов. *Лечебная физкультура и спортивная медицина*. 2011; 5(89): 21-5.
2. Носова М.Н., Шахматов И.И., Алексеева О.В., Бондарчук Ю.А., Вдовин В.М., Улитина О.М. и др. Параметры гемостаза как критерий функциональных резервов организма. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2011; 31: 129-32.
3. Антропова И.П., Юшков Б.Г. Исходное функциональное состояние эндотелия и реакция системы гемостаза на крупное хирургическое вмешательство. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2015; 4(64): 50-8.
5. Мухамедова У.М., Карпенко М.А., Шацкая Е.Г., Солнцев В.Н. Параметры системы гемостаза у больных ишемической болезнью сердца, подвергшихся аортокоронарному шунтированию в плановом порядке и оценка объёма кровопотери. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2011; 4(36): 48-55.
6. Пак Н.Л., Голухова Е.З., Самсонова Н.Н., Мерзляков В.Ю., Климович Л.Г., Рябинина М.Н., Кубова М.С. Состояние системы гемостаза у больных ишемической болезнью сердца после операции реваскуляризации миокарда, выполненной в условиях искусственного кровообращения и на работающем сердце. *Креативная кардиология*. 2011; 2: 60-70.
7. Гринштейн Ю.И., Савченко Е.А., Филоненко И.В., Гринштейн И.Ю., Савченко А.А. Зилт у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий после аортокоронарного шунтирования. Предварительные результаты открытого, рандомизированного, сравнительного исследования ЗЕВС. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2008; 7(6): 43-9.
14. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М.: Ньюдиамед; 2008.

#### REFERENCES

1. Borisova O.L., Vikulov A.D., Margazin V.A. Influence of fitness, nature of physical loads in the activation of vascular endothelium athletes. *Lechebnaya fizkul'tura i sportivnaya meditsina*. 2011; 5(89): 21-5. (in Russian)
2. Nosova M.N., Shakhmatov I.I., Alekseyeva O.V., Bondarchuk YU.A., Vdovin V.M., Ulitina O.M. et al. Hemostatic parameters as a criterion of organisms functional reserves. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*. 2011; 31: 129-32. (in Russian)
3. Antropova I.P., Yushkov B.G. Initial endothelial function and changes of hemostasis in major surgery. *Tromboz, gemostaz i reologiya*. 2015; 4(64): 50-8. (in Russian)
4. Kim F.Y., Marhefka G., Ruggiero N.J., Adams S., Whellan D.J. Saphenous vein graft disease: review of pathophysiology, prevention, and treatment. *Cardiol. Rev.* 2013; 21(2): 101-9.
5. Mukhamedova U.M., Karpenko M.A., Shatskaya Ye.G., Solntsev V.N. Parameters of the hemostatic system parameters in patients with coronary heart disease undergoing coronary artery bypass grafting in a planned manner and assessment of the volume of blood loss volume. *Vestnik Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy akademii*. 2011; 4(36): 48-55. (in Russian)
6. Pak N. L., Golukhova Ye. Z., Samsonova N. N., Merzlyakov V. YU., Klimovich L. G., Ryabinina M. N., Kubova M. CH. The state of the hemostasis system in patients with coronary heart disease after op-

- eration of myocardial revascularization performed under conditions of artificial circulation and on a working heart. *Kreativnaya kardiologiya*. 2011; 2: 60-70. (in Russian)
7. Grinshteyn U.I., Savchenko E.A., Filonenko I.V., Grinshteyn I.U., Savchenko A.A. Zilt in coronary atherosclerosis patients after coronary artery bypass graft surgery. Preliminary results of an open, randomized, comparative ZEUS study. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2008; 7(6): 43-9. (in Russian)
  8. Larsen S.B., Grove E.L., Neergaard-Petersen S., Würtz M., Hvas A.M., Kristensen S.D. Determinants of reduced antiplatelet effect of aspirin in patients with stable coronary artery disease. *PLoS One*. 2015; 10(5): 1267-9.
  9. Schneider D.J., Hardison R.M., Lopes N., Sobel B.E., Brooks M.M. Association between increased platelet P-selectin expression and obesity in patients with type 2 diabetes: a BARI 2D (Bypass Angioplasty Revascularization Investigation 2 Diabetes) substudy. *Diabetes Care*. 2009; 32(5): 944-9.
  10. McBane R.D., Hardison R.M., Sobel B.E. Comparison of plasminogen activator inhibitor-1, tissue type plasminogen activator antigen, fibrinogen, and D-dimer levels in various age decades in patients with type 2 diabetes mellitus and stable coronary artery disease (from the BARI 2D trial). *Am. J. Cardiol*. 2010; 105(1):17-24.
  11. Guedes A.F., Carvalho F.A., Moreira C., Nogueira J.B., Santos N.C. Essential arterial hypertension patients present higher cell adhesion forces, contributing to fibrinogen-dependent cardiovascular risk. *Nanoscale*. 2017; 9(39): 14897-906.
  12. Grytsay V.I. A mathematical model of the metabolic process of atherosclerosis. *Ukr. Biochem. J*. 2016; 88(4): 75-84.
  13. Panes O., González C., Hidalgo P., Valderas J.P., Acevedo M., Contreras S., et al. Platelet tissue factor activity and membrane cholesterol are increased in hypercholesterolemia and normalized by rosuvastatin, but not by atorvastatin. *Atherosclerosis*. 2017; 257: 164-71.
  14. Barkagan Z.S., Momot A.P. *Diagnosis and controlled therapy of hemostasis disorders* [Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза]. Moscow: N'yudimed; 2008. (in Russian)
  15. Kopec A.K., Abrahams S.R., Thornton S., Palumbo J.S., Mullins E.S., Divanovic S. et al. Thrombin promotes diet-induced obesity through fibrinogen-driven inflammation. *J. Clin. Invest*. 2017; 127(8): 3152-66.

Поступила 20.03.18  
Принята к печати 24.04.18

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.921.8-078.33

Скирда Т.А., Борисова О.Ю., Петрова М.С., Комбарова С.Ю.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВОКОКЛЮШНЫХ АНТИТЕЛ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, г. Москва

Проведён сравнительный анализ эффективности выявления противокклюшных антител трёх классов (IgM, IgG, IgA) с помощью четырёх коммерческих тест-систем, используемых для серологической диагностики коклюша в Российской Федерации: RIDASCREEN («R-Biopharm AG», Германия), NOVATEC («Immunodiagnostica GmbH», Германия), DRG («DRG Diagnostics», Германия), SAVYON («Savyon Diagnostics», Израиль). В исследование включено 42 сыворотки крови больных коклюшем детей и взрослых, госпитализированных в ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1» Департамента здравоохранения г. Москвы. Полное совпадение результатов исследования установлено в 40,5% случаев, в 42,9% выявлено неполное совпадение результатов по динамике выработки одного класса антител и в 9,5% случаев – несовпадение результатов по двум классам антител. Всего несовпадений результатов 7,1%. При определении антител класса IgM в сыворотке крови больных коклюшем наибольшее количество положительных результатов определено в тест-системе SAVYON – 83,3 ± 6,3% (35), NOVATEC – 71,4 ± 8,2% (30), RIDASCREEN – 61,9 ± 9,7% (26), DRG – 45,2 ± 11,7% (19). Антитела класса IgG во всех тест-системах определялись на одном уровне. Некоторые различия наблюдались в определении антител класса IgA. Высокая частота выявления IgA была в тест-системе RIDASCREEN – 59,5 ± 10,0% (25) и DRG – 50,0 ± 11,2% (21). В тест-системах NOVATEC и SAVYON этот показатель был ниже – 45,2 ± 11,7 и 26,2 ± 13,9% соответственно (19 и 11). Показано, что для серологических исследований может быть использована любая из четырёх тест-систем. Рекомендуется проводить диагностические исследования сывороток крови в одной выбранной тест-системе для получения сопоставимых результатов и интерпретировать результаты, полученные в одной тест-системе: при получении сомнительных результатов необходимо исследовать сыворотки в динамике одновременно в одной тест-системе.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ; сыворотки крови; антитела; коклюш.

Для цитирования: Скирда Т.А., Борисова О.Ю., Петрова М.С., Комбарова С.Ю. Определение противокклюшных антител в иммуноферментном анализе. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (8): 505-510.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-505-510>

Skirda T.A., Borisova O.Yu., Petrova M.S., Kombarova S.Yu.

DEFINITION OF ANTI-PERTUSSIS ANTIBODIES BY ENZYME IMMUNOASSAY

G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russia

Для корреспонденции: Борисова Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, доц., рук. лаб. диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций; e-mail: olgaborisova@mail.ru

*Comparative analysis of efficiency of identification the anti-pertussis of antibodies of three classes (IgM, IgG, IgA) by means of four commercial test systems used for serological diagnosis of whooping cough in the Russian Federation by RIDASCREEN (R-Bioharm AG, Германия), NOVATEC (Immunodiagnostica GmbH, Германия), DRG Diagnostics (Германия), Savyon Diagnostics (Israel) is carried out. The research included 42 serums of blood of the children and adults with whooping cough hospitalized in Infectious diseases clinical hospital No. 1 of the Moscow Department of Healthcare. In work the commercial test systems - RIDASCREEN (r-Biofarm, Германия), NOVATEC (Германия), DRG (Германия), Savyon (Israel) are used, according to instructions of producers. Complete coincidence of results of a research is established in 40,5% cases, in 42,9% not complete coincidence of results on dynamics of development of one class of antibodies is revealed and in 9,5% cases the discrepancy of results on two classes of antibodies is revealed. In total discrepancies of results - 7,1%. At determination of antibodies of the class IgM in serum of blood of patients with whooping cough the greatest number of positive results is defined in the SAVYON - 83,3±6,3% (35 serums), NOVATEC - 71,4±8,2% (30 serums), RIDASCREEN - 61,9±9,7% (26 serums), DRG - 45,2±11,7% (19 serums). Class IgG antibodies in all test systems were defined at one level. Some distinctions took place in determination of IgA. The high percent of identification of IgA was in the RIDASCREEN - 59,5±10,0% (25 serums) and DRG - 50,0±11,2% (21 serums). In the NOVATEC and SAVYON this percent was lower - 45,2±11,7% and 26,2±13,9%, respectively (19 and 11 serums). Thus, the research showed that for serological researches any of these 4 test systems can be used. It is recommended to conduct diagnostic testings of serums of blood in one chosen test system for obtaining comparable results and to interpret the results received in one test system when obtaining doubtful results it is necessary to investigate serums in dynamics at the same time in one test system.*

**Key words:** enzyme immunoassay; serum of blood; Ig; whooping cough.

**For citation:** Skirda T.A., Borisova O., Petrova M.S., Kombarova S.Yu. Definition of anti-pertussis antibodies by immunoassay. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (8): 505-510. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-505-510>

**For correspondence:** Borisova O. Yu., doctor of medicine (MD), docent, head of laboratory of diagnostic of diphtheria and pertussis infections; e-mail: [olgborisova@mail.ru](mailto:olgborisova@mail.ru)

**Information about authors:**

Skirda T.A. <https://orcid.org/0000-0003-4140-1014>

Borisova O. <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>

Petrova M.S. <https://orcid.org/0000-0001-6065-2623>

Kombarova S.Yu. <https://orcid.org/0000-0003-3382-6178>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

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

Received 18.04.2018  
Accepted 25.05.2018

**Введение.** Одной из важнейших задач совершенствования лабораторной диагностики является разработка нормативной и методической документации, регламентирующей проведение диагностических исследований. Нормативные и методические документы разрабатываются и актуализируются с учётом современного уровня науки и развития высокочувствительных технологических приемов, базирующихся на принципах доказательной медицины. При коклюшной инфекции только в последние 3 года используются 3 метода лабораторной диагностики – бактериологический, серологический и молекулярно-генетический, применение которых определяется сроком развития заболевания и регламентируется санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.1.2.3162-14 «Профилактика коклюша». Наиболее эффективный метод – молекулярно-генетический. Серологическая диагностика является ретроспективной, однако её применение имеет важное значение при стёртых, атипичных формах заболевания, особенно у взрослых, а также в семейных очагах при установлении источника инфекции [1–3]. Согласно СП 3.1.2.3162-14 для серодиагностики применяется иммуноферментный анализ (ИФА). Отечественные ИФА-тест-системы отсутствуют, поэтому используются импортные тест-системы четырех производителей, зарегистрированные и разрешённые к применению в установленном порядке. Тест-системы сконструированы на основе различных антигенов возбудителя коклюша *Bordetella pertussis*: коклюшного токсина, филаментозного гемагглютинаина, полного экстракта антигенов *B. pertussis*.

Цель данной работы – сравнительный анализ эффек-

тивности выявления противокклюшных антител трёх классов (IgM, IgG, IgA) с помощью разных коммерческих тест-систем, используемых для серологической диагностики коклюша в Российской Федерации.

