

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

10 • 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

ОКТАБРЬ

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](mailto: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 21.11.2018.

Подписано в печать 27.11.2018.

Формат 60 × 88½.

Печать офсетная.

Печ. л. 9,00

Уч.-изд. л. 9,67.

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

**WWW страница: [www.medlit.ru](http://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.wakc.ru](http://www.wakc.ru),**

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

**Подписка на электронную версию:**

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

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.  
2018. № 10. 593–664.

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:**

**Главный редактор В. Н. ТИТОВ**

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

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:**

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO  
"MEDITSINA"

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

# D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 63  
10 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

OCTOBER

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. MAVZYTОВ (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), D.D. MEN'SHIKOV (*Moscow*), V.I. NIGULYANU (*Kishinev*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOV (*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKIY (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. KHOROVSKAYA (*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

## БИОХИМИЯ

- Титов В.Н., Ариповский А.В., Сажина Н.Н., Евтеева Н.М., Калинин А.В., Иванов Г.А. Человек в филогенезе не всеядный (*Omnivores*), а травоядный (*Herbivores*) с плотоядным (*Carnivores*) прошлым и нечётким будущим. Биологическая функция трофологии (питания) в онтогенезе ..... 596
- Пешков М.Н. Эпигенетические маркеры ранней диагностики рака предстательной железы. .... 605
- Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А., Михельсон А.А., Михельсон А.Ф., Лебедеко Е.Ю., Аллилуев И.А. Влияние дисбаланса аминокислот в организме матери и плода на формирование недостаточности плаценты и течение неонатального периода ..... 610
- Белов М.С., Певнев А.А., Рябиков Д.В., Яковлев А.Ю. К вопросу о лабораторной диагностике жировой глобулемии. .... 615

## ИММУНОЛОГИЯ

- Лахтин М. В., Лахтин В. М., Афанасьев С. С., Алёшкин В. А., Миронов А. Ю. Лектины и гликоконъюгаты в презентации антигенов и защите от патогенов (обзор литературы) ..... 619
- Хараева З.Ф., Хоконова Т.М., Камбачокова З.А., Барокова Е.Б., Накова Л.В. Сывороточные значения цитокинов у пациентов с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией. .... 626

## МИКРОБИОЛОГИЯ

- Горбатов А.А., Соловьёв П.В., Баранова Е.В., Титарёва Г.М., Куликалова Е.С., Бикетов С.Ф., Мазепа А.В. Сравнительное исследование экспериментальных и коммерческих серологических тестов для определения противотуляремийных антител у людей. .... 630
- Синицкий М. Ю., Асанов М. А., Тхоренко Б. А., Одаренко Ю. Н., Понасенко А.В. Микрофлора периферической крови пациентов с инфекционным эндокардитом ..... 636
- Сперанская Е. В., Бруснигина Н. Ф., Ефимов Е. И., Самохина Л.П. Опыт применения метода пцр для выявления возбудителей внебольничной пневмонии у военнослужащих ..... 641
- Шамина О. В., Крыжановская О. А., Лазарева А. В., Поликарпова С. В., Карасёва О. В., Чеботарь И. В., Маянский Н. А. Сравнение методов определения устойчивости к колистину у карбапенемрезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* .. 646

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Леденева М.Л., Ткаченко Г.А., Батурич А.А., Шпак И.М., Плеханова Н.Г. Разработка и применение набора реагентов для выявления РНК возбудителей мелиоидоза и сапа на основе транскрипционной амплификации (NASBA) в режиме реального времени. .... 651
- Межгинский С.С., Шилова Н.А., Чаша Т.В., Фетисова И.Н., Харламова Н.В., Ратникова С.Ю., Фетисов Н.С. Полиморфизм генов системы детоксикации у глубоко недоношенных детей с бронхолегочной дисплазией ..... 658

## ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ

- Екатерина Андреевна Кост (к 130-летию со дня рождения) 661

## BIOCHEMISTRY

- Titov V.N., Aripovsky A.V., Sazhina N.N., Evteeva N.M., Kalinin A.V., Ivanov G.A. The person in phylogenesis is not (*Omnivores*), but the *Herbivores* with the *carnivores* past and the fuzzy future. Biological function of trophology (nutrition) in ontogenesis ..... 596
- Peshkov M.N. Epigenetic markers of early diagnostics of prostate cancer ..... 605
- Pogorelova T.N., Gunko V.O., Nikashina A.A., Mikhelson A.A., Mikhelson A.F., Lebedenko E.Yu., Alliluev I.A. Influence of amino acid imbalance in maternal and fetal organisms on the development of placental insufficiency and the course of the neonatal period ..... 610
- Belous M.S., Pevnev A.A., Ryabikov D.V., Yakovlev A. Yu. To the question of laboratory diagnostics of fat droplets ..... 615

## IMMUNOLOGY

- Lakhtin M. V., Lakhtin V. M., Afanasiev S. S., Aleshkin V. A., Mironov A. Yu. Lectins and glycoconjugates in presentation of antigens and protection against pathogens ..... 619
- Kharaeva Z.F., Khokonova T.M., Kambachokova Z.A., Barokova E.B., Nakova L.V. Serum values of cytokines in patients with ischemic heart disease and arterial hypertension ..... 626

## MICROBIOLOGY

- Gorbatov A.A., Soloviev P.V., Baranova E.V., Titareva G.M., Kulikalova E.S., Biketov S.F., Mazepa A.V. A comparative study of experimental and commercial serological tests for detection of antibodies in humans with tularemia ..... 630
- Sinitzky M. Yu., Asanov M. A., Tkhorenko B. A., Odarenko Y.N., Ponasenko A. V. Microflora of peripheral blood obtained from patients with infective endocarditis ..... 636
- Speranskaya E. V., Brusnigina N. F., Efimov E. I., Samokhina L. P. Experience of application of the pcr for identification of the causative agent of community acquired pneumonia in the military ..... 641
- Shamina O. V., Kryzhanovskaya O. A., Lazareva A. V., Polikarpova S. V., Karaseva O. V., Chebotar I. V., Mayanskiy N. A. The comparison of methods for determination of colistin susceptibility in carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* ..... 646

## CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Ledenyova M. L., Tkachenko G. A., Baturin A. A., Shpak I. M., Plekhanova N. G. The development and application of reagents kit for detection RNA of the causative agents of melioidosis and glanders by transcription-based amplification (NASBA) in real-time ..... 651
- Mezhinskij S.S., Shilova N.A., Chasha T.V., Fetisova I.N., Harlamova N.V., Ratnikova S.Yu., Fetisov N.S. The polymorphism of detoxification system genes in very preterm infants with bronchopulmonary dysplasia ..... 658

## MEMORABLE DATES

- Ekaterina Andreevna Kost (on the occasion 130th anniversary) 661

## БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.3:575.16

Титов В.Н.<sup>1</sup>, Ариповский А.В.<sup>2</sup>, Сажина Н.Н.<sup>3</sup>, Евтеева Н.М.<sup>3</sup>, Калинин А.В.<sup>4</sup>, Иванов Г.А.<sup>5</sup>

### ЧЕЛОВЕК В ФИЛОГЕНЕЗЕ НЕ ВСЕЯДНЫЙ (OMNIVORES), А ТРАВояДНЫЙ (HERBIVORES) С ПЛОТояДНЫМ (CARNIVORES) ПРОШЛЫМ И НЕЧЕТКИМ БУДУЩИМ. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ ТРОФОЛОГИИ (ПИТАНИЯ) В ОНТОГЕНЕЗЕ

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, 121552, Москва;

<sup>2</sup>ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Госсанэпиднадзора РФ, 142279, Оболенск, Московская область;

<sup>3</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва;

<sup>4</sup>ФГБУН «Институт спектроскопии» РАН РФ, 142190, Москва, Троицк;

<sup>5</sup>ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова», 163051, Архангельск

Согласно филогенетической теории общей патологии, за миллиарды лет сформировались семь биологических функций: биологическая функция трофологии, питания; функция гомеостаза; биологическая функция эндоекологии; функция адаптации; функция продолжения вида; функция локомоции и когнитивная биологическая функция, включая интеллект. Миллионы лет при жизни последовательно в водах нескольких океанов все предки человека были плотоядными (Carnivores), рыбающими млекопитающими. Когда океан отступил и плотоядные (рыбающие) оказались на суше, каждая особь приватизировала «кусочек» океана. Животные преобразовали его в пул межклеточной среды *in vivo*. Биологическая роль позднего в филогенезе инсулина состоит в становлении *in vivo* новых биологических функций. Действие инсулина превратило плотоядных (рыбающих) океана в травоядные (Herbivores) виды на суше. Произошло это путем синтеза *in vivo* из экзогенной глюкозы жирных кислот (ЖК). Регуляторным действием инсулина явилось направленное превращение экзогенной глюкозы в  $\omega$ -6 C18:1 цис-олеиновую ЖК. Инсулин поздно в филогенезе экспрессировал синтез новых, сопряженных ферментов: это пальмитоил-КоА-элонгаза и стеарил-КоА-дегидрогеназа. Два фермента осуществили синтез ЖК по пути: синтезированная *in situ de novo* из экзогенной глюкозы, C16:0 пальмитиновая ЖК → C18:0 стеариновая ЖК →  $\omega$ -6 C18:1 цис-олеиновая ЖК без накопления стеариновой насыщенной ЖК (НЖК). Инсулин не превращает в олеиновую ЖК экзогенную пальмитиновую НЖК из плотоядной пищи. На суше действие инсулина превратил вид *Homo sapiens* в травоядный, но с плотоядным, рыбающим, прошлым. Представление о человеке как о всеядном (Omnivores) – nonsense; такие виды природа не формировала. Нарушение функции питания, биологической реакции экзотрофии (внешнего питания), является этиологической и патогенетической основой семи метаболических пандемий, болезней цивилизации: атеросклероз и атероматоз; метаболическая артериальная гипертензия; метаболический синдром; ожирение; синдром резистентности к инсулину; неалкогольная жировая болезнь печени; эндогенная гиперурикемия. Первичная профилактика метаболических пандемий в биологической функции питания, в биологических реакциях экзо- и эндотрофии позволит понять теоретические основы и реализацию профилактических действий, которые определяют особенности питания в будущем.