**Материал и методы.** В исследование включены 42 сыворотки крови больных коклюшем детей и взрослых, госпитализированных в ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1» Департамента здравоохранения г. Москвы в течение 2016 г. Дети составляли большинство (31 (73,8%) пациент: в возрасте до года 10 детей, в возрасте 1 года 9 человек, 2–13 лет – 12 человек). Взрослые сформировали группу из 11 человек. Сыворотки получены на 8–35-й день от начала болезни. До момента исследования их хранили при -20°C.

Диагноз коклюша поставлен всем больным на основании клинических данных и результатов лабораторного обследования методом ПЦР или с помощью бактериологического исследования. Для ретроспективного подтверждения диагноза использовали коммерческую тест-систему RIDASCREEN («R-Biopharm AG», Германия).

Она же служила тест-системой сравнения в настоящем исследовании, в котором также использованы тест-системы NOVATEC («Immunodiagnostica GmbH», Германия), DRG («DRG Diagnostics», Германия), SAVYON («Savyon Diagnostics», Израиль) в соответствии с инструкциями по применению.

**Результаты и обсуждение.** Проведено исследование сывороток крови больных коклюшем детей разных возрастов и взрослых в ИФА-тест-системах, разрешённых к использованию и зарегистрированных в Российской Федерации. В структуре *B. pertussis* антигенами, спо-

собными индуцировать протективный иммунный ответ, являются коклюшный токсин, филаментозный гемагглютинин, белок наружной мембраны – пертактин. Для создания ИФА-тест-систем, как правило, используют коклюшный токсин и филаментозный гемагглютинин.

Микропланшеты использованных в данной работе тест-систем ИФА были покрыты обогащёнными фракциями коклюшного токсина (NOVATEC), коклюшного токсина и филаментозного гемагглютинина (DRG, SAVYON); в тест-системе RIDASCREEN коклюшный токсин и филаментозный гемагглютинин применялись для выявления антител классов IgG и IgA, для выявления антител класса IgM использован полный экстракт антигенов *B. pertussis*.

Положительным результатом считали в тест-системе RIDASCREEN уровень IgM-AT > 17 Ед/мл, IgG-AT > 18 Ед/мл, IgA-AT > 26 Ед/мл; в SAVYON уровень IgM-AT COI > 1,1, IgG-AT > 1;1, IgA-AT COI > 1,1; в NOVATEC уровень IgM-AT > 11 NTU, IgG-AT > 11 NTU, IgA-AT > 11 NTU; в DRG уровень IgM-AT > 11 DU, IgG-AT > 11 DU, IgA-AT > 11 DU. При обработке результатов исследования сывороток не учитывали серую зону, результаты разделили на положительные и отрицательные (выше cut off (пороговый уровень) – положительный результат, ниже – отрицательный).

Панель сывороток в количестве 42 разморожена и в течение 2 последовательных дней проставлена в четырёх тест-системах однократно согласно прилагаемым инструкциям по применению. Всего проведено 504 исследования. В качестве тест-системы сравнения была использована RIDASCREEN, с помощью которой ранее в течение нескольких лет проводили диагностические серологические исследования на коклюш [2–4]. Определение антител классов IgM, IgG, IgA выполнено по единому формату:

1. Определение положительных и отрицательных ответов в каждой тест-системе;

2. Положительные результаты, полученные в тест-системе сравнения RIDASCREEN, сопоставляли с результатами соответствующих номеров сывороток, полученных в трёх других изучаемых тест-системах NOVATEC, DRG, SAVYON.

3. Отрицательные результаты, полученные в тест-системе сравнения RIDASCREEN, сопоставляли с результатами соответствующих номеров сывороток, полученных в трёх изучаемых тест-системах NOVATEC, DRG, SAVYON.

**Определение противококлюшных антител класса IgM.** Из 42 сывороток положительные результаты по выявлению антител класса IgM получены в 26 (61,9%) сыворотках крови, исследованных в тест-системе RIDASCREEN, и в 35 (83,3%), 30 (71,4%) и 19 (45,2%) сыворотках, исследованных в SAVYON, NOVATEC и DRG соответственно (табл. 1).

Антитела класса IgM к возбудителю коклюша не выявлены в 16 (38,1%) сыворотках, исследованных в тест-системе RIDASCREEN, и в 7 (16,7%), 12 (28,6%) и 23 (54,8%) сыворотках, исследованных в SAVYON, NOVATEC и DRG соответственно (см. табл. 1).

Далее согласно выбранному формату исследования номера сывороток, в которых выявлены антитела класса IgM в RIDASCREEN (26 сывороток, их доля принята за 100%), были сопоставлены с соответствующими номерами сывороток и результатами по выявлению в них антител данного класса в SAVYON, NOVATEC и DRG.

В тест-системах SAVYON и NOVATEC в 25 (96,1%) сыворотках крови выявлены антитела класса IgM, в одной (3,9%) сыворотке антитела не выявлены. В тест-системе DRG в 19 (73,1%) сыворотках выявлены IgM и в 7 (26,9%) антитела не выявлены. Таким образом, сопоставимые положительные результаты по выявлению антител класса IgM получены в тест-системах RIDASCREEN, SAVYON и NOVATEC по сравнению с DRG, в которой получены 7 отрицательных результатов. Следует отметить, что отрицательные результаты были близки к серой зоне, что может быть связано с особенностями конструирования тест-системы (см. табл. 1). Номера сывороток, в которых не выявлены антитела класса IgM в RIDASCREEN (16; 100%), сопоставлены с соответствующими номерами сывороток и результатами по выявлению в них антител данного класса в SAVYON, NOVATEC и DRG. В тест-системах SAVYON и NOVATEC отрицательными были 6 (37,5%) и 12 (75%) сывороток соответственно. В 10 (62,5%) сыворотках, исследованных в SAVYON, и в 4 (25%) – в NOVATEC, выявлены антитела класса IgM, которые в тест-системах RIDASCREEN и DRG были серонегативными (см. табл. 1).

Таким образом, наибольшее количество сывороток с выявленными антителами класса IgM установлено в тест-системе SAVYON – 83,3%. В тест-системах RIDASCREEN и NOVATEC результаты были сопоставимы (61,9 и 71,4% соответственно). В тест-системе DRG отмечен невысокий уровень выявления антител класса IgM – 45,2% (табл. 2). Наиболее высокая частота (83,3%) выявления антител класса IgM в тест-системе SAVYON, возможно, связана с более высокой чувствительностью данной тест-системы. Этот вывод представляется вполне обоснованным, поскольку исследовали сыворотки крови от больных коклюшем, у которых клинический диагноз подтвержден в ПЦР и бактериологическом исследовании. Различия в получении положительных и отрицательных результатов связаны с конструктивными особенностями тест-систем: сорбцией разных антигенов и их концентрацией, степенью очистки, разным соотношением субклассов антител в конъюгатах и др.

**Определение противококлюшных антител класса IgG.** Положительные результаты по выявлению антител класса IgG к возбудителю коклюша выявлены в 29 (69,1%) сыворотках, исследованных в тест-системе RIDASCREEN, и в 29 (69,1%), 26 (61,9%) и 28 (66,7%) сыворотках, исследованных в тест-системах SAVYON, NOVATEC и DRG соответственно. Отрицательные результаты по выявлению антител класса IgG к возбудителю коклюша выявлены в 13 (30,9%) сыворотках, исследованных в тест-системе RIDASCREEN, и в 13 (30,9%), 16 (38,1%) и 14 (33,3%) сыворотках, исследованных в тест-системах SAVYON, NOVATEC и DRG соответственно (табл. 3).

Номера сывороток, в которых выявлены антитела класса IgG в RIDASCREEN (29; 100%), сопоставлены с соответствующими номерами сывороток и результатами по выявлению в них антител данного класса в SAVYON, NOVATEC и DRG. В тест-системе SAVYON в 28 (96,5%) сыворотках крови выявлены антитела класса IgG и в 1 (3,5%) – не выявлены. В тест-системе NOVATEC в 26 (89,7%) сыворотках выявлены IgG и в 3 (10,3%) сыворотках – не выявлены, в DRG 27 (93,1%) сывороток были серопозитивными и 2 (6,9%) – серонегативными (табл. 3). Полученные положительные результаты в тестируемых наборах были сопоставимы, однако в тест-системах

Удельный вес отрицательных и положительных результатов по определению антител класса IgM

Тест-системы	Всего сывороток	IgM		Удельный вес положительных и отрицательных результатов по определению IgM					
		IgM+	IgM-	в сравнении с положительными результатами в RIDASCREEN			в сравнении с отрицательными результатами в RIDASCREEN		
				абс/%	абс/%	всего IgM+	IgM+ абс/%	IgM- абс/%	всего IgM-
RIDASCREEN	42	26/61,9 ± 9,7	16/38,1 ± 12,5	26	26/100	-	16	16/100	-
SAVYON	42	35/83,3 ± 6,3	7/16,7 ± 15,2	26	25/96 ± 5,8	1/3,9	16	6/37 ± 21,6	10/62,5 ± 16,1
NOVATEC	42	30/71,4 ± 8,2	12/28,6 ± 13,6	26	25/96 ± 5,8	1/3,9	16	12/75,0 ± 13,1	4/25 ± 25,0
DRG	42	19/45,2 ± 11,7	23/54,8 ± 10,6	26	19/73 ± 10,4	7/26,9 ± 18,1	16	100	-

RIDASCREEN, SAVYON, DRG они были несколько выше, чем в NOVATEC.

Номера сывороток, в которых не выявлены антитела класса IgG в RIDASCREEN (13; 100%), сопоставлены с соответствующими номерами сывороток и результатами по выявлению в них антител данного класса в SAVYON, NOVATEC и DRG.

В NOVATEC все 13 сывороток были также отрицательными по определению антител класса IgG. В тест-системах SAVYON и DRG отрицательными были 12 (92,3%) сывороток и 1 (7,7%) результат был положительным. Полученные отрицательные результаты во всех тест-системах были сопоставимы (см. табл. 3).

Таким образом, из 42 сывороток крови наибольшее количество сывороток с выявленными антителами класса IgG установлено в тест-системе RIDASCREEN – 69,1% и SAVYON – 69,1%, в DRG аналогичный показатель – 66,7%, в NOVATEC – 61,9% (табл. 2). Можно предположить, что использование в качестве антигена коклюшного токсина и филаментозного гемагглютини-на (RIDASCREEN, DRG, SAVYON) повышает чувствительность тест-набора по сравнению с тест-системой NOVATEC, в которой в качестве антигенов использованы только обогащённые фракции коклюшного токсина.

**Определение противококлюшных антител класса IgA.** Положительные результаты при выявлении антител класса IgA к возбудителю коклюша получены в 25 (59,5%) сыворотках, исследованных в тест-системе RIDASCREEN, и в 11 (26,2%), 19 (45,2%) и 21 (50%) сыворотках, исследованных в тест-системах SAVYON, NOVATEC и DRG соответственно.

Отрицательные результаты выявления антител класса IgA к возбудителю коклюша получены в 17 (40,5%) сыворотках, исследованных в тест-системе RIDASCREEN, и в 31 (73,8%), 23 (54,8%) и 21 (50%) сыворотках, исследованных в тест-системах SAVYON, NOVATEC и DRG соответственно (см. табл. 4).

Таким образом, получены сопоставимые результаты выявления антител класса IgA в тест-системах RIDASCREEN, DRG и NOVATEC (59,5, 50,0 и 45,2% соответственно) и несколько ниже – в SAVYON – 26,2%.

Номера сывороток, в которых выявлены антитела класса IgA в RIDASCREEN (25; 100%), сопоставлены с соответствующими номерами сывороток и результатами по выявлению в них антител данного класса в SAVYON, NOVATEC и DRG. В тест-системе DRG в 21 (84%) сыворотке крови выявлены антитела класса IgA и в 4 (16%) – не выявлены. В тест-системах NOVATEC и SAVYON в 19 (76%) и 11 (44%) сыворотках соответственно выявлены IgA

и в 6 (24%) и 14 (56%) соответственно – не выявлены. Таким образом, из 25 сывороток с выявленными антителами класса IgA в RIDASCREEN положительными были в DRG 21 (84%), в NOVATEC – 19 (76%), в SAVYON – 11 (44%).

Номера сывороток, в которых не выявлены антитела класса IgA в RIDASCREEN (17; 100%), сопоставлены с соответствующими номерами сывороток и результатами по выявлению в них антител данного класса в SAVYON, NOVATEC и DRG. Во всех тест-системах получены отрицательные результаты (см. табл. 4).

Таким образом, из 42 сывороток крови наибольшее количество образцов с выявленными антителами класса IgA было в тест-системе RIDASCREEN – 25 (59,5%), DRG – 21 (50%), NOVATEC – 19 (45,2%). В тест-системе SAVYON положительных результатов было 11 (26,2%) (см. табл. 2).