Ключевые слова: трофология; экзо- и эндотрофия; инсулин; жирные кислоты; глюкоза.

Для цитирования: Титов В.Н., Ариповский А.В., Сажина Н.Н., Евтеева Н.М., Калинин А.В., Иванов Г.А. Человек в филогенезе не всеядный (Omnivores), а травоядный (Herbivores) с плотоядным (Carnivores) прошлым и нечетким будущим. Биологическая функция трофологии (питания) в онтогенезе. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 596-604. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-596-604>

Titov V.N.<sup>1</sup>, Aripovsky A.V.<sup>2</sup>, Sazhina N.N.<sup>3</sup>, Evteeva N.M.<sup>3</sup>, Kalinin A.V.<sup>4</sup>, Ivanov G.A.<sup>5</sup>

THE PERSON IN PHILOGENESIS IS NOT (OMNIVORES), BUT THE HERBIVORES WITH THE CARNIVORES PAST AND THE FUZZY FUTURE. BIOLOGICAL FUNCTION OF TROPHOLOGY (NUTRITION) IN ONTOGENESIS

<sup>1</sup>National Medical Research Center of Cardiology of the Ministry of Health of Russia, 121552, Moscow;

<sup>2</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Gossanepidnadzor RF, 142279, Obolensk, Moscow Region;

<sup>3</sup>Institute of Biochemical Physics. N.M. Emanuel RAS, Moscow

<sup>4</sup>Institute of Spectroscopy, Russian Academy of Sciences, 142190, Moscow, Troitsk

<sup>5</sup>«Northern (Arctic) Federal University. M.V. Lomonosov», Arkhangelsk

According to the phylogenetic theory of general pathology, seven biological functions have been formed over billions of years. 1. biological function of trophology, nutrition; 2. homeostasis function; 3. biological function of endoecology; 4. function of adaptation; 5. function of the continuation of the species; 6. function of locomotion and 7. cognitive biological function, including intelligence. Millions of years in life consistently in the waters of several oceans, all the ancestors of man were carnivorous (Carnivores), fish-eating mammals. When the ocean retreated and the carnivorous (fish-eating) were on land, each individual

privatized a "piece" of the ocean. Animals transformed it into a pool of intercellular medium *in vivo*. The biological role of the late in the phylogeny of insulin is the formation of new biological functions *in vivo*. The action of insulin has transformed the carnivorous (fish-eating) ocean into herbivorous (Herbivores) species on land. There was it by synthesis *in vivo* from exogenous glucose of fatty acids (FA). Regulatory action of insulin was the directed conversion of exogenous glucose into  $\omega$ -6 C18: 1 cis-oleic FA. Insulin late in phylogeny expressed the synthesis of new, conjugated enzymes: it is palmitoyl-CoA-elongase and stearyl-CoA-desaturase. Two enzymes synthesized FAs along the way: synthesized *in situ de novo*, from exogenous glucose, C16: 0 palmitic acid  $\rightarrow$  C18: 0 stearic acid  $\rightarrow$   $\omega$ -6 C18: 1 cis-oleic acid without accumulation of stearic FA. Insulin is not converted into an oleic FA exogenous palmitic acid from carnivorous food. On land, the action of insulin transformed the species *Homo sapiens*, into a herbivore, but with carnivorous, fish-eating, past. The idea of a person as omnivorous (Omnivor) - nonsense; such forms of nature did not form. Violation of the function of nutrition, the biological reaction of exotrophy (external nutrition), is the etiological and pathogenetic basis of the seven metabolic pandemics, the diseases of civilization. 1. Atherosclerosis and atheromatosis; 2. metabolic arterial hypertension; 3. metabolic syndrome; 4. obesity; 5. syndrome of insulin resistance; 6. non-alcoholic fatty liver disease and 7. endogenous hyperuricemia. The primary prevention of metabolic pandemics in the biological function of nutrition, in the biological reactions of exo- and endotrophy, will allow us to understand the theoretical bases and implementation of preventive actions that will determine the characteristics of nutrition in the future.

**Key words:** trophology, exo- and endotrophy, insulin, fatty acids, glucose.

**For correspondence:** Titov V.N., doctor of medical sciences, professor; e-mail: [vn\\_titov@mail.ru](mailto:vn_titov@mail.ru)

**For citation:** Titov V.N., Aripovsky A.V., Сажина N.N., Evteeva N.M, Kalinin A.V., Ivanov G.A. The person in phylogenesis is not (omnivores), but the herbivores with the carnivores past and the fuzzy future. Biological function of trophology (nutrition) in ontogenesis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (10): 596-604 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-596-604>

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

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

Received 17.09.2018  
Accepted 07.10.2018

Во всех развитых странах мира по летальности доминирует патология сердечнососудистой системы. В то же время по частоте в популяциях «лидируют» нарушения биологической функции трофологии, питания. Согласно филогенетической теории общей патологии [1], на ступенях филогенеза в течение четырех миллиардов лет последовательно сформировались семь биологических функций: биологическая функция трофологии, питания; функция гомеостаза; биологическая функция эндозкологии; функция адаптации; биологическая функция продолжения вида; функция локомоции; когнитивная биологическая функция, включая интеллект. Среди всех биологических функций *in vivo* на первое место мы поставили функцию питания.

С позиций филогенетической теории общей патологии, нарушение функции питания, биологической реакции экзотрофии (внешнего питания), является филогенетической (этиологической) и патогенетической основой всех семи метаболических пандемий, болезней цивилизации [2]. Ими являются: атеросклероз и атероматоз [3], метаболическая артериальная гипертензия, метаболический синдром, ожирение, синдром резистентности к инсулину (синдром ИР), неалкогольная жировая болезнь печени [4], эндогенная гиперурикемия [5].

В теории общей патологии филогенез рассмотрен как единый анамнез всего живого на планете Земля в непрерывном развитии. Филогенетическая теория общей патологии предложена нами через 160 лет после «клеточной теории» Р. Вирхова. Онтогенез же — это анамнез особи каждого из биологических видов, в том числе и *Homo sapiens*. Согласно биологическому постулату Э. Геккеля, каждая особь в онтогенезе своём повторяет (проходит) основные этапы филогенеза.

Биологическую функцию питания реализуют две последовательные биологические реакции: а) биологическая реакция экзотрофии (внешнее питание), продолжается она 4–6 ч после приёма пищи (постпрандиальный период) и б) биологическая реакция экзотрофии (внутреннее питание), продолжительность её существенно больше. Биологическая реакция эндотрофии продолжается всё время, пока нет приёма пищи: во время сна, в реакции гибернации (зимняя спячка) и при

голодании. В стремлении понять этиологию и патогенез нарушений биологической функции питания, становление её на ступенях филогенеза используют порой сомнительные представления. Это сдерживает формирование новых идей, которые могут изменить «течение вещей», современные представления о биологии, о медицине как науках исторических [6] и конкретно – о биологической функции трофологии.

*Представление первое.* Создан человек на шестой день сотворения мира по «образу и подобию». Реально же длительность «шестого дня» составляла  $\approx$  четыре миллиарда лет. Каждая из биологических функций и биологических реакций, которые сформировались на основе физической химии и общей биологии, претерпели в филогенезе много последовательных превращений. Происходило это на основе принципа преемственности становления в филогенезе биологических функций и биологических реакций согласно филогенетической теории общей патологии и единой технологии становления в филогенезе функциональных систем [7].

По образу и подобию чего создан человек? Всё в мире было эфемерно, вернее, ничего не было, кроме органических молекул геохимического происхождения, коацерватных капель и взаимодействия молекул по типу «ощупывания», аффинности; часть молекул по физико-химическим параметрам изначально являются уникальными. Они-то и определили направленность отдельных этапов эволюции. Активные физико-химические взаимодействия молекул на миллионы лет опередили начальные биохимические реакции.

*Представление второе.* Как и иные авторы [8], мы полагаем, что нет оснований сравнивать функцию организма с машинами. Когда авторы создавали какой-то механизм, они изначально определяли его назначенной, оптимальную конструкцию. Физическая химия, биология же, формируя в филогенезе биологические функции и реакции, не имели понятия ни о целесообразности, ни о будущем того, что может быть совершено. Поэтому не все физиологические процессы регуляции *in vivo*, которые сформировались раздельно на трех уровнях относительного биологического совершенства, являются функционально оптимальными. Становление биологического процесса, который мы именуем «жизнь», изна-

чально опирается на физическую химию и несколько позже на специфические реакции биохимии, биологии и вездесущую интуицию.

Три последовательных, отдельных уровня «относительного биологического совершенства» в филогенезе:

первый - аутокринный (клеточный) уровень, при достижении которого клетки стали формировать функциональные сообщества;

второй уровень - паракринно регулируемые сообщества (ПС) функционально разных клеток, функциональных единиц органов, систем органов с локальной регуляцией метаболизма;

третий уровень - организм с централизованной регулирующей метаболизма и функциональных процессов *in vivo*. Элементы биологического (не физико-химического) несоответствия регуляции заложены в биологических функциях и реакциях на разных ступенях филогенеза.

*Представление третье.* Порой авторы *a priori* полагают, что первым в филогенезе и основным субстратом для наработки клетками энергии является глюкоза. Мнение это – сомнительно; первым на ступенях филогенеза, основным субстратом для наработки клетками энергии в матриксе митохондрий *in vivo* явились жирные кислоты (ЖК). Зарождение жизни произошло в глубинах океана, при активном участии вулканических «черных курильщиков». Они – основные поставщики органических, биогеохимических субстратов [9]; ацетат, циклический ацетат, коэнзим-А (КоА) и т.д. В химических реакциях был сформирован субстрат (ацетил-КоА) для синтеза ЖК. Особые физико-химические свойства С16:0 пальмитиновой насыщенной ЖК (НЖК) стали основой того, что на ранних ступенях филогенеза анаэробы архей стали синтезировать (без освобождения промежуточных метаболитов – среднепечечных ЖК) пальмитиновую, длинноцепочечную НЖК. Археи использовали НЖК для формирования далее бислойной мембраны клеток. Эту же НЖК митохондрии архей окисляли в дыхательной цепи матрикса, нарабатывая макроэргический аденозинтрифосфат (АТФ). Систем запасаения энергии в форме АТФ ни архей, ни более поздние бактерии – автотрофы не создали. Депонируют они только субстраты для наработки энергии: ЖК в форме гидрофобных триглицеридов (ТГ), эфиров с трехатомным спиртом глицерином и глюкозу в форме гликогена – гидрофильного полимера. Миллионы лет в глубинах океана в анаэробных условиях, в полной темноте, синтез глюкозы не было; метаболизм же ЖК и липидов только совершенствовался. Липиды являлись ЖК и все соединения, в состав которых ЖК входят.

Когда богатый органическими молекулами «первичный бульон» со дна океана достиг прогреваемых солнцем поверхностных вод, иные, более поздние в филогенезе бактерии, автотрофы, сформировав специфические органеллы – хлоропласты с хлорофиллом, отработали физико-химические реакции фотосинтеза. И только миллионами лет позже синтеза археями ЖК автотрофы из  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  при действии квантов света солнца начали синтез глюкозы, освобождая в атмосфере  $\text{O}_2$ . Миллионы лет в океане сосуществовали:

анаэробные археи; в качестве субстрата энергии они окисляли в митохондриях ЖК, нарабатывая АТФ и

аэробные бактерии автотрофы; они синтезировали глюкозу и использовали её для наработки энергии (синтез АТФ) в биохимических реакциях гликолиза, постоянно увеличивая в атмосфере содержание  $\text{O}_2$ . Сосуществование столь разных простейших в океане длительное время быть не могло.

На ранних же ступенях филогенеза в океане биологически произошло историческое, симбиотическое слияние архей и автотрофов; в цитоплазму поздних в филогенезе автотрофов перешли все структурные образования цитоплазмы архей, включая анаэробные митохондрии. И хотя русские го-

ворят, что «в чужой монастырь со своим уставом не ходят», в процессе симбиоза в цитоплазму автотрофов митохондрии перешли со своим геномом. За последующие миллионы лет митохондрии стали аэробными; они окисляют ацетил-КоА, образованный в клетках, как при метаболизме ЖК в форме ацетил-КоА, так и глюкозы по пути:  $D$ -глюкоза → лактат → пируват → ацетил-КоА → цикл Кребса → реакции «дыхательной цепи». Однако и в образованных симбионтах не всё стало сразу органичным и согласованным:

а) все соматические клетки *in vivo* на ступенях филогенеза – это «потомки архей»; митохондрии их в матриксе, в цикле Кребса, в дыхательной цепи в аэробных условиях окисляли ацетил-КоА, образованный из ЖК;

б) потомками автотрофов у ранних животных явились клетки нервной системы (нейроны, астроциты, глиальные клетки); митохондрии их для наработки АТФ окисляют ацетил-КоА, который образован в основном при метаболизме глюкозы.

Клетки нервной системы (потомки автотрофов) стали со временем столь специфичными, что между ними и массой соматических клеток *in vivo* (потомков архей) постепенно сформировался гематоэнцефалический барьер. Бислоем клеток эндотелий: астроциты сформировал *in vivo* локальный пул межклеточной среды, пул спинномозговой жидкости. По параметрам спинномозговая жидкость во многом сходна с первичной мочой в клубочках нефрона, в ПС клеток; это – структурная и функциональная единица почек. Выраженно гидрофильная спинномозговая жидкость является непреодолимым препятствием для ЖК. Спинномозговая жидкость может перенести в пул клеток нервной системы только короткоцепочечные ЖК – кетоновые тела (С4 ЖК). Только из них нейроны и астроциты синтезируют *in situ de novo* столь большое разнообразие специфичных ЖК, которые формируют все функциональные аспекты нервной ткани.

*Биологическая роль инсулина – превращение рыбоядных океана в травоядные виды на суше.* Миллионы лет при жизни животных последовательно в водах нескольких океанов с разным составом одно-, дивалентных катионов и анионов, все предки человека были плотоядными (*Carnivores*), рыбоядными млекопитающими. Соматические клетки использовали ЖК и липиды для построения структур клеток, тканей, органов и для наработки клетками энергии. Совершенствование же нервной системы происходило за счёт в первую очередь окисления в митохондриях метаболитов глюкозы и кетоновых тел - С4 ЖК. Все соматические клетки *in vivo* поглощают ЖК активированно (не активно) при действии CD36-транслоказы ЖК; нервные клетки поглощают глюкозу не активно, а только активировано при действии глюкозных транспортёров (ГЛЮТ 1-3). В то же время:

а) концентрация глюкозы в цитоплазме соматических клеток лишь немного ниже, чем в пуле межклеточной среды;

б) содержание же ЖК в форме полярных, незтерифицированных ЖК (НЭЖК) в цитоплазме клеток постоянно составляет лишь следовые количества. Специфичное семейство протеинов связывают ЖК в цитоплазме клеток [10], быстро этерифицирует полярные НЭЖК в неполярные ТГ с трёхатомным спиртом глицерином. В силу столь выраженного различия соматические клетки с высокой константой скорости реакции поглощают из межклеточной среды в первую очередь НЭЖК. Когда же концентрация НЭЖК в межклеточной среде станет ниже оптимального уровня, клетки с меньшей скоростью начинают поглощать глюкозу. Эта физико-химическая, ранняя на ступенях филогенеза особенность всех соматических клеток является этиологическим фактором становления *in vivo* синдрома ИР.

На планете Земля во время пермского и триасового геологических периодов, когда океан неожиданно отступил,

плотоядные (рыбоядные) не по своей воле оказались на суше. Первое, что они вынуждены были сделать: каждая особь приватизировала «кусочек» океана. Животные преобразовали воды океана в единый пул межклеточной среды *in vivo*. В условиях высокой смертности на суше отдельные особи все-таки сформировали систему регуляции объёма и постоянства состава ионов в едином пуле межклеточной среды, в первую очередь, электролитов. Далее особи начали жить на суше; все же их клетки, как и миллионы лет, продолжили жизнь в водах «приватизированного» фрагмента океана.

На суше плотоядной пищи почти не было, но в изобилии росли травы, злаки и плоды - много травоядной пищи. Основным субстратом для наработки энергии при травоядном питании является клетчатка, крахмал, глюкоза. Что же могли сделать плотоядные животные, когда:

а) основу метаболизма и обеспечения клеток энергией составляли ЖК, а

б) на суше много только растительной пищи, глюкозы? Реально на ступенях филогенеза произошло следующее:

а) особи сохранили все реакции метаболизма *in vivo*, сформированные плотоядными (рыбоядными) видами на ступенях филогенеза;

б) на суше многие виды субстратзависимо стали травоядными и начали эффективно превращать клетчатку пищи, глюкозу в ЖК. В филогенезе многие «предки» *Homo sapiens* были рыбоядными; но не были «мясоедами» и стать ими физико-химически, биохимически, биологически практически не смогут. Продолжительность онтогенеза у особей «пациент - мясоед» всегда будет более короткой.

Биологическая роль позднего на ступенях филогенеза инсулина состоит, мы полагаем, в становления *in vivo* новых биологических функций. Регуляторное действие инсулина превратило плотоядных (рыбоядных) океана в травоядные виды на суше; в числе их оказался и вид человек разумный. Произошло это при ресинтезе *in vivo* основной массы принятой с пищей глюкозы в ЖК и образованием разных классов липидов. При жизни травоядных особей на суше клетки реализуют метаболизм ЖК так же, как это происходило и в океане миллионы лет назад.

Биологической особенностью регуляторного действия инсулина явилось превращение экзогенной глюкозы преимущественно (целенаправленно) в  $\omega$ -6 С18:1 цис-олеиновую мононенасыщенную ЖК (МЖК) с одной двойной связью – ДС (-С=C-). Для этого поздний в филогенезе инсулин экспрессировал синтез двух новых, сопряжённых ферментов - пальмитоил-КоА-элонгаза и стеарил-КоА-деацетилазы. Два фермента осуществили и активировали синтез МЖК по пути: эндогенная, синтезированная *in situ de novo*, из экзогенной глюкозы С16:0 пальмитиновая НЖК → С18:0 стеариновая НЖК →  $\omega$ -6 С18:1 цис-олеиновая МЖК; накопления промежуточной стеариновой НЖК не происходит. Одновременно, ферменты, экспрессированные инсулином, не превращают в олеиновую МЖК экзогенную пальмитиновую НЖК, которая поступает с мясной, плотоядной пищей. Чтобы реально понять, что происходило в филогенезе миллионами лет ранее, проблему надо «прочувствовать».

При действии инсулина:

а) гепатоциты *Herbivores* формируют олеиновые ТГ и секретируют в кровотоки олеиновые липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП);

б) гепатоциты же *Carnivores* этерифицируют ЖК в пальмитиновые ТГ и секретируют их в кровь в составе пальмитиновых ЛПОНП. Активация инсулином синтеза из глюкозы преимущественно эндогенной олеиновой МЖК физико-химически обусловлена тем, что в экспериментах *in vitro* озон при автоматическом титровании окисляет олеиновую МЖК с константой скорости реакции в 5 раз и более высокой, чем

при окислении пальмитиновой НЖК [11, 12]. К тому же *in vivo* внутренняя мембрана митохондрий минимально проницаема для пальмитиновой НЖК; окисляют органеллы клеток пальмитиновую НЖК медленно, нарабатывая не оптимальное количество АТФ.