Серологические методы лабораторной диагностики коклюшной инфекции основываются на определении уровня специфических антител (IgM, IgA, IgG) к определённым антигенам/группам антигенов *B. pertussis*. Длительное время для оценки постинфекционного и поствакцинального иммунитета использовались такие методы, как реакция агглютинации в пробирках и реакция прямой гемагглютинации. Эти методы позволяют выявить в биологическом материале антитела, индуцированные корпускулярными антигенами *B. pertussis*. Основным и определяющим их недостатком является низкая чувствительность и выявление только суммарной популяции антител. В настоящее время в большинстве стран мира эти методы признаны устаревшими. В Российской Федерации эти методы в настоящее время еще используются для оценки поствакцинального иммунитета в рамках серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к возбудителю коклюша согласно методическим указаниям МУ 3.1.2943-11 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш,

Удельный вес сывороток с выявленными антителами классов IgM, IgG, IgA в исследуемых тест-системах

Тест-система	Всего сывороток	IgM+, абс/%	IgG+, абс/%	IgA+, абс/%
RIDASCREEN	42	26/61,9 ± 9,7	29/69,1 ± 8,7	25/59,5 ± 10,0
SAVYON	42	35/83,3 ± 6,3	29/69,0 ± 8,7	11/26,2 ± 13,9
NOVATEC	42	30/71,4 ± 8,2	26/61,9 ± 9,7	19/45,2 ± 11,7
DRG	42	19/45,2 ± 11,7	28/66,7 ± 9,1	21/50,0 ± 11,2

Таблица 3

**Удельный вес отрицательных и положительных результатов по определению антител класса IgG**

Тест-системы	Всего сывороток	IgG		Удельный вес положительных и отрицательных результатов по определению IgG					
		IgG+	IgG-	в сравнении с положительными результатами в RIDASCREEN			в сравнении с отрицательными результатами в RIDASCREEN		
				абс/%	абс/%	всего IgG+	IgG+	IgG-	всего IgG-
RIDASCREEN	42	29/69,1 ± 8,7	13/30,9 ± 13,3	29	29/100	-	13	13/100	-
SAVYON	42	29/69,1 ± 8,7	13/30,9 ± 13,3	29	28/96,5 ± 3,5	1/3,5	13	12/92,0 ± 8,0	1/7,7
NOVATEC	42	26/61,9 ± 9,7	16/38,1 ± 12,5	29	26/89,7 ± 6,1	3/10,3	13	13/100	-
DRG	42	28/66,7 ± 9,1	14/33,3 ± 13,1	29	27/93,1 ± 4,9	2/6,9	13	12/92,3 ± 8,0	1/7,7

корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В)».

В 80-е годы XX века широкое распространение получил ИФА для выявления антител к возбудителю коклюша [4–6]. Во многих странах разработаны различные варианты тест-систем ИФА, основанные на раздельном или одновременном выявлении в исследуемом материале антител классов IgM, IgA и IgG [7–9]. В качестве антигенов используются различные компоненты коклюшного микроба: дезинтегрированные химическим, физическим или механическим способами бактериальные клетки [6], комплексы антигенов [4] или отдельные антигены (коклюшный токсин, филаментозный гемагглютинин, пертактин, фимбриальные белки, липополисахарид) возбудителя [4, 5]. Оценку уровня сывороточных антител проводят однократно [10] или двукратно при исследовании парных сывороток, взятых с интервалом 10–14 дней.

Как правило, уровень антител методом ИФА определяют в сыворотке крови человека. В некоторых случаях исследуемым материалом является слюна больного. Чувствительность и специфичность ИФА, основанного на выявлении антител класса IgG к коклюшному токсину в слюне, составили 79,7 и 96,6 % соответственно [11]. При этом определение уровня антител класса IgA к коклюшному токсину и филаментозному гемагглютину в слюне больного имеет низкое диагностическое значение [12].

В настоящее время использование ИФА для выявления антител IgA, IgG, IgM в сыворотке крови в практическом здравоохранении Российской Федерации позволяет подтвердить диагноз коклюша при лёгких и стёртых формах заболевания, информативно для непривитых детей старше 1 года и взрослых [1, 2]. Недостатки серологической диагностики состоят в том, что этот метод используется в основном ретроспективно (с 3-й недели заболевания), имеются трудности в интерпретации диа-

гноза на основе полученных данных у привитых и детей первого полугодия жизни, у которых на ранних сроках болезни результаты серодиагностики могут быть отрицательными, и лишь обследование в динамике (повторно на 4–5-й неделе болезни) может подтвердить диагноз [2, 3]. Кроме того, на данный момент отсутствуют зарегистрированные отечественные ИФА-тест-системы.

Поэтому в настоящее время назрела необходимость провести сравнительный анализ эффективности выявления постинфекционных противокклюшных антител трёх классов у больных коклюшем с помощью зарегистрированных тест-систем зарубежного производства с целью формулирования практических рекомендаций относительно возможностей их использования и правильной интерпретации полученных результатов. Сравнительный анализ эффективности выявления противокклюшных антител классов IgM, IgG и IgA у больных коклюшем с помощью коммерческих тест-систем RIDASCREEN, NOVATEC, DRG, SAVYON показал, что для серологических исследований может быть использована любая из этих тест-систем. При исследовании 42 сывороток полное совпадение результатов определялось в 17 (40,5%) сыворотках во всех четырёх тест-системах, в том числе антитела классов IgM, IgG, IgA выявлены в 12 (28,6%) сыворотках, 5 (11,9%) сывороток оказались серонегативными по всем трём классам антител. В 18 (42,9%) сыворотках из 42 выявлено неполное совпадение результатов по динамике выработки одного класса антител, в 4 (9,5%) сыворотках отмечено несовпадение результатов по двум классам антител. Различия в выявляемости антител в разных тест-системах может быть связано с особенностями диагностических наборов: сорбцией разных антигенов и их концентрацией, степенью очистки, разным соотношением субклассов антител в конъюгатах и др. Несоответствие результатов определено в 3 (7,1%) сыворотках у детей первого года жизни (3, 5 и 7 мес). Различия

Таблица 4

**Удельный вес отрицательных и положительных результатов по определению антител класса IgA**

Тест-системы	Всего сывороток	IgA		Удельный вес положительных и отрицательных результатов по определению IgA					
		IgA+	IgA-	в сравнении с положительными результатами в RIDASCREEN			в сравнении с отрицательными результатами в RIDASCREEN		
				абс/%	абс/%	всего IgA+	IgA+	IgA-	всего IgA-
RIDASCREEN	42	25/59,5 ± 10,0	17/40,5 ± 12,3	25	25/100	-	17	17/100	-
SAVYON	42	11/26,2 ± 13,9	31/73,8 ± 7,9	25	11/44,0 ± 15,7	14/56,0 ± 13,8	17	17/100	-
NOVATEC	42	19/45,2 ± 11,7	23/54,8 ± 10,6	25	19/76,0 ± 10,1	6/24,0 ± 19,1	17	17/100	-
DRG	42	21/50,0 ± 11,2	21/50,0 ± 11,2	25	21/84,0 ± 8,2	4/16,0 ± 21,2	17	17/100	-

заклучались в том, что в одних тест-системах выявлялся 1 или 2 класса антител, а в других сыворотки были серонегативными по 3 классам антител. Вероятно, при исследовании парных сывороток крови в динамике могут быть получены схожие результаты. Возможно, это связано с разной чувствительностью тест-систем. Кроме того, заболевшие дети первого года жизни были не привиты, что связано с соматическим состоянием детей и, возможно, с медицинскими отводами вследствие этого. Кроме того, иммунная система у детей первого года жизни имеет возрастные особенности, и у них наблюдается замедленное формирование иммунного ответа.

При определении антител класса IgM в сыворотке крови больных коклюшем наибольшее количество положительных результатов установлено в тест-системе SAVYON –  $83,3 \pm 6,3\%$  (35 сывороток), NOVATEC –  $71,4 \pm 8,2\%$  (30 сывороток), RIDASCREEN –  $61,9 \pm 9,7\%$  (26 сывороток), DRG –  $45,2 \pm 11,7\%$  (19 сывороток). Антитела класса IgG во всех тест-системах определялись на одном уровне – в тест-системах RIDASCREEN и SAVYON –  $69,0 \pm 8,7\%$  (29 сывороток), DRG –  $66,7 \pm 9,1\%$  (28 сывороток) и NOVATEC –  $61,9 \pm 9,7\%$  (26 сывороток). Некоторые различия имели место в определении антител класса IgA. Высокая частота выявления IgA отмечена в тест-системе RIDASCREEN –  $59,5 \pm 10,0\%$  (25 сывороток) и DRG –  $50,0 \pm 11,2\%$  (21 сыворотка). В тест-системах NOVATEC и SAVYON этот показатель был ниже –  $45,2 \pm 11,7$  и  $26,2 \pm 13,9\%$  соответственно (19 и 11 сывороток).

**Заключение.** Сравнительный анализ эффективности выявления противокклюшных антител классов IgM, IgG и IgA у больных коклюшем с помощью коммерческих тест-систем RIDASCREEN, NOVATEC, DRG, SAVYON показал, что для серологических исследований может быть использована любая из них. Учитывая разную чувствительность тест-систем, связанную с особенностями их создания, для диагностических целей рекомендуется проводить исследования сывороток крови в одной выбранной тест-системе для получения сопоставимых результатов и интерпретировать результаты, полученные в одной тест-системе; при получении сомнительных результатов необходимо исследовать сыворотки в динамике одновременно в одной тест-системе. В данной работе оценены 4 тест-системы ИФА для серологической диагностики коклюша. Вместе с тем регистрация сопоставимых практически на одном уровне результатов выявления антител класса IgG свидетельствует о перспективе использования тест-систем ИФА и для оценки поствакцинального иммунитета в системе серомониторинга коклюшной инфекции.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 4-12 см. REFERENCES)

1. Попова О.П., Скирда Т.А., Федорова И.М., Петрова М.С., Борисова О.Ю., Комбарова С.Ю. и др. Диагностическая ценность метода ИФА при коклюше у детей. *Детские инфекции*. 2016; 15(2): 36-40.

2. Грачева Н.М., Малышев Н.А., Петрова М.С., Попова О.П., Борисова О.Ю., Келли Е.И. *Коклюш (клиника, диагностика, лечение): методические рекомендации*. М.: Департамент здравоохранения города Москвы; 2009.

3. Попова О.П., Скирда Т.А., Федорова И.М., Котелева С.И. Особенности специфического гуморального ответа и цитокиновой регуляции при коклюше у детей. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20(5): 42-8.

#### REFERENCES

1. Popova O.P., Skirda T.A., Fedorova I.M., Petrova M.S., Borisova O.YU., Kombarova S.Yu. et al. Diagnosticheskaya cennost' metoda IFA pri koklyushe u detej. *Detskie infektsii*. 2016; 15(2): 36-40. (in Russian)
2. Gracheva N.M., Malyshev N.A., Petrova M.S., Popova O.P., Borisova O.YU., Kelli E.I. Koklyush (klinika, diagnostika, lechenie): metodicheskie rekomendacii. Moscow: Departament zdavoohraneniya goroda Moskvyy; 2009. (in Russian)
3. Popova O.P., Skirda T.A., Fedorova I.M., Koteleva S.I. Osobennosti specificheskogo gumoral'nogo otveta i citokinovoj regulyacii pri koklyushe u detej. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2015; 20(5): 42-8. (in Russian)
4. He Q., Mertsola J., Himanen J.P., Ruuskanen O., Viljanen M.K. Evaluation of pooled and individual components of Bordetella pertussis as antigens in an enzyme Immunoassay for diagnosis of pertussis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1993; 12(9): 690-5.
5. Mertsola J., Ruuskanen O., Kuronen T., Meurman O., Viljanen M.K. Serologic diagnosis of pertussis: evaluation of pertussis toxin and other antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Infection Diseases*. 1990; 161(5): 966-71.
6. Viljanen M.K., Ruuskanen O., Granberg C., Salmi T.T. Serological diagnosis of pertussis: IgM, IgA and IgG anti-bodies against Bordetella pertussis measured by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 1982; 14(2): 117-22.
7. Giammanco A., Nardone A., Pebody R., Kafatos G., Andrews N., Chiarini A. et al. European sero-epidemiology network 2: standardisation of immunoassay results for pertussis requires homogeneity in the antigenic preparations. *Vaccine*. 2008; 26(35): 4486-93.
8. He Q., Mertsola J., Soini H., Skurnik M., Ruuskanen O., Viljanen M.K. Comparison of polymerase chain reaction with culture and enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993; 31(3): 642-5.
9. Riffelmann M., Thiel K., Schmetz J., Wirsing von Koenig C. H. Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Bordetella pertussis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010; 48(12): 4459-63.
10. Sanz Moreno J.C., de Ory Manchon F., Gonzales A.J., de La Torre J.L., Salmeron F., Limia A. Laboratory diagnosis of pertussis. Role of serology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*. 2002; 20(5): 212-8.
11. Litt D.J., Samuel D., Duncan J., Harnden A., George R.C., Harrison T.G. Detection of anti-pertussis toxin IgG in oral fluids for use in diagnosis and surveillance of Bordetella pertussis infection in children and young adults. *Journal of Medical Microbiology*. 2006; 55(9): 1223-8.
12. Zackrisson G., Lagergard T., Trollfors B., Krantz I. Immunoglobulin A antibodies to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in saliva from patients with pertussis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990; 28(7): 1502-5.