*Homo sapiens* - вид не всеядный, а травоядный с плотоядным в филогенезе прошлым. При жизни в океане все предки человека были плотоядными млекопитающими, на суше инсулин превратил многие виды, в том числе и *Homo sapiens*, в травоядных и не с плотоядным, а лишь с рыбоядным прошлым. Представление о человеке как о всеядном виде (*Omnivores*) не более чем *nonsense*; подобные виды природа не формировала. Всеядным в филогенезе мог быть вид, который бы быстро отрывал от туши куски мяса, глотал их целиком, не пережевывая, переваривал бы за несколько часов, а после этого поедал сено, длительно пережевывая и переваривая растительную клетчатку, реализуя ещё и элементы биохимической реакции брожения. По анатомии жевательного аппарата, особенностям скелета, по длине тонкой кишки, активности ферментов реакций пищеварения, по кислотности желудочного сока, органолептическим свойствам кала, наличию потовых желез вид *Homo sapiens* реально является травоядным с рыбоядным прошлым.

От плотоядного периода филогенеза в океане *Homo sapiens* достало вскармливание новорождённых молоком матери. В женском молоке, как и у всех млекопитающих, среди животных жиров доминирует пальмитиновая НЖК в пальмитиновых, позиционных формах ТГ,  $\beta$ -ТГ [13]. Окончательно пока не поняты причины: а) отсутствия у плотоядных видов (у хищников) потовых желез и б) иной способ питья воды – не втягивание жидкости, а путём «лакания» её языком. То, что человек реально травояден, подтверждают: а) отличия в составе ЖК от плотоядных видов; б) различие позиционных форм ТГ [14] и в) метаболические превращения ЛП как в крови, при реализации биологической реакции экзотрофии, так и в цитоплазме клеток при реализации биологической реакции эндотрофии в биологической функции трофологии, питания.

1. В крови плотоядных видов доминируют пальмитиновые позиционные формы ТГ и более ранние в филогенезе ЛП высокой плотности (ЛПВП) [15, 16]. У травоядных видов и человека в крови доминируют олеиновые позиционные формы ТГ и более поздние в филогенезе ЛП очень низкой и низкой плотности (ЛПОНП и ЛПНП).

2. У плотоядных (рыбоядных) в филогенезе видов среди полиеновых ЖК (ПНЖК) с четырьмя – шестью двойными связями преобладают  $\omega$ -3 ЖК; клетки поглощают их, как и человек, в форме полиеновых эфиров холестерина (поли-ЭХС) путём апоВ-100 эндоцитоза. У плотоядных клетки поглощают  $\omega$ -6 ПНЖК в форме также поли-ЭХС, но в составе ЛПВП и путём апоА-I / апоЕ рецепторного эндоцитоза.

3. В крови ранних в филогенезе плотоядных видов доминируют пальмитиновые позиционные формы ТГ: олеилпальмитоил-олеат глицерол (ОПО), пальмитоил-пальмитоил-олеат (ППО), олеил-пальмитол-пальмитат (ОПП) и пальмитоил-пальмитоил-пальмитат (ППП); вместе ОПО-ППО-ОПП-ППП. В ТГ плотоядных пальмитиновая НЖК занимает *sn*-2 глицерина, формируя  $\beta$ -пальмитиновые ТГ.

4. У более поздних на ступенях филогенеза травоядных, у *Homo sapiens*, в крови доминируют олеиновые, позиционные формы ТГ: пальмитоил-олеил-пальмитат глицерол (ПОП), олеил-олеил-пальмитат (ООП), пальмитоил-олеил-олеат (ПОО) и олеил-олеил-олеат (ООО); вместе ПОП-ПОО-ООП-ООО. Во всех животных жирах, в ТГ в *sn*-2 глицерина этерифицирована пальмитиновая НЖК (пальмитиновые ТГ). В растительных маслах в *sn*-2 ТГ всегда этерифицирована олеиновая НЖК, формируя олеиновые ТГ [17].

5. В крови гидролиз олеиновых позиционных форм ТГ в составе ЛПОНИ у травоядных реализуется поздняя на ступенях филогенеза постгепариновая липопротеинлипаза и её кофактор апоС-II [18]. Липаза действует быстро и в норме при гидролизе олеиновых ТГ в составе одноимённых ЛПОНИ, в кровотоке олеиновые ЛПНП не образуются. Инсулинзависимые клетки (поперечнополосатые, скелетные миоциты, синцитий кардиомиоцитов, перипортальные гепатоциты, пул подкожных адипоцитов и макрофаги печени, клетки Купфера) активно поглощают лигандные ЛПОНИ путём апоЕ/В-100 эндоцитоза.

6. У травоядных видов в переносе и поглощении клетками  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 ПНЖК задействован функционально специфичный белок, переносящий полиеновые эфиры холестерина (ХС); у плотоядных видов этот протеин функционально не активен.

7. Гидролиз пальмитиновых форм ТГ в одноимённых ЛПОНИ у плотоядных видов в крови реализуется ранняя на ступенях филогенеза печёночная глицеролгидролаза и её кофермент апоС-III [19]. С низкой константой скорости реакции липаза медленно превращает пальмитиновые ЛПОНИ в одноимённые ЛПНП с более высокой гидратированной плотностью. В плазме крови при этом увеличивается содержание спирта ХС в составе пальмитиновых ЛПНП, тест ХС-ЛПНП. Все клетки *in vivo* медленно поглощают пальмитиновые ЛПНП путём апоВ-100 эндоцитоза.

У ранних в филогенезе плотоядных видов основное количество ЖК *in vivo* – это экзогенные ЖК; поступают они с мясной пищей и среди них преобладают С16:0 пальмитиновая НЖК и транс-формы экзогенных МЖК [20, 21]. У позднего в филогенезе травоядного вида *Homo sapiens* с плотоядным прошлым основное количество ЖК *in vivo* – это эндогенно синтезированная из экзогенной глюкозы  $\omega$ -9 С18:1 цис-олеиновая НЖК.

Состав позиционных форм ТГ (ПОП-ПОО-ООП-ООО) даёт основание понять, что травоядный в филогенезе человек с плотоядным прошлым физиологично переносит к клеткам оптимальное количество пальмитиновой НЖК. Увеличение содержания в плазме крови только ТГ (физиологично содержание ТГ и ниже 0,5 ммоль/л) отражает повышение концентрации в крови олеиновых форм ТГ в составе олеиновых, физиологичных ЛПОНИ.

При афизиологично высоком поедании «пациентами-мясоедами» плотоядной пищи, при большом поступлении пальмитиновой НЖК, гепатоциты субстратзависимо этерифицируют её в афизиологичные для травоядных видов пальмитиновые формы ТГ: ОПО-ППО-ОПП-ППП. Гидролиз пальмитиновых ТГ в составе ЛПОНИ при действии постгепариновой липопротеинлипазы происходит афизиологично медленно, превращая все пальмитиновые ЛПОНИ в одноимённые ЛПНП, увеличивая содержание ХС в ЛПНП, ХС-ЛПНП. Если основной причиной повышения в плазме крови содержания ТГ, как при метаболическом синдроме, является переедание пациентами травоядной пищи, то наиболее частой причиной повышения уровня ХС-ЛПНП является переедание мяса «пациентами-мясоедами». Уменьшение поедания мяса и жирной молочной пищи – основа нормализации уровня ХС-ЛПНП. Мы предложили использовать методы клинической биохимии в объективной оценке степени переедания травоядным в филогенезе пациентом плотоядной, мясной пищи [22].

Если же пациент продолжает усиленно поедать мясную пищу, в плане биологической, афизиологичной компенсации, последует увеличение в крови содержания апоС-III, позже возрастёт содержание апоВ-48 [23] и, наконец, сформируется гиперлиппротеинемия типа V при электрофорезе ЛП [24]. Важно понять, что *Homo sapiens* не всеяден; в филогенезе человек реально является травоядным, но с плотоядным (ры-

боядным) прошлым. Травоядным его сделало регуляторное действие позднего в филогенезе инсулина; гормон в первую очередь регулирует метаболизм ЖКК и только во вторую – метаболизм глюкозы. Инсулин превращает большую часть экзогенной глюкозы пищи у травоядных видов в эндогенную пальмитиновую МЖК, замещая *in vivo* менее эффективный пальмитиновый вариант метаболизма ЖК (наработки АТФ) на более эффективный – олеиновый.

На фоне повышенного уровня ТГ увеличение содержания ХС-ЛПНП указывает на начало афизиологичного потребления пациентом мясной (молочной жирной) пищи, которое превышает физиологические возможности травоядной особи. Если содержание в плазме крови ТГ (точнее спирта глицерина) находится в интервале 0,5–1,0 ммоль/л, пациент физиологично избегает поедания мясной пищи. Если содержание ТГ в плазме крови в пределах 1,0–1,5 ммоль/л, потребление мясной пищи не выходит за пределы физиологичного уровня [25]. С позиций общей биологии поедание мяса всегда желательно заменить на более физиологичное поедание рыбы и морепродуктов. Вегетарианство, выраженное ограничением животных белков, в том числе и рыбы, мы оцениваем как афизиологичное, нежелательное. У плотоядных хищников в естественных условиях переваривание пищи продолжается всего несколько часов; кал хищников имеет чёрный цвет и острый, раздражающий запах. Цвет кала человека при физиологичном травоядном питании сравним с цветом хурмы: от оранжевого до оранжево-серого с коричневым оттенком.