Поступила 18.04.18

Принята к печати 25.05.18

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:578.873.211:577.21.083

Образцова О.А., Вербенко Д.А., Карамова А.Э., Семёнова В.Г., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г.

### СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ЛЕПРЫ ПУТЁМ АМПЛИФИКАЦИИ ВИДОСПЕЦИФИЧНОГО ПОВТОРЯЮЩЕГОСЯ ФРАГМЕНТА ГЕНОМА *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии»  
Минздрава РФ, 107076, Москва, Россия

Сохранение высокого уровня заболеваемости лепрой в ряде государств мира, а также активизация трансграничных миграционных потоков повышают актуальность эффективной диагностики данного заболевания и в странах со sporadic заболеваемостью лепрой, к которым относится Российская Федерация. Цель исследования – разработка высокочувствительного ПЦР-теста для обнаружения генетического материала *Mycobacterium leprae* и сравнение его эффективности с коммерчески доступной тест-системой «Leprosy genesig Standard Kit» (Primerdesign Ltd., Великобритания). Предложенный подход заключался в амплификации участка некодирующего повторяющегося элемента генома *M. leprae* – RLEP. С использованием референсных образцов ДНК патогенных и условно-патогенных микобактерий показана высокая специфичность проводимого анализа, а его сравнение с ПЦР, ориентированной на обнаружение однокопийных генов *M. leprae* (*rrs*, *fbp*, *MntH*), продемонстрировало уменьшение порога детекции, выражаемого количеством циклов амплификации, на котором кривая накопления флуоресцентного сигнала превышала базовый уровень. Использование коммерчески доступной тест-системы, основанной на обнаружении однокопийного гена *rpoB*, обеспечивало 59,4% чувствительность детекции *M. leprae* в клиническом материале, в то время как применение разработанного подхода повысило этот показатель до 96,8%. Разработанная тест-система для ПЦР-диагностики лепры представлена на государственную регистрацию, после чего её практическое использование позволит решить широкий круг задач по выявлению и подтверждению новых случаев лепры, мониторингу эффективности проводимого лечения, а также эпидемиологическому (в том числе трансграничному) мониторингу распространения данного заболевания.

Ключевые слова: лепра; *Mycobacterium leprae*; ПЦР в реальном времени; RLEP.

**Для цитирования:** Образцова О.А., Вербенко Д.А., Карамова А.Э., Семёнова В.Г., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г. Совершенствование ПЦР-диагностики лепры путем амплификации видоспецифичного повторяющегося элемента генома *Mycobacterium leprae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (8): 511-516. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-511-516>

Obraztsova O.A., Verbenko D.A., Karamova A.E., Semenova V.G., Kubanov A.A., Deryabin D.G.

THE REFINEMENT OF LEPROSY PCR DIAGNOSTICS BY THE AMPLIFICATION OF SPECIE-SPECIFIC REPEATED FRAGMENT OF THE MYCOBACTERIUM LEPRAE GENOME.

FGBU "State Scientific Center of Dermatovenereology and Cosmetology" Ministry of Health of Russia, 107076, Moscow, Russia

Certain level of new registered cases of leprosy in a number of endemic countries in the world, as well as growing rate of transboundary migratory flows, raise the issue of effective diagnosis of this disease in countries with sporadic incidence of leprosy, including the Russian Federation. The purpose of the study was to develop a highly sensitive PCR test for detecting the genetic material of *Mycobacterium leprae* and to compare the test robustness and sensitivity with the commercially available Leprosy Genesig Standard Kit (Primerdesign Ltd., UK). The proposed approach uses real time PCR of non-coding repeating element RLEP, unique for the *M. leprae* genome, using TaqMan probe. The high test specificity was shown using the reference DNA samples of pathogenic and conditionally pathogenic mycobacterium, as well and its comparison with single-copy genes of *M. leprae* (*rrs*, *fbp*, *MntH*) PCR detection. The use of a commercially available test system based on the single-copy *rpoB* gene detection provided 59.4% sensitivity to the detection of *M. leprae* in the clinical material, while the application of the developed approach increased this index to 96.8%. The developed PCR diagnostics test of leprosy is submitted for state clinical approval process, whereupon the practical use of the test diagnostics allows solving a wide range of tasks to identify and confirm new cases of leprosy, and monitoring both the effectiveness of leprosy treatment, and epidemiological (including transboundary) the spread of the disease.

Key words: leprosy, *Mycobacterium leprae*, real-time PCR, RLEP

**For citation:** Obraztsova O.A., Verbenko D.A., Karamova A.E., Semenova V.G., Kubanov A.A., Deryabin D.G. The refinement of leprosy PCR diagnostics by the amplification of specie-specific repeated fragment of the *Mycobacterium leprae* genome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (8): 511-516. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-511-516>

**For correspondence:** Deryabin D.G., Dr. Sci. Med., Prof., Head of Department of STD and dermatoses laboratory diagnostics; e-mail: [dgderiyabin@yandex.ru](mailto:dgderiyabin@yandex.ru)

**Information about authors:**

Obraztcova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5728-2139>  
Karamova A.E., <https://orcid.org/0000-0003-3805-8489>  
Deryabin D.G., <https://orcid.org/0000-0002-2495-6694>

Verbenko D.A., <https://orcid.org/0000-0002-1104-7694>  
Kubanov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-7625-0503>

**Conflict of interests.** *The authors declare that they have no conflicts of interest.*

**Acknowledgment.** *The study was supported by a government contract of the Russian Ministry of Healthcare (Project No. 056-00015-18-00).*

Received 28.03.2018  
Accepted 03.04.2018

**Введение.** Лепра (проказа; болезнь Гансена; А30 по МКБ10) – инфекционный гранулематоз, вызываемый *Mycobacterium leprae*. В 2016 г. Всемирная организация здравоохранения сообщила о 216 108 новых случаях лепры, наиболее часто регистрируемых в Бразилии, Индии, ряде государств Экваториальной Африки и Юго-Восточной Азии [1]. Отражением актуальности профилактики, раннего выявления и эффективного лечения лепры явилась разработка целевой стратегии ВОЗ на 2016-2020 годы [2], определяющей основные приоритеты эффективного противодействия этому заболеванию.

В Российской Федерации заболеваемость лепрой на протяжении ряда последних лет имела спорадический характер: в период с 1996 по 2007 г. диагностировано лишь 43 новых случая данного заболевания [3], а в дальнейшем этот показатель находился на нулевых значениях. Вместе с тем активизировавшиеся с начала XXI века миграционные потоки сформировали риски трансграничного переноса *M. leprae* из стран с эндемичными очагами лепры. В этой связи Приказом Министерства здравоохранения РФ от 29 июня 2015 г. № 384н<sup>1</sup> лепра наряду с сифилисом, ВИЧ-инфекцией и туберкулезом включена в перечень инфекционных заболеваний, подлежащих контролю у иностранных граждан и лиц без гражданства, претендующих на проживание или работу в Российской Федерации.

Диагностика лепры не представляет трудностей лишь при поздних стадиях, тогда как выявление ранних форм данного заболевания представляет существенно более сложную задачу и требует интегрального учёта характера кожных проявлений, поражения периферической нервной системы, а также наличия специфических гистологических изменений с обнаружением кислотоустойчивых бактерий (длина 1–8 мкм, ширина 0,3–0,5 мкм) в скарификатах кожи и биоптатах [4]. При этом основной метод лабораторной диагностики при лепре – бактериоскопическое исследование – не всегда информативен, так как требует присутствия значительного количества патогенных бактерий (10<sup>4</sup> на 1 г ткани), а также не позволяет распознать плеоморфные клетки *M. leprae* в покоем состоянии [5]. В результате до половины случаев лепры остаются нераспознанными, что делает их потенциальным источником заражения для окружающих [6].

В связи с невозможностью культивирования *M. leprae* в системах *in vitro* альтернативные методы обнаружения этого возбудителя основываются на анализе генома с использованием ДНК-технологий, в первую очередь полимеразной цепной реакции (ПЦР), в том числе ПЦР в реальном времени [7]. Важным условием для этого стало полногеномное секвенирование

*M. leprae* [8], определившее ряд видоспецифичных генов, пригодных для проведения ДНК-идентификации [9]. В частности, коммерчески доступный набор для диагностики лепры «Leprosy genesig Standard Kit» (Primerdesign Ltd., Великобритания) основан на использовании праймеров к видоспецифичному гену *rpoB*, кодирующему бета-субъединицу РНК-полимеразы *M. leprae* [10]. В Российской Федерации для решения подобной задачи предложены праймеры и зонды к гену *16S rRNA*, обеспечивающие обнаружение генетического материала *M. leprae* в формате ПЦР в реальном времени [11], однако основанный на этом ПЦР-тест до настоящего времени ещё не производится.

Другая возможность идентификации ДНК *M. leprae* определяется обнаружением в её геноме множества некодирующих повторяющихся нуклеотидных последовательностей, объединяемых в четыре семейства (*RLEP*, *REPLEP*, *LEPREP*, *LEPRPT*) и отсутствующих у других представителей семейства *Mycobacteriaceae* [12, 13]. При этом совокупность накапливающихся данных свидетельствует о преимуществах использования подобных повторяющихся элементов с наибольшим показателем копийности (в частности, *RLEP*) в качестве перспективных мишеней для ДНК-диагностики лепры [9, 14].

Целью настоящей работы явилось совершенствование ПЦР-метода обнаружения генетического материала *M. leprae* и сравнение его диагностической эффективности с коммерчески доступным ДНК-тестом при анализе клинического материала от пациентов с диагнозом «А.30. Лепра», зарегистрированных в Российской Федерации в 2015–2017 гг.

**Материал и методы.** При разработке метода использован референсный образец генетического материала *M. leprae*, а в качестве объектов сравнения – ДНК лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv и ряда условно-патогенных микобактерий (*M. scrofulaceum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. avium* и *M. fortuitum*), любезно предоставленных ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук.

Лабораторные испытания проведены с использованием образцов клинического материала больных лепрой, выявленных в Российской Федерации в 2015–2017 гг. Пациентка А, 1967 года рождения, жительница Астраханской области, первично выявлена в ФГБУ «НИИ по изучению лепры» Минздрава России 25.09.2015 г. [15]. Диагноз «А30.5 Лепроматозная лепра, лепра LL (лепра мультибациллярная, лепроматозная форма, активная стадия)» основан на данных клинического осмотра и результатах бактериоскопического исследования. Пациентка Б, 1940 года рождения, уроженка Республики Коми, находилась на обследовании в Сергиево-Посадском филиале ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России 25.04.2016 г., где на основании клинического, патоморфологического и молекулярно-генетического исследования ей был поставлен диагноз «А30.5 Лепроматозная лепра, лепра LL (лепра мультибациллярная, лепроматозная форма, активная стадия). Рецидив» (первичный диагноз 27.04.1995 г.). Подробное описание данного случая представлено нами ранее [16]. Третий случай лепры, протекавшей под «маской» туберкулёза кожи, описан нами 14.03.2017 г. у пациентки В., 1948 года рождения, жительницы Московской области [17]. На основании жалоб, анамнеза, данных осмотра

<sup>1</sup>Приказ Министерства здравоохранения РФ от 29 июня 2015 г. № 384н «Об утверждении перечня инфекционных заболеваний, представляющих опасность для окружающих и являющихся основанием для отказа в выдаче либо аннулирования разрешения на временное проживание иностранных граждан и лиц без гражданства или вида на жительство, или патента, или разрешения на работу в Российской Федерации, а также порядка подтверждения их наличия или отсутствия, а также формы медицинского заключения о наличии (об отсутствии) указанных заболеваний»

**Последовательности праймеров и флуоресцентных зондов (TaqMan-проб), использованных для обнаружения генетического материала *M. leprae***

Участок генома <i>M. leprae</i>	Тип праймера или зонда	Последовательность 5'-3'	Источник
<i>rrs</i>	Прямой	CGGAAAGGTCTCTAAAAAATCTT	[18]
	Обратный	CATCCTGCACCCGCAAAAAGCTT	
	TaqMan-проба	FAM-AATACCGGATAGGACTTCAAGGC-BHQ1	
<i>fbp</i>	Прямой	CCTTACTAGCGAGCTGCCTA	[19]
	Обратный	GCC AGCATAGATGAACTGATC	
	TaqMan-проба	FAM-CTCTCGATGGCCGGTTCCTCGG-BHQ	
<i>mntH</i>	Прямой	CGGCTCACGTCCAGTTTCTTC	[20]
	Обратный	TAAGTGCCCTCGATGTAAGCGG	
	TaqMan-проба	FAM-CCTACTGCCGCGCTCCAGG-BHQ1	
<i>RLEP</i>	Прямой	GCAGCAGTATCGTGTAGTGAA	[25]
	Обратный	CGTAGAAGGTTGCCGAT	
	TaqMan-проба	FAM-CGCCGACGGCCGGATCATCGA-BHQ1	

и физикального и клинико-лабораторного обследования установлен диагноз «А30.3 Пограничная лепра, лепра ВВ (лепра мультибацилярная, пограничная форма, активная стадия)». Полученные от данных пациентов образцы клинического материала (биоптаты кожи) гомогенизировали с использованием автоматической станции TissueLyser II (Qiagen, Германия), после чего выделение ДНК проводили с использованием набора «Проба-НК» (ДНК-технология, Россия) согласно протоколу производителя.