*Позиционные формы ТГ животных жиров и растительных масел;*

*первичная профилактика метаболических пандемий.* Липиды в тонкой кишке гидролизуют панкреатические липазы. Как все внеклеточные липазы (триглицеролгидролазы) гидролизуют они в ТГ только эфирные связи, которые образованы первичными спиртовыми группами глицерина в *sn*-1 и *sn*-3. Внеклеточные липазы не освобождают ЖК из *sn*-2, из эфирной связи с вторичной спиртовой группой. Панкреатическая липаза гидролизует неполярную молекулу ТГ с образованием трёх полярных молекул: полярные НЭЖК из *sn*-1, *sn*-3 и 2-моноацилглицерол из *sn*-2. Всех их в процессе «пристеночного» (внеклеточного) пищеварения всасывают энтероциты путём жидкостного, активированного пиноцитоза [7]. Все ТГ жиров животного происхождения, которые содержит пища, являются пальмитиновыми; все ТГ растительных масел – олеиновыми.

В липидах молока и в сливочном масле, общее содержание пальмитиновой НЖК  $\approx$  30%; более 70% её этерифицировано в *sn*-2. В этих условиях энтероциты новорождённых (да и взрослых тоже) всасывают всю пальмитиновую НЖК, обеспечивая высокую меру биодоступности. Одновременно в пальмовом масле («тропическом» оливковом масле) при общем содержании пальмитиновой НЖК  $\approx$  50%, вся она этерифицирована в *sn*-1 и *sn*-3; в *sn*-2 в ТГ пальмового масла этерифицирована только олеиновая МЖК; её-то и всасывают энтероциты. После гидролиза в кишечнике пальмового («тропического» оливкового) масла все пальмитиновые НЭЖК реагируют с двухвалентными ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , формируя пальмитат кальция и магния, пальмитиновые мыла. Ни первые, ни вторые мыла энтероциты не всасывают; метаболизм пальмитиновых НЭЖК осуществляет микробиота (пул бактерий) толстой кишки. При поедании пальмового масла биодоступность для клеток пальмитиновой НЖК оказывается даже ниже, чем у молочного, пальмитинового, животного жира – сливочного масла. Употребление в пищу пальмового масла сопровождается лишь незначительное повышение уровня ХС-ЛПНП [26].

*Нерешённые вопросы биологической функции трофологии, биологической реакции внешнего питания.* В фило-

генетической теории общей патологии впервые выделены и обсуждены биологическая функция трофологии и функциональные различия биологических реакций экзотрофии и эндотрофии – внешнего и внутреннего питания. В плане первичной профилактики атеросклероза, атероматоза интимы артерий, ишемической болезни сердца (ИБС) замена пациентами сливочного масла на перезтерифицированные растительные жиры, в том числе и пальмовое «тропическое» оливковое масло, явно желательна. Правда, это не столь вкусно; но это можно исправить. Все продукты из обезжиренного коровьего молока, из молочной сыворотки являются в питании несомненно полезными. Достаточно напомнить, что эффективные гипотензивные препараты, к примеру, каптоприл, это олигопептиды, продукты гидролиза *in vitro* – казеина молока коровы.

*Биохимический метод перезтерификации и пищевые жиры.* Процесс перезтерификации (кроме действия *sn-1,3* – специфичной липазы) можно рассматривать как физико-химическое перемещение ЖК в молекуле и между молекулами ТГ, естественно, желаемым для биологической функции питания образом. Образование новых позиционных форм ТГ полностью определено исходным составом ЖК в ТГ. В отличие от химической реакции гидрогенизации перезтерификация не меняет насыщенности ЖК (число двойных связей), не вызывает химических изменений ЖК, сохраняя состав ЖК исходных ТГ в образованных средах, наливных, мягких маргаринах [27].

Растительные масла не в полной мере отвечают современным представлениям о здоровом питании, имея несбалансированный состав ЖК. Применение биохимической реакции перезтерификации позволяет получать специализированные жиры с «желаемыми параметрами» ЖК: а) НЖК, МЖК, ненасыщенные ЖК ННЖК с двумя–тремя ДС и ПНЖК и б) отношение  $\omega-6/\omega-3$  ПНЖК. Комбинируя реакцию перезтерификации с другими методами модификации ТГ, можно получить продукты с желаемыми физико-химическими и функциональными свойствами [28].

В плане первичной профилактики ИБС позитивной является замена в составе колбас части мяса на белки и масла сои. Вслед за выяснением роли в биологической функции питания симметричных фосфолипидов с ННЖК с двумя–тремя ДС, мы длительно будем анализировать специфичность биологического действия гидролизатов сои *in vitro*, протеинов молока и продуктов океана. При поедании сои гидролиз протеинов при действии эндогенных протеаз в тонкой кишке ограничен образованием пента- и гексапептов; при гидролизе протеинов сои энтероциты быстро их всасывают. При приёме же гидролизатов, которые приготовлены *in vitro*, наиболее высокую биологическую активность проявляют ди- и трипептиды, олигопептиды.

*Биологическое действие гидролизатов in vitro.* Казалось бы, выяснение биологического действия пептидов логично предшествует выяснению биохимии протеинов. В биологической же функции питания оценка биохимии пептидов – гидролизатов, полученных *in vitro* из разных субстратов, как и функциональной активности микробиоты толстой кишки, по сути, только начата [29, 30]. Излагая нерешённые вопросы биологической функции трофологии, мы провели анализ накопленной в литературе информации. Предложены методы, которые на основании изменения спектра электронного парамагнитного резонанса могут, вероятно, позволить объективно оценить содержание в крови свободных НЭЖК в форме мицелл [31, 32]. Не станут ли подобные методы способом оценки ранних стадий метаболических пандемий, при метаболическом синдроме и метаболической артериальной гипертензии?

*Биорегуляция метаболизма ЖК олигопептидами.* Имеются основания полагать, что на ранних ступенях филогенеза

централизованной системе регуляции метаболизма гормонами желёз внутренней секреции (эндокринной системы) предшествовала децентрализованная регуляция гуморальными медиаторами, предшественниками протеинов, пулами биологически активных пептидов (БАП), главным образом три-, тетрапептидами, в том числе и с химически модифицированными аминокислотными остатками [33]. Гуморальная регуляция медиаторами доминирует на уровне паракринно регулируемых сообществ функционально разных клеток при функции каждого из органов. БАП активно функционируют *in vivo* и в настоящее время; они просто формируют второй вариант регуляции, уступая пальму первенства в регуляции централизованной системе гормонов и вегетативной нервной системе. Для понимания реального состояния регуляции метаболизма важно разобраться в действии пептидов, в регуляции ими физико-химических и биохимических реакций метаболизма ЖК и липидов [34].

Физико-химические параметры отдельных ЖК явились на ступенях филогенеза «векторами» направленного совершенствования реакций метаболизма на протяжении многих миллионов лет. Это в полной мере относится к более ранней в филогенезе пальмитиновой НЖК и более поздней олеиновой МЖК; содержание последней столь высоко в липидах как животных жиров, так и растительных масел. Столь же важное значение в плане совершенствования метаболизма ЖК на ступенях филогенеза имеют мало пока оценённая С12:0 лауриновая, кетогенная НЖК [35] и самые короткоцепочечные метаболиты ЖК как кетоновые тела [36].

*Транс-формы мононенасыщенные ЖК.* Когда пищевая промышленность остановила производство искусственного жира из растительных масел при использовании метода гидрогенизации, проблема с высоким содержанием *транс*-форм МЖК в маргаринах стала менее острой [37]. Наличие ДС в цепи атомов углерода в *транс*-конфигурации изменяет пространственную форму МЖК [38]. В афизиологичной *транс*-форме МЖК присутствуют в ТГ многих продуктов питания. Физико-химические параметры МЖК в форме *цис*- и *транс*-конфигурации существенно различаются. Химически оптимальное количество  $\omega-9$  С18:1 *транс*-элаидиновой ЖК (транс-изомер олеиновой МЖК) присутствует в растительных маслах, а *транс*-вакценовая МЖК – в животных жирах. Кинетические параметры окисления *транс*-форм ЖК в митохондриях уступают *цис*-форме МЖК, оставаясь на уровне, сходном с окислением пальмитиновой НЖК [39]. В то же время клетки используют *транс*-формы МЖК при формировании гидрофобных, функциональных доменов - рафов (плотов) в структуре клеточной, плазматической мембраны в составе фосфолипидов, сфингомиелинов [40].

*Биологическое предназначение среднецепочечных ЖК.* Особенности физико-химических параметров С8–С14 среднецепочечных ЖК: а) позиционные формы короткоцепочечных ТГ и продуктов перезтерификации среднецепочечных и длинноцепочечных ЖК; б) роль субстратов в первичной профилактике метаболических пандемий; в) применение среднецепочечных триглицеридов (СЦТГ) с лечебной целью в качестве эмульсий для парентерального питания новорождённых и взрослых [41]. Позитивное воздействие среднецепочечных ЖК пищи при лечении нейродегенеративных заболеваний путём активации кетогенеза [42] ставит вопрос о необходимости (реальной возможности) получения среднецепочечных ЖК и ТГ из отечественного сырья, из жиров животного происхождения. Единственным растительным маслом, в ТГ которого этерифицированы преимущественно ЖК со средней длиной цепи атомов углерода, является кокосовое масло. Если найти оптимальный источник и отработать методы выделения среднецепочечных ТГ из жиров животного происхождения, осуществить далее биохимическую

реакцию изомеризации средне- и длинноцепочечных ЖК в составе ТГ, можно получить субстраты (смешанные жировые эмульсии) для применения в клинической практике с целью парентерального питания, первичной профилактики гиперлипотеинемий и лечебного воздействия при нейродегенеративных заболеваниях. И хотя в полной мере позитивное действие среднецепочечных ЖК и одноимённых СЦТГ *in vivo* не до конца понято, пища, обогащённая такими ЖК и ТГ, даёт положительный эффект у пациентов с диабетом 1-го типа и при синдроме ИР. Вероятно, близко время иных биологических воздействий на патологические процессы, которыми не являются стволовые клетки.