С целью определения оптимальной ДНК-мишени для обнаружения генетического материала *M. leprae* методом ПЦР в реальном времени использовали праймеры и флуоресцентные зонды, последовательности которых приведены в таблице. Конструкция ДНК-зондов, изготовленных по технологии TaqMan-проб, включала флуорофор FAM на 5'-конце олигонуклеотида и гаситель флуоресценции BHQ на 3'-конце. Перечень тестируемых видоспецифичных генов включал *rrs*, кодирующий 16S rRNA данного микроорганизма [18]; *fbp* – ген, кодирующий фибронектин-связывающий белок Ag85B [19] и *mntH*, кодирующий Mn<sup>2+</sup>-транспортный белок *M. leprae* [20]. Аналогичные праймеры и зонды синтезированы к *RLEP*-некодирующей повторяющейся последовательности, присутствующей в геноме *M. leprae* в количестве до 39 копий [21].

Аmplification референсных образцов ДНК и клинических изолятов проводили в идентичных условиях с использованием прибора Quant Studio 5 (Applied Biosystems, США) в пробирках вместимостью 0,2 мл фирмы Ахуген (США). Реакцию осуществляли в 20 мкл смеси, включающей 0,1 мкМ каждого праймера и TaqMan-пробы в объеме 1 мкл; 5 мкл реакционной смеси для ПЦР из коммерчески доступного набора фирмы ЗАО «Евроген» (Россия), а также деионизированную воду. Программа амплификации включала первоначальную денатурацию ДНК в течение 5 мин при температуре 95°C с последующим проведением 40 циклов, состоящих из денатурации при температуре 94°C в течение 10 с, отжига праймеров при 52°C в течение 35 с и элонгации при 72°C в течение 1 мин. Накопление флуоресцентного сигнала, выражаемого значениями RFU (англ. - relative fluorescence units) и сопровождающегося разрушением TaqMan-проб

5'-3'-экзонуклеазной активностью Taq-полимеразы, происходило в режиме реального времени.

Сравнительное ПЦР-исследование клинических образцов проведено с использованием коммерчески доступного набора «Leprosy genesig Standard Kit» (Primerdesign Ltd., Великобритания).

Чувствительность диагностического исследования с использованием известного и предложенного ПЦР-методов оценена в соответствии с ГОСТ Р 53022.3-2008<sup>2</sup>.

**Результаты.** Графики интенсивности флуоресцентного сигнала, накапливаемого в ходе проведения ПЦР в реальном времени с референсными образцами ДНК *M. leprae* и других микобактерий, представлены на рис. 1. Результаты ПЦР в каждой серии экспериментов охарактеризованы значением *Ct* (англ. threshold cycle) – величиной порогового цикла, на котором кривая накопления флуоресцентного сигнала превышала базовый уровень.

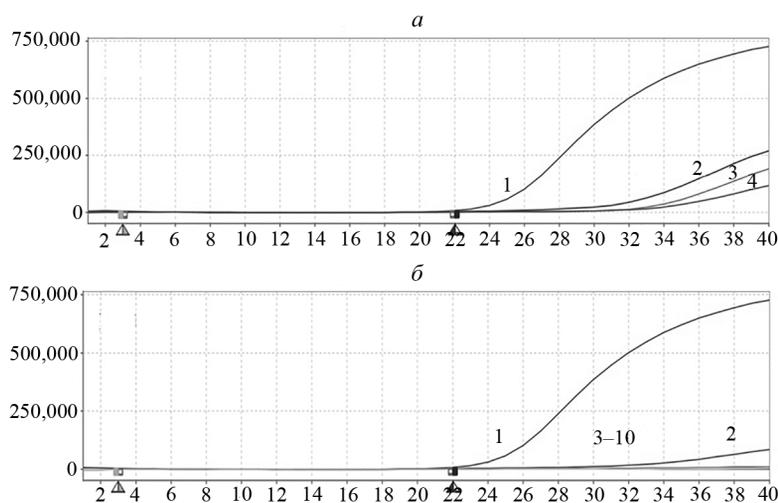


Рис. 1. Графики накопления интенсивности флуоресцентного сигнала (по оси ординат) в зависимости от количества циклов амплификации (по оси абсцисс) при исследовании референсных образцов ДНК.

*a* - амплификация референсного образца ДНК *M. leprae* с использованием праймеров и зондов к *RLEP* (1), гену *MntH* (2), гену *rrs* (3), гену *fbp* (4); *b* - результат использования праймеров и зондов к *RLEP* при амплификации референсного образца ДНК *M. leprae* (1) и некоторых других микобактерий: *M. avium complex* (2); *M. tuberculosis*, *M. scrofulaceum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *xenopi*, *M. gordoniae*, *M. fortuitum* (3–10).

<sup>2</sup>ГОСТ Р 53022.3-2008 Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

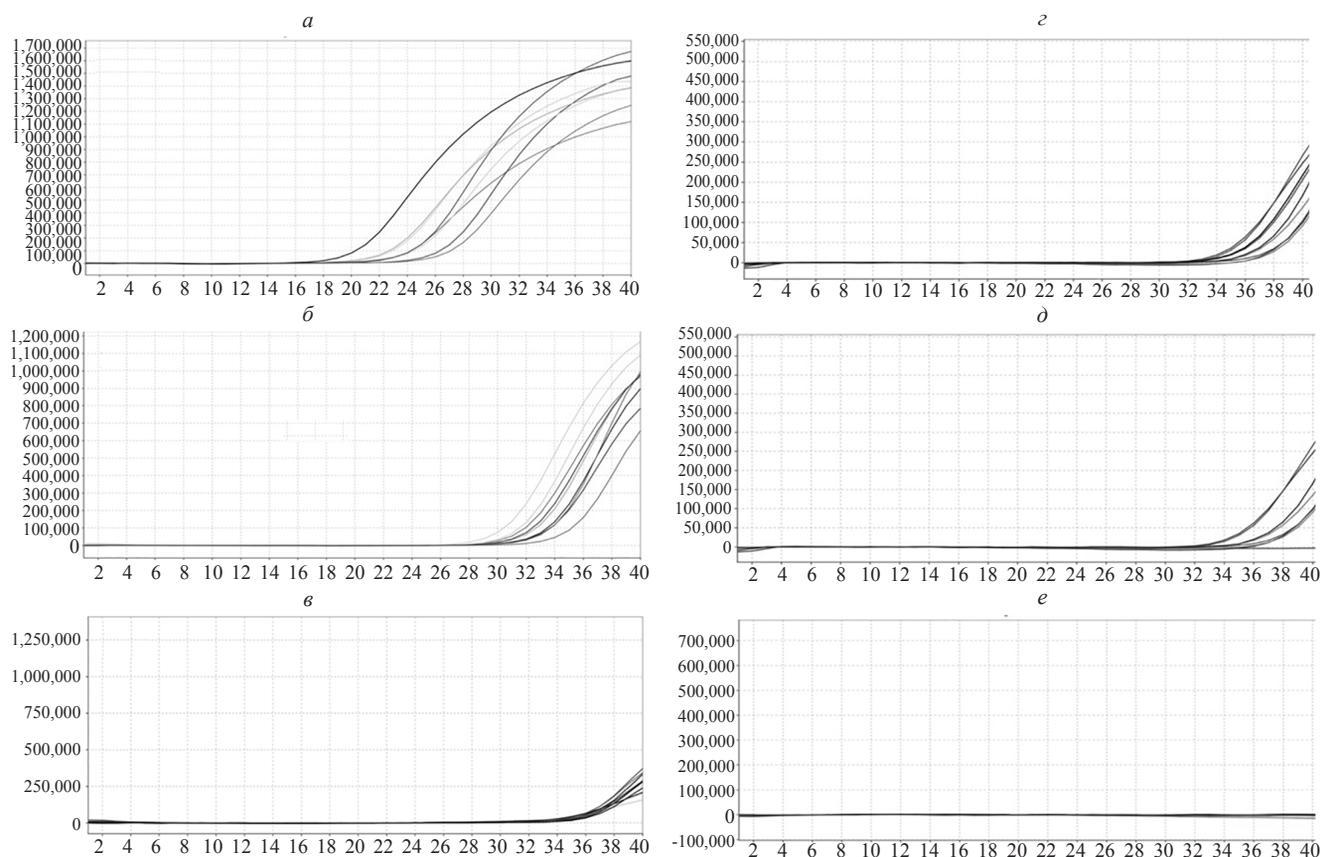


Рис. 2. Графики накопления интенсивности флуоресцентного сигнала (по оси ординат) в зависимости от количества циклов амплификации (по оси абсцисс) при исследовании клинических образцов от пациентов с диагнозом «А30. Лепра».

а, з - клинический материал пациентки А.; б, д - клинический материал пациентки Б.; в, е - клинический материал пациентки В.

Слева - результаты использования праймеров и зондов к *RLEP*; справа - результаты использования тест-системы «Leprosy genesig Standard Kit» (Primerdesign Ltd., Великобритания).

При амплификации некодирующего повторяющегося фрагмента *RLEP* была получена типичная сигмообразная форма накопления сигнала с быстрым и выраженным ростом флуоресценции, характеризуемая  $Ct = 24$ . Детекция последовательностей, расположенных в генах *rrs*, *fbp* и *mntH*, представленных в геноме *M. leprae* одиночными копиями, оказалась менее эффективной, приводя к значениям  $Ct \geq 33$  (рис. 1, а).

Сравнительный анализ генетического материала других патогенных и условно-патогенных представителей семейства *Mycobacteriaceae* (рис. 1, б) подтвердил возможность специфичного обнаружения ДНК *M. leprae* с использованием праймеров и зондов к фрагменту *RLEP*. Время начала быстрого накопления флуоресценции для *M. leprae* не сопровождалось появлением сигнала в пробах с ДНК *M. tuberculosis*, *M. scrofulaceum*, *M. peregrinum*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. goodii* и *M. fortuitum* по крайней мере на протяжении 15 циклов амплификации. Единственным исключением стала проба ДНК *M. avium complex*, увеличение сигнала флуоресценции продукта ПЦР в которой формировалось, однако только на очень поздних циклах амплификации ( $Ct \geq 36$ ) с минимальными отличиями от базового уровня.

Полученные данные свидетельствовали в пользу высокой чувствительности и специфичности предложенного варианта ПЦР-анализа, выполняемого с использованием праймеров и зондов к фрагменту *RLEP*, что послужило основанием для

применения данного подхода в отношении образцов клинического материала больных лепрой, выявленных в Российской Федерации в 2015–2017 гг.

Анализ клинического материала пациентки А. (рис. 2, а) с использованием предложенного метода позволил детектировать присутствие генома *M. leprae* во всех представленных для исследования биологических образцах, по результатам микроскопического исследования на кислотоустойчивые бактерии характеризуемых бактериоскопическим индексом (БИИ) 3,67. При этом определенные значения  $Ct$  варьировали от 20 до 28, оказываясь минимальными в биоптатах из кожных очагов и максимальным – в пробе со слизистой носа, часто используемой в качестве теста на инфицирование *M. leprae*. Анализ тех же проб с использованием коммерчески доступного теста «Leprosy genesig Standard Kit» (Primerdesign Ltd., Великобритания) также приводил к положительному результату ПЦР во всех представленных образцах, однако значения  $Ct$  в данном случае находились в пределах диапазона 33–37, оставаясь минимальными при исследовании биоптатов кожи и максимальными – при исследовании пробы со слизистой носа (рис. 2, з).

Использование предложенного варианта ПЦР для исследования клинического материала пациентки Б. с присутствием немногочисленных кислотоустойчивых микобактерий (БИИ 2+) также позволило оценить все представленные пробы как положительные (рис. 2, б). При этом значения  $Ct$  варьировали от 28 до 34, что согласовывалось с данными о менее значительной бактериальной обсемененности клини-

ческого материала пациентки Б. На этом фоне использование коммерчески доступного ПЦР-теста с праймерами и зондом к гену *rhoB* позволяло обнаружить генетический материал *M. leprae* в девяти из 10 представленных образцов, с превышением базового уровня флуоресценции лишь на 34–39-м циклах амплификации (рис. 2, д).