*Лауриновая С12:0 среднецепочечная, кетогенная ЖК.* Лауриновая ЖК составляет половину всех ЖК в кокосовом масле, в небольших количествах содержатся С8:0 каприловая и С10:0 каприновая ЖК. В популяции населения юго-востока Азии, постоянно использующего кокосовое и пальмовое масло, низкий уровень патологии сердечно-сосудистой системы. При регулярном приёме с пищей лауриновой ЖК формируется состояние умеренного кетоза и позитивное использование нейронами кетоновых тел как субстрата для выработки АТФ и построения специфических для головного мозга ЖК и липидов [43]. В отличие от длинноцепочечных ЖК и ТГ клетки редко депонируют СЦТГ и только в висцеральных жировых клетках сальника, но не в инсулинзависимых подкожных адипоцитах.

Среднецепочечные ЖК быстро окисляют митохондрии; образованные из них ацетил-КоА клетки используют для термогенеза в гепатоцитах, в оранжевых и бурых подкожных адипоцитах [44]. Эксперименты с животными и наблюдения в клинике показали, что приём с пищей СЦТГ оказывает более выраженное физиологичное действие, чем длинноцепочечные ЖК в составе ТГ растительных масел. СЦТГ достоверно повышают в плазме крови содержание ХС-ЛПВП. Пища, обогащённая СЦТГ, является оптимальной для повышения содержания кетоновых тел в плазме крови, спинномозговой жидкости без необходимости ограничивать для этого содержание углеводов в пище. Кокосовое масло позитивно воздействует на сердечно-сосудистую систему, предотвращая формирование двух последовательных афизиологичных процессов - атеросклероза (блокада поглощения клетками ПНЖК путём апоВ-100 эндоцитоза; выраженное нарушение метаболизма) и атероматоза – деструктивное, воспалительное поражение интимы артерий эластического типа, нарушение биологической функции эндоекологии. Эффективным в профилактике патологии сердечно-сосудистой системы является снижение в пище количества пальмитиновой ЖК, увеличение олеиновой ЖК, ПНЖК при одновременном возрастании содержания среднецепочечных ЖК, СЦТГ и эссенциальных ПНЖК.

Не всё ясно и в биологической функции питания, биологической реакции экзотрофии, в регуляции метаболизма ЖК на ранних ступенях филогенеза. Мы, фиксируя внимание на выраженном различии состава ЖК и ТГ в животных жирах и растительных маслах, обоснованно полагаем, что именно вторые, включая пальмовое, олеиновое масло, оптимальны для питания *Homo sapiens*. Это не всеядный, а травоядный в филогенезе вид млекопитающего, но с плотоядным прошлым. Одновременно мы обращаем внимание на выраженную общность состава ЖК растительного, среднецепочечного кокосового масла и среднецепочечного животного жира насекомых; липиды насекомых уже широко применяются при вскармливании домашних животных [45].

*Липиды насекомых – оптимальный источник ЖК и ТГ и, возможно, будущее питание человека.* Биохимия липидов насекомых обычно не является предметом внимания в биологической функции питания [46]; однако в последнее время эта тема всё чаще появляется на страницах научно-практических

журналов. Происходит это, порой, в свете применения новых подходов к пониманию происходящего как инициированное диетой изменение экспрессии синтеза антимикробных пептидов [47]. Насекомых считают стабильным источником белка будущих кормов для домашних животных, используя в качестве вида насекомых личинок, в частности, чёрной солдатской мухи (*Hermetia illucens*). Прокормить население планеты Земля становится всё сложнее, и воздействие «парникового эффекта» современного животноводства на атмосферу земли становится климатически всё более ощутимым. Не исключено, что скоро не останется выбора, кроме того как начать употреблять в пищу протеины и жиры насекомых.

Белки и липиды насекомых реально могут стать частью рациона питания человека; об этом громко говорят на международных конференциях. Насекомые – основой, доступный источник быстрого, экономически оптимального синтеза белков и липидов. В документах ООН и ФАО (*Food and Drugs Administration*) отмечено, что уже в настоящее время белки насекомых являются традиционной частью питания по меньшей мере двух миллиардов человек. Разведение насекомых, выработку биологического материала, анализ его проводят пока лишь малые предприятия, но формируется уже и промышленное производство. Согласно данным ФАО в пищу можно использовать белки и липиды более 1900 видов насекомых. Наиболее часто жители Азии и Африки поедают жуков, далее следуют гусеницы, термиты, кузнечики, саранча и сверчки. Мучных червей, тараканов в Китае, чёрную солдатскую мушку в странах Европы и в России начали производить в промышленных масштабах, в том числе для кормления животных, но отчасти и для питания человека.

Заметим, что в липидах насекомых преобладают среднецепочечные ЖК, ниже содержание пальмитиновой длинноцепочечной ЖК и практически нет ПНЖК. В начаты в нашей стране экспериментах мы сопоставили спектр ЖК в липидах чёрной солдатской мушки и в коммерческом кокосовом масле. Как это ни покажется странным, но спектры ЖК, которые определены методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием [48], и в составе ТГ растительного кокосового масла и липидов насекомых являются во многом сходными. Теперь мы стараемся определить и сопоставить состав позиционных среднецепочечных ТГ в растительном масле и в животном жире. И нельзя исключить, что наши внуки будут отчасти «насекомоядными».

Основным условием активной профилактики атеросклероза и атероматоза в популяции *Homo sapiens*, мы полагаем, является понимание того, что филогенетически человек травояден, рыбаедаен, но с плодоядным прошлым и никак не мясоед [49]. Медицина - наука историческая; чтобы понять происходящее в популяции *Homo sapiens* в настоящее время, приходится заглянуть в далекое прошлое. Только так можно высветить популяционные основы эффективной профилактики атеросклероза и атероматоза, ИБС, инфаркта миокарда и ишемического инсульта. Согласно филогенетической теории общей патологии, одной из поздних в филогенезе и трудно реализуемой *in vivo* является когнитивная биологическая функция; это позиционирование особи во внешней, социальной, среде в условиях чаще неблагоприятного воздействия факторов внешней среды (переедания) в непрерывном единении с компенсаторной регуляцией метаболизма [50]. Начиная со сведений, изложенных на страницах Библии, человек в филогенезе травояден; этому биологическому постулату следует неукоснительно следовать, предпочитая травоядную пищу и отнеся лекарственную терапию [51] в область вторичной профилактики и генетически обусловленных нарушений метаболизма липидов и липопротеинов.

Рассмотрение первичной профилактики всех метаболических пандемий в рамках биологической функции питания

в аспекте различия биологических реакций экзо- и эндотрофии, объединение усилий специалистов-исследователей разных профессий позволят, мы полагаем, быстрее продвигаться в понимании теоретических основ и реализации практических аспектов, которые определяют особенности питания последующих поколений.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4,5, 10, 13, 15–19, 21, 23–28, 30, 32, 33, 35–39, 42–47 см. REFERENCES)

1. Титов В.Н. *Клиническая биохимия. Курс лекций*. М.: ИНФРА-М; 2017.
2. Титов В.Н. Семь этиологических факторов становления синдрома резистентности к инсулину. *Consilium medicum*. 2018; 20(4): 68 – 74.
3. Насонов Е.Л., Попкова Т.В. Атеросклероз: перспективы противовоспалительной терапии. *Терапевтический архив*. 2018; 5:4 – 12.
6. Саркисов Д.С. *Очерки истории общей патологии*. М.: Медицина; 1988.
7. Уголев А.М. *Естественные технологии биологических систем*. Л.: Наука; 1987.
8. Тейлор Д. *Здоровье по Дарвину. Почему мы болеем и как это связано с эволюцией*. М.: Альпин Паблишер; 2016.
9. Вернадский В.И. *Биосфера и ноосфера*. М.: Наука; 1989.
11. Лисицын Д.М., Разумовский С.Д., Тишенин М.А., Титов В.Н. Кинетические параметры окисления озонем индивидуальных жирных кислот. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2004; 138(11): 517 – 9.
12. Сажина Н.Н., Титов В.Н., Евтеева Н.М., Ариповский А.В. Изменение суммарной ненасыщенности жирных кислот липидов плазмы крови больных артериальной гипертензией в глюкозотолерантном тесте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(2): 74 – 80.
14. Коткина Т.И., Титов В.Н. Позиционные изомеры триглицеридов в маслах, жирах и apoB-100 липопротеинах. Пальмитиновый и олеиновый варианты метаболизма жирных кислот – субстратов для выработки энергии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 1: 22 – 43.
20. Рожкова Т.А., Ариповский А.В., Яровая Е.Б., Каминная В.И., Кухарчук В.В., Титов В.Н. Индивидуальные жирные кислоты плазмы крови: биологическая роль субстратов, параметры количества и качества, диагностика атеросклероза и атероматоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(11): 655 – 65.
22. Титов В.Н., Рожкова Т.А., Каминная В.И., Алчинова И.Б. Методы клинической биохимии в объективной оценке степени передаточности травоядным в филогенезе Homo Sapiens (пациентов плотоядной, мясной пищи). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(6): 324 – 32.
29. Белобородова Н.В., Мороз В.В., Бедова А.Ю. О роли ароматических микробных метаболитов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(1): 97 – 108.
31. Титов В.Н., Шойбонов Б.Б. Неэтерифицированные жирные кислоты в плазме крови и межклеточной среде. Действие инсулина и альбумина. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(2): 93 – 102.
34. Литвин Ф.Б., Брук Т.М., Ключкова С.В., Калоша А.И., Никитюк Д.Б. Использование специализированного пищевого продукта на основе ферментированной молочной сыворотки для повышения адаптационного потенциала спортсменов (лыжников-гонщиков). *Вопросы питания*. 2018; 87(1): 98 – 108.
40. Кубекина М.В., Мясоедова В.А., Карагодин В.П., Орехов А.Н. Фосфолипиды пищи: влияние на липидный обмен и факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний. *Вопросы питания*. 2017; 86(3): 6 – 18.
41. Ариповский А.В., Титов В.Н. Физиология среднепечочечных жирных кислот, физиология, особенности метаболизма и применения в клинике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 6: 3 – 10.

48. Ариповский А.В., Колесник П.О., Кулагина Т.П., Титов В.Н. Подготовка проб для газохроматографического определения жирных кислот: преимущества бехэкстракционного метода с прямой перэтерификацией липидов высушенных биологических проб. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(3): 141 – 7.
49. Титов В.Н., Рожкова Т.А., Каминная В.И. Роль избыточного количества мясной пищи в патогенезе атеросклероза и атероматоза у животных и человека. *Журнал медико-биологических исследований*. 2018; 6(2): 174 – 87.
50. Свердлов Е.Д. Нерешаемые проблемы биологии: нельзя создать два одинаковых организма, нельзя победить рак, нельзя картировать организм на геном. *Биохимия*. 2018; 83(4): 515 – 27.
51. Кудинов В.А., Захарова Т.С., Тарховская О.М., Арчаков А.И. Фармакологические мишени коррекции дислипидемий. Возможности и перспективы терапевтического использования. *Биомедицинская химия*. 2018; 64(1): 66 – 83.

REFERENCES

1. Titov V.N. *Clinical biochemistry. Lecture course. [Klinicheskaya biokhimiya. Kurs lekziy]*. Moscow: INFRA-M; 2017. (in Russian)
2. Titov V.N. Seven etiological factors of the formation of the insulin resistance syndrome. *Consilium medicum*. 2018; 20(4): 68 – 74. (in Russian)
3. Nasonov E.L., Popkova T.V. Atherosclerosis: perspectives of anti-inflammatory therapy. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2018; 5: 4 – 12. (in Russian)
4. Kumashiro N., Erion D.M., Zhang D., Kahn M., Beddow S.A., Chu X. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108(39): 16381 – 5.
5. Ndrepepa G. Uric acid and cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta*. 2018; 484: 150 – 63.
6. Sarkisov D.S. *Essays on the history of general pathology. [Ocherki istorii obshchey patologii]*. Moscow: Meditsina; 1988. (in Russian)
7. Ugolev A.M. *Natural technologies of biological systems. [Estestvennyye tehnologii biologicheskikh sistem]*. Leningrad: Nauka; 1987. (in Russian)
8. Teylor D. *Health by Darwin. Why we are sick and how this is related to evolution. [Zdorov'e po Darvinu. Pochemu my boleem i kak eto sbyazneno s evolyutsiyey]*. Moscow: Al'pina Publisher; 2016. (in Russian)
9. Vernadskiy V.I. *Biosphere and noosphere. [Biocfera i noosfera]*. Moscow: Nauka; 1989. (in Russian)
10. Kazantzis M., Stahl A. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012; 1821(5): 852 – 7.
11. Lisizin D.M., Razumovskiy S.D., Tischenin M.A., Titov V.N. Kinetic parameters of individual ozone oxidation of fatty acids. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2004; 138(11): 517 – 9. (in Russian)
12. Sahgina N.N., Titov V.N., Evteeva N.M., Aripovskiy A.V. Change in total unsaturation of fatty acids of blood plasma lipids in patients with arterial hypertension in a glucose-tolerant test. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(2): 74 – 80. (in Russian)
13. Bar-Yoseph F., Lifshitz Y., Cohen T., Malard P., Xu C. SN2-palmitate reduces fatty acid excretion in chinese formula-fed infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2016; 62(2): 341 – 7.
14. Kotkina T.I., Titov V.N. Positional isomers of triglycerides in oils, fats and apoB-100 lipoproteins. Palmitin and olein variants of the metabolism of fatty acids – substrates for energy production. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 1: 22 – 43. (in Russian)
15. Choi H.Y., Hafiane A., Schwertani A., Genest J. High-density lipoproteins: biology, epidemiology, and clinical management. *Can. J. Cardiol.* 2017; 33(3): 325 – 33.
16. Schwertani A., Choi H.Y., Genest J. HDLs and the pathogenesis of atherosclerosis. *Curr Opin. Cardiol.* 2018; 33(3): 311 – 6.
17. Al-Sulaiti H., Diboun I., Banu S., Al-Emadi M., Amani P., Harvey T.M. Triglyceride profiling in adipose tissues from obese insulin sensitive, insulin resistant and type 2 diabetes mellitus individuals. *J. Transl. Med.* 2018; 16(1): 175 – 87.
18. Li Y., He P.P., Zhang D.W., Zheng X.L., Cayabyab F.S., Yin W.D., Tang C.K. Lipoprotein lipase: from gene to atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014; 237(2): 597 – 608.
19. Jin J.L., Guo Y.L., Li J.J. Apoptein C-III: A review of its clinical implications. *Clin. Chim. Acta*. 2016; 460: 50 – 4.

20. Rozhkova T.A., Aripovsky A.V., Yarovaya E.B., Kaminskaya V.I., Kukharchuk V.V., Titov V.N. Individual fatty acids of blood plasma: the biological role of substrates, the parameters of quantity, the diagnosis of atherosclerosis and atheromatosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(11): 655 – 65. (in Russian)
21. Takeuchi H., Sugano M. Industrial *trans* fatty acid and serum cholesterol: the allowable dietary level. *J. Lipids*. 2017; 2017: 9751 - 6.
22. Titov V.N., Rozhkova T.A., Kaminnaya V.I., Alchinova I.B. Methods of clinical biochemistry in an objective assessment of the degree of overeating of herbivorous in the phylogeny of *Homo Sapiens* (patients) carnivorous, meat food. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(6): 324 – 32. (in Russian)
23. Marcera-Romero J., Sanchez-Chaparro M.A., Rioja J., Ariza M.J., Olivecrona G., González-Santos P., Valdivielso P. Fasting apolipoprotein B48 is a marker for peripheral arterial disease in type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2013; 50(3): 383 - 9.
24. Xiao C, Lewis G.F. Regulation of chylomicron production in humans. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012; 1821(5): 736 - 46.
25. Park S.E., Park C.Y., Sweeney G. Biomarkers of insulin sensitivity and insulin resistance: Past, present and future. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*. 2015; 52(4): 180-90.
26. Fillipou A., Berry S.E., Sanders T.A. Palmitic acid in the sn-2 position of dietary triacylglycerols does not affect insulin secretion or glucose homeostasis in healthy men and women. *Eur. J. Clin. Nutr*. 2014; 68(9): 1036 - 41.
27. The S.S., Voon P.T., Ong A.S., Choo Y.M. Incorporation of palmitic acid into soybean oils using enzymatic interesterification. *J. Oleo. Sci*. 2016; 65(9): 797 – 802.
28. Mancini A., Imperlini E., Nigro E., Montagnese C., Daniele A., Orrù S., Buono P. Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: effects on yealth. *Molecules*. 2015; 20(9): 17339 - 61.
29. Beloborodova N.V., Moroz V.V., Bedova A.Yu. On the role of aromatic microbial metabolites. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2018; 62(1): 97 – 108. (in Russian)
30. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014; 505(7484): 559 - 63.
31. Titov V.N., Shoybonov B.B. Unesterified fatty acids in blood plasma and intercellular environment. The action of insulin and albumin. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(2): 93 – 102. (in Russian)
32. Gurachevsky A., Kazmierczak S.C., Jörres A., Muravsky V. Application of spin label electron paramagnetic resonance in the diagnosis and prognosis of cancer and sepsis. *Clin. Chem. Lab. Med*. 2008; 46(9): 1203 - 10.
33. Ryan J.T., Ross R.P., Bolton D., Fitzgerald G.F., Stanton C. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients*. 2011; 3(9): 765 -91.
34. Litvin F.B., Brook T.M., Klochkova S.V., Kalosh A.I., Nikityuk D.B. Use of a specialized food product based on fermented milk whey to increase the adaptive potential of athletes (skiers-riders). *Voprosy pitaniya*. 2018; 87(1): 98 – 108. (in Russian)
35. McCarty M.F., DiNicolantonio J.J. Lauric acid-rich medium-chain triglycerides can substitute for other oils in cooking applications and may have limited pathogenicity. *Open. Heart*. 2016; 3(2): e000467.
36. Beauchamp E., Rioux Vю, Legerand P. New regulatory and signal functions for myristic acid. *Med. Sci. (Paris)*. 2009; 25(1): 57 - 63.
37. Kalinin A., Krashennnikov V., Sviridov A., Titov V. Chemometry of clinically important fatty acids in the blood serum using near infrared spectrometer. *Am. J. Chem. Appl*. 2018; 5(3): 45–50.
38. Mozaffrian D., Aro A., Willett W.C. Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. *Eur. J. Clin. Nutr*. 2009; 63 Suppl 2: S5 - 21.
39. Li H., Zhang Q., Song J., Wang A., Zou Y., Ding L., Wen Y. Plasma trans-fatty acids levels and mortality: a cohort study based on 1999-2000 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Lipids. Health. Dis*. 2017; 16(1): 176 - 82.
40. Kubekina M.B., Myasoedova V.A., Karagodin V.P., Orekhov A.N. Food phospholipids: effects on lipid metabolism and risk factors for cardiovascular disease. *Voprosy pitaniya*. 2017; 86(3): 6 – 18. (in Russian)
41. Aripovsky AV, Titov V.N. Physiology of medium-chain fatty acids, physiology, features of metabolism and application in the clinic. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 6: 3 – 10. (in Russian)
42. Nafar F., Clarke J.P., Mearow K.M. Coconut oil protects cortical neurons from amyloid beta toxicity by enhancing signaling of cell survival pathways. *Neurochem. Int*. 2017; 105: 64 - 79.
43. Kamisah Y., Periyah V., Lee K.T., Noor-Izwan N., Nurul-Hamizah A., Nurul-Iman B.S. Cardioprotective effect of virgin coconut oil in heated palm oil diet-induced hypertensive rats. *Pharm. Biol*. 2015; 53(9): 1243 - 9.
44. Gruffat-Mouty D., Graulet B., Durand D., Samson-Bouma M.E., Bauchart D. Effects of dietary coconut oil on apolipoprotein B synthesis and VLDL secretion by calf liver slices. *Br. J. Nutr*. 2001; 86(1): 13 - 9.
45. Ghioni C., Bell J.C., Sargent J.R. Fatty acid composition, eicosanoid production and permeability in skin tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a control or an essential fatty acid deficient diet. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids*. 1997; 56(6): 479 - 89.
46. Stanley-Samuels D.W., Jurenka R.A., Loher W., Blomquist G.J. De novo biosynthesis of arachidonic acid and 5,11,14-eicosatrienoic acid in the cricket *Teleogryllus commodus*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1988; 963(1): 21 - 7.
47. Vogel H., Muller A., Heckel D.G., Gutzeit H., Vilcinskas A. Nutritional immunology: Diversification and diet-dependent expression of antimicrobial peptides in the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Dev. Comp. Immunol*. 2018; 78: 141 - 8.
48. Aripovsky A.V., Kolesnik P.O., Kulagina T.P., Titov V.N. Preparation of samples for gas chromatographic determination of fatty acids: the advantages of a back-extraction method with direct transesterification of lipids from dried biological samples. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(3): 141 – 7. (in Russian)
49. Titov V.N., Rozhkova T.A., Kaminskaya V.I. The role of excessive amounts of meat in the pathogenesis of atherosclerosis and atheromatosis in animals and humans. *Zhurnal mediko-biologicheskikh issledovaniy*. 2018; 6(2): 174 – 87. (in Russian)
50. Sverdlov E.D. Intolerable problems of biology: you can not create two identical organisms, you can not defeat cancer, you can not map the organism to the genome. *Biokhimiya*. 2018; 83(4): 515 – 27. (in Russian)
51. Kudinov V.A., Zakharova T.S., Tarhovskaya O.M., Archakov A.I. Pharmacological targets of dyslipidemia correction. Possibilities and prospects of therapeutic use. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2018; 64(1): 66 – 83. (in Russian)