В образцах клинического материала пациентки В. предвзительно выявлялись единичные гомогенные и фрагментированные кислотоустойчивые микобактерии (БИН 0,3+). При использовании тест-системы «Leprosy genesig Standard Kit» не обнаруживали присутствия *M. leprae* ни в одной из исследованных проб (рис. 2, е), что входило в противоречие с результатами клинического и лабораторного обследования [17]. С другой стороны, применение предложенного метода, хотя и с достижением значения *Ct* на поздних, 36–38-м циклах амплификации, всё-таки позволило выявить наличие генетического материала *M. leprae* в 11 из 12 исследованных проб (рис. 2, в).

Интегральный показатель чувствительности лабораторного исследования с использованием коммерчески доступного теста, основанного на амплификации однокопийного видоспецифичного гена *rhoB*, составил 59,4%, в то время как предложенный вариант ПЦР-анализа с амплификацией некодирующего повторяющегося элемента *RLEP* повышал этот показатель до 96,8%. Дополнительным результатом явилась предварительная констатация обратной зависимости достигаемых значений *Ct* от интенсивности бактериальной обсеменённости исследуемого материала, а также демонстрация возможности использования предложенного метода при детекции следовых количеств *M. leprae*, размножение которых было частично подавлено противотуберкулёзными препаратами, назначенными пациенту В. на основании первичного (ошибочного) диагноза туберкулёза кожи [17].

**Обсуждение.** Метод ПЦР-диагностики лепры впервые был предложен более 25 лет назад [22, 23] и в дальнейшем неоднократно совершенствовался [9, 14, 24]. Важным техническим улучшением стало использование технологии ПЦР в реальном времени, в том числе с применением флуоресцентно-меченных олигонуклеотидных зондов (TaqMan-проб) [13, 18–20, 25]. Существенный прогресс в ДНК-диагностике лепры произошёл после полногеномного секвенирования возбудителя лепры – *M. leprae* [8]. По его результатам было предложено несколько новых мишеней для ПЦР-анализа [7, 26], среди которых наиболее перспективными считаются видоспецифичные некодирующие элементы, представленные в геноме *M. leprae* в количестве до нескольких десятков копий [9, 13, 14].

Проведённое исследование подтвердило эту возможность, развивая представления о *RLEP* – некодирующем повторяющемся элементе генома *Mycobacterium leprae* с наибольшим показателем копийности (до 39 копий на геном) как перспективной мишени для ДНК-диагностики лепры. Полученные результаты продемонстрировали высокую специфичность разработанного варианта ПЦР-анализа, детектирующего исключительно генетический материал возбудителя лепры, при реактивности с референсными образцами ДНК других патогенных и условно-патогенных микобактерий [27]. Кроме того, существенным положительным эффектом использования данного подхода стало значительное повышение чувствительности ПЦР,кратно превосходящее таковую при использовании в качестве мишеней однокопийных генов и позволяющее детектировать фемтограммовые количества ДНК *M. leprae*. В этой связи следует отметить, что определённая нами эффективность ПЦР с использованием праймеров и зондов к фрагменту *RLEP* в том числе превосходила таковую при амплификации последовательности гена *rrs* (16S rRNA), ранее предложенного в качестве мишени для амплификации российскими исследователями [11].

Использование разработанного метода при обследовании пациентов с клиническим диагнозом «А30. Лепра», выявленных в Российской Федерации в 2015–2017 гг. [16, 17] подтвердило его практическую применимость, а сравнение полученных данных с результатами использования коммерчески доступного ПЦР-теста «Leprosy genesig Standard Kit» (Primerdesign Ltd., Великобритания) явилось свидетельством повышенной диагностической чувствительности предложенного подхода. При этом наиболее вероятной причиной достигнутого положительного эффекта является кратное увеличение количества мишеней для амплификации в геноме одной бактериальной клетки, что в итоге позволяет получать положительные результаты ПЦР в биологических пробах с минимальным присутствием *M. leprae* вплоть до образцов с нулевыми значениями бактериоскопического индекса [27].

Объективные ограничения, определяемые небольшим количеством обследованных пациентов и представленных для исследования образцов клинического материала, не позволили в рамках настоящего исследования подробно оценить дополнительные диагностические возможности метода. В то же время сопоставление полученных и литературных данных указывает на высокую степень соответствия результатов ПЦР-анализа показателям бактериоскопического исследования [25], а также на различную чувствительность разработанного метода при оценке мульти- или олигобациллярных форм лепры [27].

Полученные результаты позволяют рекомендовать применение метода ПЦР в реальном времени с использованием праймеров и зондов к повторяющемуся некодирующему элементу генома *Mycobacterium leprae* – *RLEP* в качестве технологического и чувствительного метода лабораторной диагностики, потенциально решающего широкий круг задач по выявлению и подтверждению новых случаев лепры, мониторинга эффективности проводимого лечения, а также эпидемиологического (в том числе трансграничного) мониторинга распространения данного заболевания. Разработанная на этой основе тест-система для ДНК-диагностики лепры представлена для государственной регистрации и в ближайшей перспективе должна стать доступной для практического применения в диагностической практике заинтересованных клиничко-диагностических лабораторий.

**Финансирование.** Исследования выполнены при финансовой поддержке Минздрава РФ (Государственное задание № 056-00015-18-00 на 2018 г. и плановый период 2019 и 2020 гг.).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-2, 5, 7-10, 12-14, 18-28 см. REFERENCES)

- Ющенко А.А., Урляпова Н.Г., Дуйко В.В. Анализ и прогноз эпидемиологической ситуации по лепре в России (по материалам 1951-2000 гг.): аналитический обзор. Астрахань: НИИ по изучению лепры; 2002.
- Скрипкин Ю.К., Бутов Ю.С., Иванов О.Л. Дерматовенерология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013.
- Дуйко В.В. Особенности организации противолепрозных мероприятий в России на современном этапе. *Проблемы социальной гигиены и история медицины*. 2013; 2: 31 – 2.
- Сароянц Л.В., Арнаутова К.Ш., Абрамов Д.Д., Трофимов Д.Ю. Разработка лабораторной диагностики лепры с помощью полимеразной цепной реакции. *Клиническая лабораторная диагностика* 2018; 63 (1): 55-9.
- Выявлен новый случай заболевания лепрой в запущенной стадии. ФГБУ «Научно-исследовательский институт по изучению лепры» Минздрава России. Available at: [http://www.inlep.ru/news/detail.php?ELEMENT\\_ID=51](http://www.inlep.ru/news/detail.php?ELEMENT_ID=51) (accessed 16 Mar 2018)

16. Кубанов А.А., Карамова А.Э., Семенова В.Г., Смольяникова В.А., Нефедова М.А. Рецидив лепры, развившийся после прекращения противолепрозной терапии. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2016; 6: 66-72.
17. Семенова В.Г., Карамова А.Э., Нефедова М.А. Лепра под «маской» туберкулеза кожи — трудности диагностики. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2017; 6: 91-9. 66-72.
18. Braet S., Vandelanoot K., Meehan C.J., Brum Fontes A.N., Hasker E., Rosa P.S., Lucena-Silva N., Rigouts L., Suffys P.N., De Jong B.C. The repetitive element RLEP is a highly specific target for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(3). pii: e01924-17.
19. A new case of leprosy in a neglected stage was revealed. FGBU “Research Institute for the Study of Leprosy” of the Ministry of Health of Russia. Available at: [http://www.inlep.ru/news/detail.php?ELEMENT\\_ID=51](http://www.inlep.ru/news/detail.php?ELEMENT_ID=51) (accessed 28 Mar 2018) (in Russian)
20. Kubanov A.A., Karamova A.E., Semenova V.G., Smolyannikova V.A., Nefedova M.A. Lepra recurrent developed after termination of antileprotic therapy. *Vestnik dermatologii i venerologii*; 2016; (6): 66-72. (in Russian)
21. Semyonova V.G., Karamova A.E., Nefyodova M.A. Leprosy in the Guise of Skin Tuberculosis — Complexities of Diagnostics. *Vestnik dermatologii i venerologii*; 2017; (6): 91-9. (in Russian)
22. Kamble R.R., Shinde V.S., Madhale S.P., Kamble A.A., Ravikumar B.P., Jadhav R.S. Extraction and detection of *Mycobacterium leprae* DNA from ZNCF-stained skin smear slides for better identification of negative skin smears. *Indian J. Med. Microbiol.* 2010; 28(1): 57-9.
23. De Wit T.F.R., Bekelie S., Osland A., Wiele B., Janson A., Thole J. The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family: identification of the genes for the 85A, 85C, and related MPT51 proteins. *Infection and Immunity*. 1993; 61: 3642-7.
24. Cruz A.F., Furini R.B., Roselino A.M. Comparison between microsatellites and MIMnH gene as targets to identify *Mycobacterium leprae* by PCR in leprosy. *An. Bras. Dermatol.* 2011; 86(4): 651-6.
25. Lavania M., Jadhav R., Turankar R.P., Singh I., Nigam A., Sengupta U. Genotyping of *Mycobacterium leprae* strains from a region of high endemic leprosy prevalence in India. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 36: 256-61.
26. Hartskeerl R.A., de Wit M.Y., Klatser P.R. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J. Gen. Microbiol.* 1989; 135: 2357-64.
27. Woods S.A., Cole S.T. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 1989; 53: 305-9.
28. Martinez A.N., Talhari C., Moraes M.O., Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(4): e2655.
29. Martinez A.N., Lahiri R., Pittman T.L., Scollard D., Truman R. et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47: 2124-30.
30. Donoghue H.D., Holton J., Spigelman M. PCR primer that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(2): 177-82.
31. Azevedo M.C., Ramuno N.M., Fachin L.R., Tassa M., Rosa P.S., Belone A.F., Diório S.M., Soares C.T., Garlet G.P., Trombone A.P. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. *Braz. J. Infect. Dis.* 2017; 21(1):71-8.

## REFERENCES

1. World health organization/Leprosy. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/en/> (accessed 28 Mar 2018).
2. WHOSEARO/Department of Control of Neglected Tropical Diseases Operational Manual 2016 – Global Leprosy Strategy 2016–2020. Accelerating towards a leprosy-free world. Eds: Dr E. A. Cooreman/ Leprosy. 2016; 62. ISBN: 978 92 9022 525 6.
3. Yushchenko A. A., Urylapova N. G., Duyko V. V. Analysis and Forecast of the Leprosy Epidemiological Situation in Russia [Analiz i prognoz epidemiologicheskoy situatsii po lepere v Rossii] (po materialam 1951-2000 gg.): analiticheskiy obzor. Astrakhan': NII po izucheniyu lepry; 2002; 43. (in Russian)
4. Skripkina Yu.K., Butov Yu.S., Ivanov O.L. Dermatovenerology. National leadership [Dermatovenerologiya. Natsional'noe rukovodstvo]. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. (in Russian)
5. Lipworth S., Hammond R., Baron V., Hu Y., Coates A., Gillespie S. Defining Dormancy in mycobacterial disease. *Tuberculosis*. 2016;
6. Duyko V.V. Features of the organization of anti leprosy arrangements in Russia at the present stage. *Problemy sotsial'noy gigieny i istoriya meditsiny*. 2013; 2: 31-2. (in Russian)
7. Truman R.W., Andrews P.K., Robbins N.Y., Adams L.B., Krahenbuhl J.L., Gillis T.P. Enumeration of *Mycobacterium leprae* Using Real-Time PCR. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008; 2(11): e328. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000328>
8. Cole S.T., Eiglmeier K., Parkhill J., James K.D., Thomson N.R. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001; 22: 409 (6823): 1007-11.
9. Benjak A., Avanzi C., Singh P., Loiseau C., Girma S., Busso P. et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nature Communications*. 2018; 9; Article number: 352.
10. *Mycobacterium leprae* & M. lepromatosis genesig kit. Available at: <http://www.genesig.com/products/9333-mycobacterium-leprae-m-lepromatosis> (accessed 28 Mar 2018).
11. Saroyants L.V., Arnaudova K.Sh., Abramov D.D., Trofimov D.Yu. The development of laboratory diagnostics of leprosy with the help of polymerase chain reaction. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63 (1): 55-9. (in Russian)
12. Cole S.T., Supply P., Honore N. Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. *Lepr. Rev.* 2001; 72(4): 449-61.
13. Turankar R.P., Pandey S., Lavania M., Singh I., Nigam A., Darlong J., Darlong F., Sengupta U. Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of *Mycobacterium leprae* DNA from clinical and environmental samples. *Int. J. Mycobacteriol.* 2015; 4(1): 54-9.

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 613.863-055.2-055.2:577.21.083

Чукаева И.И., Ганковская Л.В., Плотникова Н.А., Орлова Н.В., Понасенко О.А., Свитич О.А., Спирыкина Я.Г.

## ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА 70 (HSP70) И ЕГО ПОЛИМОРФНОГО МАРКЕРА (+1267A>G) У ЖЕНЩИН ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ДЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

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

Проведено изучение экспрессии гена белка теплового шока 70 (HSP70) и его полиморфного маркера +1267A>G (rs754888705) в гене HSP70 у 32 женщин, подверженных воздействию длительного стресса, под которым подразумевается стационарное лечение ребёнка с онкологическим заболеванием. В группу контроля вошли 25 женщин без воздействия длительного стрессорного фактора. Изучена взаимосвязь уровня экспрессии гена HSP70 у женщин с эпизодами подъёма артериального давления (АД). Средняя продолжительность стресса в группе матерей детей составила 7,3 (2,5–11,5) мес. Выраженность тревоги по HADS в основной группе была значимо повышена и составила 8,7 (7–10) балла, в группе контроля 5 (2–7) баллов. Уровень депрессии в основной группе был достоверно выше и составил 7,7 (7–9) балла, в группе контроля 3,3 (1–5) балла. Сравнение показателей уровня экспрессии гена HSP70 в крови у молодых женщин основной группы с таковыми в контрольной группе показало статистически значимое преобладание экспрессии гена HSP70 в основной группе. Наличие эпизодов повышения АД у женщин, находившихся в стрессовых условиях, не влияло на уровень экспрессии гена HSP70.

Анализ частоты встречаемости аллелей полиморфного маркера в гене HSP70-2 1267A>G (rs754888705) в основной и контрольной группах показал статистически достоверное преобладание аллеля А в группе матерей с воздействием стресса и преобладание аллеля G в контрольной группе. Сравнительный анализ частот генотипов полиморфного маркера в гене HSP70-2 1267A>G (rs754888705) показал, что генотип AA достоверно чаще встречается у матерей с эпизодами повышения АД в сравнении с женщинами без таких эпизодов.

Повышение уровня экспрессии гена HSP70 в лейкоцитах периферической крови у матерей с жизнеугрожающим заболеванием ребёнка свидетельствует о повреждающем воздействии длительного психоэмоционального стресса на клеточном уровне и активации защитной реакции, опосредуемой HSP70. Изучение частоты встречаемости генотипа AA полиморфного маркера A1267G (rs754888705) гена HSP70-2 у женщин на фоне длительного стресса позволит оценить роль генетических факторов в развитии гипертензивных реакций.

**Ключевые слова:** артериальная гипертензия; длительный психоэмоциональный стресс; ген HSP70; экспрессия гена HSP70.

**Для цитирования:** Чукаева И.И., Ганковская Л.В., Плотникова Н.А., Орлова Н.В., Понасенко О.А., Свитич О.А., Спирыкина Я.Г. Изучение экспрессии гена белка теплового шока 70 (HSP70) и его полиморфного маркера (+1267A>G) у женщин при воздействии длительного стресса. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (8): 517-520. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-517-520>

Chukaeva I.I., Gankovskaya L.V., Plotnikova N.A., Orlova N.V., Ponasenko O.A., Svitich O.A., Spiriyakina Ya.G.

### STUDY OF HEAT SHOCK PROTEIN GENE 70 (HSP70) EXPRESSION AND ITS POLYMORPHOUS MARKER (+1267A>G) IN WOMEN UNDER EXPOSURE TO A LONG-TERM STRESS

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

There was studied the HSP70 gene and its polymorphic marker +1267A>G (rs754888705) in the HSP70 gene expression in 32 women under long-term stress, which was caused by inpatient treatment of their oncologic child. A control group included 25 women without long-term stress factors. There was studied a correlation between the expression level of the HSP70 gene in women and their high blood pressure (BP) episodes. The average duration of stress in the group of children's mothers was 7.3 (2.5-11.5) months. Anxiety level according to HADS in the main group was significantly increased and amounted to 8.7 (7-10) points, in the control group 5 (2-7) points. Depression level in the main group was significantly higher and amounted to 7.7 (7-9) points, in the control group 3.3 (1-5) points.

Comparison of the HSP70 gene expression level in blood of young women of the main study group with expression level of this gene in the control group showed a statistically significant predominance of HSP70 gene expression in the main group. The episodes of high BP in women who were under stress conditions did not influence the expression level of the HSP70 gene. Analysis of the alleles of the polymorphic marker frequency in the gene HSP70-2 1267A>G (rs754888705) in the main and control groups showed a statistically significant predominance of allele A in the group of mothers under stress, and predominance of the allele G in the control group. Comparative analysis of the polymorphic marker genotype frequencies in the gene HSP70-2 1267A>G (rs754888705) showed that the AA genotype is significantly more frequent in mothers with episodes of BP increase compared to women without it.

An increased level of the HSP70 gene expression in peripheral blood leukocytes in mothers with a life-threatening disease of their child indicates the damaging effect of long-lasting psychoemotional stress at the cellular level and activation of the protective reaction mediated by HSP70. Studying of the genotype AA characteristics of the polymorphic marker A1267G (rs754888705) of the HSP70-2 gene in women under long-lasting stress will let us evaluate the role of genetic factors in hypertensive reactions development.

**Key words:** hypertension; long-lasting psychoemotional stress; HSP70 gene; HSP70 gene expression.

**Для корреспонденции:** Орлова Наталья Васильевна, д-р мед. наук, проф. каф. поликлинической терапии лечебного факультета; e-mail: vrach315@yandex.ru

**For citation:** Chukaeva I.I. Gankovskaya L.V., Plotnikova N.A., Orlova N.V., Ponasenko O.A., Svitich O.A., Spiryakina Ya.G. Study of heat shock protein gene 70 (HSP70) expression and its polymorphous marker (+ 1267A> G) in women under exposure to a long-term stress. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63(8): 517-520. (in Russ.) DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-517-520>

**For correspondence:** Orlova N.V., Doctor of Medical Sciences, Professor of Outpatient Therapy Department ; e-mail: vrach315@yandex.ru

**Information about authors:**

Gankovskaya L.V., <https://orcid.org/0000-0003-1271-3078>

Plotnikova N.A., <https://orcid.org/0000-0001-5454-9339>

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

Ponasenko O.A., <https://orcid.org/0000-0001-5778-2048>

Svitich O.A., <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

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

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 07.02. 2018

Accepted 11.04.2018

Артериальная гипертензия (АГ), несмотря на современные достижения медицины, является одной из ведущих причин инвалидизации и смертности населения, оставаясь одним из самых распространённых заболеваний, приводящих к инсульту. Выделяют факторы риска развития АГ, связанные с образом жизни и способствующие развитию заболевания, такие как курение, абдоминальное ожирение, повышенное потребление соли, недостаточная физическая активность. На развитие АГ также влияют психосоциальные факторы – длительные стрессовые ситуации, как на работе, так и в семейной жизни [1]. Для профилактики АГ актуальны раннее выявление факторов риска и их коррекция. При развитии АГ в разных возрастных периодах наблюдаются гендерные различия. Распространённость заболевания среди населения с возрастом увеличивается и составляет 60–70% среди лиц старше 60 лет. До 50 лет среди гипертоников преобладают мужчины, а в старшей возрастной категории АГ более распространена среди женщин. К 65 годам заболевание встречается у 50% женщин, а к 75 годам – более чем у 80% [2]. Такую закономерность связывают с изменением гормонального фона в период менопаузы. В то же время факторы риска АГ, присутствующие у женщин до наступления менопаузы, также могут оказывать отсроченное негативное воздействие на развитие гипертонии. Одной из причин нарушения регуляции артериального давления (АД) является воздействие стресса [1]. В жизни современной женщины причины стресса могут быть связаны с кризисной ситуацией в семейной жизни, проблемами со здоровьем, с профессиональной деятельностью. Одним из самых значимых факторов, влияющих на психоэмоциональное состояние женщины, является здоровье её ребенка. Состояние длительного стресса у матери при жизнеугрожающем заболевании ребёнка, таком как онкопатология, выделяется как фактор риска развития в будущем сердечно-сосудистой патологии.

В условиях стресса активация систем организма направлена на адаптацию и носит защитный характер. Однако при длительном воздействии стресса могут развиваться патологические процессы. В развитии АГ под воздействием стресса выделяют роль гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпатико-адреналовой систем. Повышение уровня стрессорных гормонов приводит к гипертензии, связанной с активацией ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, повышением тонуса сосудов, задержкой натрия и воды, увеличением объёма циркулирующей крови. Гуморальные механизмы также участвуют в системном ответе организма на агрессивное воздействие. Один из основных стрессорных гормонов – кортизол при длительном стрессе, кроме АГ,

способствует гипергликемии, снижению иммунной защиты организма. К отрицательному действию повышенной выработки адреналина и пролактина при стрессе относят риск развития раковой патологии [3].

В адаптации к стрессу, наряду с гуморальными факторами, участвуют молекулярные механизмы. При аномально высокой температуре и таких агрессивных воздействиях, как боль, травма, гипоксия, инфекция, токсическое воздействие, вырабатываются особые молекулы – белки теплового шока (БТШ). Они исполняют роль буферной защитной системы при воздействии повреждающих факторов, направленных на стабилизацию клеток. Среди свойств БТШ выделяют регуляцию иммунной системы, направленную на распознавание антигенов, контроль нестабильности белковых молекул, предупреждение белковой агрегации и деградации нестабильных белков [4, 5].

БТШ, участвуя в активации воспалительных и иммунных реакций, могут играть не только защитную роль, но и участвовать в развитии аутоиммунных заболеваний, сахарного диабета, болезни Крона и др. Известно, что высокий уровень циркуляции БТШ у пациентов ассоциирован с развитием сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений, развитием инфарктов и инсультов [6, 7].

Ряд исследований свидетельствует не только о влиянии стресса на экспрессию БТШ, но и об изменении полиморфизма кодирующих генов в условиях агрессивных воздействий [8]. Достаточно хорошо изучены полиморфизмы генов HSP70-1, HSP70-2 и HSP70-НОМ при инфаркте миокарда и инсульте. В то же время данные заболевания, сопровождающиеся оксидативным повреждением, некрозом, воспалительными реакциями, могут рассматриваться как самостоятельные стрессорные повреждающие факторы. Выявлена взаимосвязь полиморфизмов генов БТШ HSP70-2 и HSP70-НОМ с факторами риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ожирение и нарушение толерантности к глюкозе. Выявлена ассоциация аллельных вариантов полиморфного маркера +1267A/G гена HSPA1B с ожирением [9, 10].

Изменения БТШ при психологическом стрессе и их влияние на развитие АГ в настоящее время изучены в меньшей мере. Изучение особенностей генетического профиля и изменений экспрессии гена БТШ у женщин, подверженных длительному стрессу, позволит оценить их роль в риске развития АГ.

Цель данной работы заключалась в исследовании экспрессии гена HSP70 и его полиморфного маркера +1267A>G (rs754888705) в гене HSP70 у женщин, находящихся под воздействием длительного стресса.

**Материал и методы.** В открытое нерандомизированное исследование были включены 32 женщины в возрасте от 26 до 45 лет [35 (32–37,5) лет] – матери детей, находящихся на стационарном лечении в Национальном медицинском исследовательском центре детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, составившие основную группу исследования. В их числе 10 женщин с наличием эпизодов повышения АД – группа 1а и 22 женщины без зафиксированных эпизодов повышения АД – группа 1б. В группу контроля вошли 25 женщин в возрасте от 26 до 47 лет [34 (29–40) лет] без воздействия длительного стрессорного фактора.

Критерии включения: отсутствие АГ в анамнезе, письменное информированное согласие на добровольное участие в исследовании.

Критерии исключения: беременность и период лактации, сахарный диабет 1-го и 2-го типа, системные заболевания, хронические воспалительные заболевания, злокачественные новообразования, приём алкоголя более одного drinkа в неделю, любые клинические состояния, которые по мнению врача могут помешать участию пациента в исследовании, отказ пациента от участия или продолжения участия в исследовании.

Наблюдение пациентов проводилось с января 2016 г. по август 2017 г. в боксированном отделении гематологии/онкологии Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава РФ, на базах кафедры поликлинической терапии лечебного факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России – в ГБУЗ «ГКБ № 13 ДЗМ» и ГБУЗ «ДКЦ № 1 ДЗМ».

От каждого пациента было получено письменное информированное согласие на добровольное участие в исследовании. Исследование было одобрено Этическим комитетом при ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Всем женщинам, помимо принятого общеклинического обследования, проводились антропометрическое обследование (рост, масса тела, расчёт индекса массы тела, окружность талии и бедер), лабораторное исследование (общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови – общий белок, мочевины, креатинин, мочевиная кислота, общий холестерин, липопротеины низкой и высокой плотности (ЛПНП и ЛПВП), триглицериды, АСТ, АЛТ, глюкоза, коагулограмма), ЭКГ в 12 отведениях.

Наличие и выраженность тревоги и депрессии определялись по общепринятой стандартной оценочной Госпитальной шкале тревоги и депрессии (HADS) [11].

Суточное мониторирование АД проводилось на приборе АВРМ -02 (Meditech, Венгрия) с 24-часовой продолжительностью с интервалами измерения 30 мин. Оценивали средние дневные и ночные показатели систолического АД и диастолического АД. В качестве допустимой границы нормы было принято дневное АД 140/90 мм рт.ст. и ночное АД 120/80 мм рт.ст.

Определение уровня экспрессии гена HSP70 и полиморфного маркера данного гена +1267A>G (rs754888705) в группах обследуемых проводилось на базе кафедры иммунологии медико-биологического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Для определения уровня экспрессии гена HSP70 применялся высокотехнологичный метод капельной цифровой ПЦР – DropletDigital (ddPCR™) [12]. Методика выполнялась согласно протоколу производителя с использованием системы QX200™ DropletDigital™ PCR System (Bio-Rad, США) при следующих температурных условиях: 95°C – 5 мин, (95°C – 30 с, 60°C – 1 мин) × 40, 4°C – 5 мин, 90°C – 5 мин. Результаты рассчитываются автоматически и выражаются в количестве копий гена HSP70 на микролитр образца кДНК пациента. Для определения SNP

+1267A>G (rs754888705) в гене HSP70 применялся метод ПЦР-ПДРФ с использованием эндонуклеазы рестрикции PstI (СибЭнзим, РФ). Программа амплификации: 95°C – 5 мин (95°C – 20 с, 61°C – 30 с, 72°C – 20 с) × 40. Праймеры, используемые в работе – 5'-CATCGACTTCTACACGTCCA-3' и 5'-CAAAGTCSTTGAGTCCCAAC-3' [13]. Определение аллельных вариантов в исследуемых образцах осуществлялось путём сравнительного анализа кривых плавления образцов до обработки рестриктазой и после. Перед постановкой данных реакций проводилась экстракция РНК из цельной крови пациенток с использованием набора «АмплиСенс РИБО-сорб» (ИнтерЛабСервис, РФ) и проведение реакции обратной транскрипции для получения кДНК с применением набора «ОТ-1» (Синтол, РФ) согласно протоколам производителей.

При статистической обработке полученных результатов использовали пакет прикладных программ для научно-технических расчётов Statistical10. Проводился расчёт частот встречаемости генотипов и аллелей в исследуемой выборке, отношение шансов (OR). Данные представлены в виде Ме (медиана), 25–75 % процентиля. Для сравнения независимых выборок использовали критерии Манна – Уитни и Фишера. Статистически значимыми считали различия данных при  $p < 0,05$  [14].

**Результаты.** Средняя продолжительность стресса в группе матерей составила 7,3 (2,5–11,5) мес. Выраженность тревоги по HADS в основной группе (1а и 1б) была значимо повышена и составила 8,7 (7–10) баллов, в группе контроля – 5 (2–7) баллов ( $p < 0,05$ ). Уровень депрессии в основной группе был достоверно выше и составил 7,7 (7–9) баллов, в группе контроля 3,3 (1–5) балла ( $p < 0,05$ ).

Сравнение уровней экспрессии гена HSP70 лейкоцитов периферической крови молодых женщин основной группы с уровнем экспрессии данного гена в контрольной группе показало статистически значимое преобладание экспрессии гена HSP70 в основной группе. Уровень экспрессии гена HSP70 у пациенток основной группы составил 1880 копий/мкл, контрольной группы – 1022 копий/мкл. Медиана уровня экспрессии гена HSP70 в основной группе достоверно превышает значение контрольной группы в 1,86 раза ( $p < 0,001$ ).

Сравнительный анализ уровня экспрессии гена HSP70 у женщин, подверженных длительному стрессу как с эпизодами подъёма АД, так и без них (группа 1а и группа 1б), не выявил статистически значимых различий в уровне экспрессии гена HSP70 лейкоцитов периферической крови ( $p > 0,05$ ). Медиана уровня экспрессии данного гена у пациенток с эпизодами повышения АД (группа 1а) – 1895,87 копий гена HSP70/мкл, у женщин без таких эпизодов (группа 1б) – 1880,63 копий гена HSP70/мкл, в группе контроля – 1022,00 копий гена HSP70/мкл.

Распределение частот встречаемости генотипов и аллелей полиморфного маркера в гене HSP70-2 1267A>G (rs754888705) в основной и контрольной группах показало, что в основной группе чаще встречается как аллельный вариант AA (OR = 4,018, 95% CI (1,161–13,904),  $p = 0,03768$ ), так и аллельный вариант AG (OR = 5,625, 95% CI (1,178–26,855),  $p = 0,03542$ ) исследуемого полиморфного маркера (см. таблицу).

Проведение сравнительного анализа частот генотипов полиморфного маркера в гене HSP70-2 1267A>G (rs754888705) в группах 1а, 1б и контрольной группе выявило, что генотип AA достоверно чаще встречается в группе 1а – женщин с эпизодами повышения АД по сравнению с другими группами (двусторонний критерий Фишера OR = 17,143, 95% CI (1,781–164,977),  $p = 0,00592$ ). Генотип AG в 3 раза чаще встречался в выборке пациенток из группы 1б ( $p = 0,06131$ ), но статистически значимых различий не было получено. Аллельный вариант GG преобладал в контрольной группе.

Анализ частоты встречаемости аллелей полиморфного

**Распределение частот встречаемости генотипов и аллелей полиморфного маркера в гене HSP70-2 1267A>G (rs754888705) в основной и контрольной группах**

Аллельный вариант 1267A>G (rs754888705) и его аллели	Основная группа	Контрольная группа	$p < 0,05$
AA	0,47*	0,28	0,03768
AG	0,28*	0,12	0,03542
GG	0,25	0,60	N/S
A	0,61*	0,34	0,00497
G	0,39	0,66	N/S

Примечание. \* –  $p < 0,05$ ;  $p$  – достоверность различий при сравнении показателей у пациентов основной и контрольной групп.

маркера в гене HSP70-2 1267A>G (rs754888705) в основной и контрольной группах показал статистически достоверное преобладание аллеля А в основной группе (OR = 3,028, 95% CI (1,401–6,547),  $p = 0,00497$ ), в контрольной группе чаще встречается аллель G (см. таблицу). Соответственно аллель А достоверно чаще встречается в группе 1а ( $p = 0,00015$ ), а аллель G – в контрольной группе.

**Обсуждение.** В ряде исследований показано, что длительный стресс и эмоциональное неблагополучие оказывают влияние на формирование стойкого повышения АД и могут приводить к развитию АГ [15].

По данным ряда авторов, существует ассоциация HSP70 с сердечно-сосудистыми заболеваниями, включая гипертонию [6, 16, 17]. В проведенном нами исследовании в группе лиц с длительным психоэмоциональным стрессом значимо преобладал уровень экспрессии гена HSP70 лейкоцитов периферической крови. Результаты исследования согласуются с данными, полученными M. Isosaki и соавт. [18]. Психологический стресс вызывал повышение уровня экспрессии мРНК HSP70 в аорте крыс, но почти не влиял на экспрессию гена HSP70 в других тканях. Данный результат позволяет сказать, что при психологическом стрессе создаются условия для повышения экспрессии гена HSP70 и в первую очередь это наблюдается в крупных сосудах, таких как аорта, что может влиять на уровень АД [18].

При анализе частоты встречаемости полиморфного маркера 1267 A>G (rs754888705) гена HSP70-2 в группе женщин с периодическими эпизодами повышения АД выявлено статистически значимое преобладание аллельного варианта AA. Это может говорить о предрасположенности носителей данного генотипа к повышению АД в условиях длительного стресса.

**Заключение.** Выявлено повышение уровня экспрессии гена HSP70 в лейкоцитах периферической крови у женщин репродуктивного возраста под воздействием длительного психоэмоционального стресса.

Анализ частоты встречаемости аллелей полиморфного маркера в гене HSP70-2 1267A>G (rs754888705) в основной и контрольной группах показал статистически достоверное преобладание аллеля А в группе матерей с воздействием длительного психоэмоционального стресса и преобладание аллеля G в контрольной группе.

Сравнительный анализ частот генотипов полиморфного маркера в гене HSP70-2 1267A>G (rs754888705) выявил достоверное увеличение частоты встречаемости генотипа AA у матерей с эпизодами повышения АД в сравнении с женщинами без таких эпизодов. Дальнейшие исследования могут позволить рассматривать полиморфный маркер 1267A>G (rs754888705) в качестве предиктора риска развития гипертензивных реакций у женщин при воздействии длительного стресса.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 4-8, 10-13, 15-18

см. REFERENCES)

- Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. Стратегия профилактики сердечно-сосудистых заболеваний в Российской Федерации. *Клиническая медицина*. 2012; 3: 4-7.
- Судаков К.В., Умрюхин П.Е. *Системные основы эмоционального стресса*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
- Шевченко А.В., Голованова О.В., Коненков В.И., Воевода М.И., Максимов В.Н. Особенности полиморфизма HSP70-2 и HSP70-hom генов у пациентов с инфарктом миокарда в анамнезе. *Медицинская иммунология*. 2011; 13(1): 87-92.
- Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика; 1998.

REFERENCES

- 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts). *European Heart Journal*. 2016; 37 (29): 2315-81.
- Oganov R.G., Maslennikova G.Ya. Strategy of prevention of cardiovascular diseases in the Russian Federation. *Klinicheskaya meditsina*. 2012; 3: 4-7. (in Russian)
- Sudakov K.V., Umryukhin P.E. Systemic foundations of emotional stress. [Sistemnye osnovy emotsional'nogo stressa]. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. (in Russian)
- Schlesinger M.J. Heat shock proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265(21): 12111-4.
- Hickman-Miller H., Hildebrand W. The immune response under stress: the role of HSP-derived peptides. *Trends in Immunology*. 2004; 25: 427-33.
- Pockley A.G., Georgiades A., Thulin T., Faire U., Frostegard J. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subject with established hypertension. *Hypertension*. 2003; 42: 235-8.
- Kamna Srivastava , Rajiv Narang, Jagriti Bhatia, Daman Saluja. Expression of Heat Shock Protein 70 Gene and Its Correlation with Inflammatory Markers in Essential Hypertension. *PLoS One*. 2016; 11(3): 1-15.
- Eissler R., Schmaderer C., Rusai K. Hypertension augments cardiac Toll-like receptor 4 expression and activity. *Hypertension Research*. 2011; 34: 551-8.
- Shevchenko A.V., Golovanova O.V., Konenkov V.I., Voyevoda M.I., Maximov V.N. Features of the polymorphism of HSP70-2 and HSP70-hom genes in patients with a history of myocardial infarction. *Meditsinskaya immunologiya*. 2011; 13 (1): 87-92. (in Russian)
- Mardan-Nik M., Pasdar A., Jamialahmadi K., Avan A., Mohebbati M., Esmaily H. et al. Association of heat shock protein70-2 (HSP70-2) gene polymorphism with obesity. *Annals of Human Biology*. 2016; 43: 542-6.
- Zigmond A., Snaith R. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatrica Scand*. 1983; 67(6): 361-70.
- Zmienko A., Samelak-Czajka A., Goralski M., Sobieszczuk-Nowicka E., Kozlowski P., Figlerowicz M. Selection of reference genes for qPCR- and ddPCR-based analyses of gene expression in Senescing Barley leaves. *PLoS One*. 2015; 10(2): 1-16.
- Chen J., Ren J.-A., Han G., Gu G.S., Wang G.F., Wu X.W. et al. Polymorphism of heat shock protein 70-2 and enterocutaneous fistula in Chinese population. *World Journal of Gastroenterology*. 2014; 20(35): 12559-65.
- Glants S. *Medico-biological statistics [Mediko-biologicheskaya statistika]*. Moscow: Praktika; 1998. (in Russian)
- Crippa G., Bertoletti P., Bettinardi O., Calandra G., Carrara G.C. Psychological construct associated with emotional blood pressure response and white coat hypertension. *Ann. Ital. Med. Int.* 2000; 15 (4): 250-4.
- Li J.X., Tang B.P., Sun H.P., Feng M., Cheng Z.H., Niu W.Q. Interacting contribution of the five polymorphisms in three genes of HSP70 family to essential hypertension in Uyghur ethnicity. *Cell Stress and Chaperones*. 2009; 14: 355-62.
- Vargas-Alarcon G., Londono J.D., Hernandez-Pacheco G., Gamboa R., Castillo E., Pacheco-Tena C. et al. Heat shock protein 70 gene polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthropathies. *Ann. Rheum. Dis*. 2002; 6: 48-51.
- Isosaki M., Nakashima T. Psychological stress induces heat shock protein 70 expression in rat aorta. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 1998; 76: 305-8.

Поступила 07.02.18

Принята к печати 11.04.18