Поступила 17.09.18  
Принята к печати 07.10.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.65-006.04-078.33

Пешков М.Н.

## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства», 125310, Москва, Россия

*Последние 25 лет простатический специфический антиген сыворотки (PSA) применяется для диагностики рака предстательной железы. Опыт применения ПСА-теста показал его противоречивость как диагностического маркера из-за низкой канцерспецифичности. Вместе с этим появилась следующая волна биомаркеров рака предстательной железы, которые могут дополнить или со временем заменить PSA из-за более высокой чувствительности и канцерспецифичности. Эта расширяющаяся панель биомаркеров была дополнена в основном новыми геномными технологиями, которые позволили беспристрастно взглянуть на биологию рака. Такие усилия дали несколько заметных историй успеха, быстро переместив биомаркеры с лабораторного стола в клиническую практику. Основная доля исследований биомаркеров сосредоточена на ранней диагностике заболевания, а не на прогнозировании, которое позволит заниматься профилактикой заболевания. В данной статье рассматривается текущее состояние исследований биомаркеров рака предстательной железы, включая революционное значение ПСА-теста и его влияние на раннее выявление рака предстательной железы, последние достижения в области обнаружения биомаркеров и дальнейший вектор развития, который позволит улучшить клиническое управление этим заболеванием.*

**Ключевые слова:** рак предстательной железы (РПЖ); маркеры рака предстательной железы; простатспецифический антиген (ПСА); PCA3 (PCA3 Score); про-ПСА, [-2]-про-простатспецифический антиген ([-2]-pro-PSA); индекс здоровья простаты (PHI); тест 4Kscore®.

**Для цитирования:** Пешков М.Н. Эпигенетические маркеры ранней диагностики рака предстательной железы. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 605-609. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-605-609>

*Peshkov M.N.*

### EPIGENETIC MARKERS OF EARLY DIAGNOSTICS OF PROSTATE CANCER

FGBOU DPO Institute for Advanced Studies of the Federal Medical Biological Agency, 125310, Russia, Moscow

*The last 25 years, the prostate specific antigen (PSA) of the serum is used to diagnose prostate cancer. The experience of applying the PSA test showed its inconsistency as a diagnostic marker due to low cancerspecificity. Along with this, the next wave of biomarkers of prostate cancer appeared, which may supplement or, in due course, replace PSA due to higher sensitivity and cancerspecificity. This expanding panel of biomarkers was supplemented, basically, with new genomic technologies, which allowed to look impartially at cancer biology. Such efforts gave several notable success stories, quickly moving biomarkers from the laboratory table to clinical practice. The bulk of biomarker research focuses on early diagnosis of the disease, rather than on predictions that will allow for the prevention of the disease. This article examines the current state of biomarker studies of prostate cancer, including the revolutionary significance of the PSA test and its impact on early detection of prostate cancer, recent advances in biomarker detection, and a further developmental vector that improves the clinical management of this disease.*

**Key words:** cancer prostate (PCa); markers of prostate cancer; PSA; pro-PSA; total PS; free PSA and p2PSA; PSA3, [-2] pro-PSA; Prostate Health Index (phi); test 4KScore®.

**For citation:** Peshkov M.N., Epigenetic markers of early diagnostics of prostate cancer. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (10): 605-609 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-605-609>

**For correspondence:** Peshkov M.N., Ph.D. (Medical), Associate Professor of the Department of Oncology and Plastic Surgery; e-mail: [drpeshkov@gmail.com](mailto:drpeshkov@gmail.com)

#### Information about author:

Peshkov M.N., <http://orcid.org/0000-0003-3377-3731>

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

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

Received 15.06.2018  
Accepted 02.07.2018

**Введение.** Внедрение биомаркеров для диагностики и лечения болезней привело к коренному изменению практики лечения онкологии. Биомаркеры представляют собой молекулы, обнаружение или оценка которых предоставляет информацию о болезни за пределами стандартных клинических

параметров, которые обычно собираются клиницистом. Биомаркеры могут быть белками, метаболитами, транскриптами РНК, ДНК или эпигенетическими модификациями ДНК среди других изменений. Они могут быть обнаружены через образцы тканей пациента, полученные либо с помощью биопсии, либо хирургической резекцией, либо неинвазивно через выделение клеток и/или молекул из жидкостей организма, таких как кровь или моча.

Идеальный клинический биомаркер соответствует 3 основным характеристикам: 1) безопасное и доступное (лёг-

**Для корреспонденции:** Пешков Максим Николаевич, канд. мед. наук каф. онкологии и пластической хирургии; e-mail: [Drpeshkov@gmail.com](mailto:Drpeshkov@gmail.com)

кое) средство измерения, предпочтительно неинвазивное; 2) высокая чувствительность, специфичность и положительные и отрицательные предсказательные значения для предполагаемого результата; 3) улучшает возможности принятия решений в сочетании с клинико-патологическими параметрами. Хотя биомаркер, который хорошо работает в нескольких вышеупомянутых категориях, был бы идеальным, реальность заключается в том, что для того чтобы скрининг полностью охватывал рак, диагностику и прогноз, вероятно, потребуется панель, состоящая из нескольких типов биомаркеров.

*Простатический специфический антиген сыворотки (ПСА) как биомаркер рака предстательной железы.* Первоначальные отчёты предполагали использование ПСА в качестве биомаркера для мониторинга прогрессирования болезни у пациентов с уже диагностированным раком предстательной железы или для выявления рецидива после лечебной терапии при локализованном раке предстательной железы (рис. 1). В своём историческом исследовании Т.А. Stamey и соавт. (1987 г.) провели первый крупномасштабный анализ сывороточного PSA в качестве биомаркера рака предстательной железы, убедительно продемонстрировав, что уровень ПСА для мониторинга заболевания более чувствителен, чем простатическая кислая фосфатаза (РАР). Авторы показали, что уровень ПСА повышался с повышением клинической стадии и был полезен для выявления рецидивов болезни после лечебной терапии [1].

Внедрение ПСА в сообществе диагностики рака пред-

стательной железы привело к его широкому использованию в качестве скринингового теста среди бессимптомных мужчин [2]. Впоследствии доля мужчин с метастатическим раком предстательной железы на момент постановки диагноза резко снизилась, что является большим достижением для сообщества рака предстательной железы, которое изменило управление болезнью. У большего числа мужчин диагностировали рак предстательной железы, причём большинство из них имели раннюю стадию, клинически слабое заболевание. Больше людей с доброкачественными состояниями, такими как воспаление или гиперплазия, также направлялись на биопсию. Таким образом, ПСА-тест позволяет выявлять латентные формы рака предстательной железы, большинство из которых, возможно, никогда не приведёт к развитию клинически значимого заболевания [3].

Это расхождение между снижением агрессивности болезни и усилением лечения привело к широко распространённой критике того, что рак предстательной железы в настоящее время является «чрезмерно диагностированным». Большинство низкосортных низкоуровневых опухолей вряд ли вызовут значительные симптомы или смертность, и, по оценкам, до 50% новых диагнозов рака предстательной железы обнаруживают опухоль, которая вряд ли будет иметь клиническое течение при отсутствии скрининга ПСА [4]. В последующем анализе G. Draisma и соавт. [5] предположили, что уровень гипердиагностики составляет около 20-42%.

В 1986 г. Управление по контролю качества пищевых про-

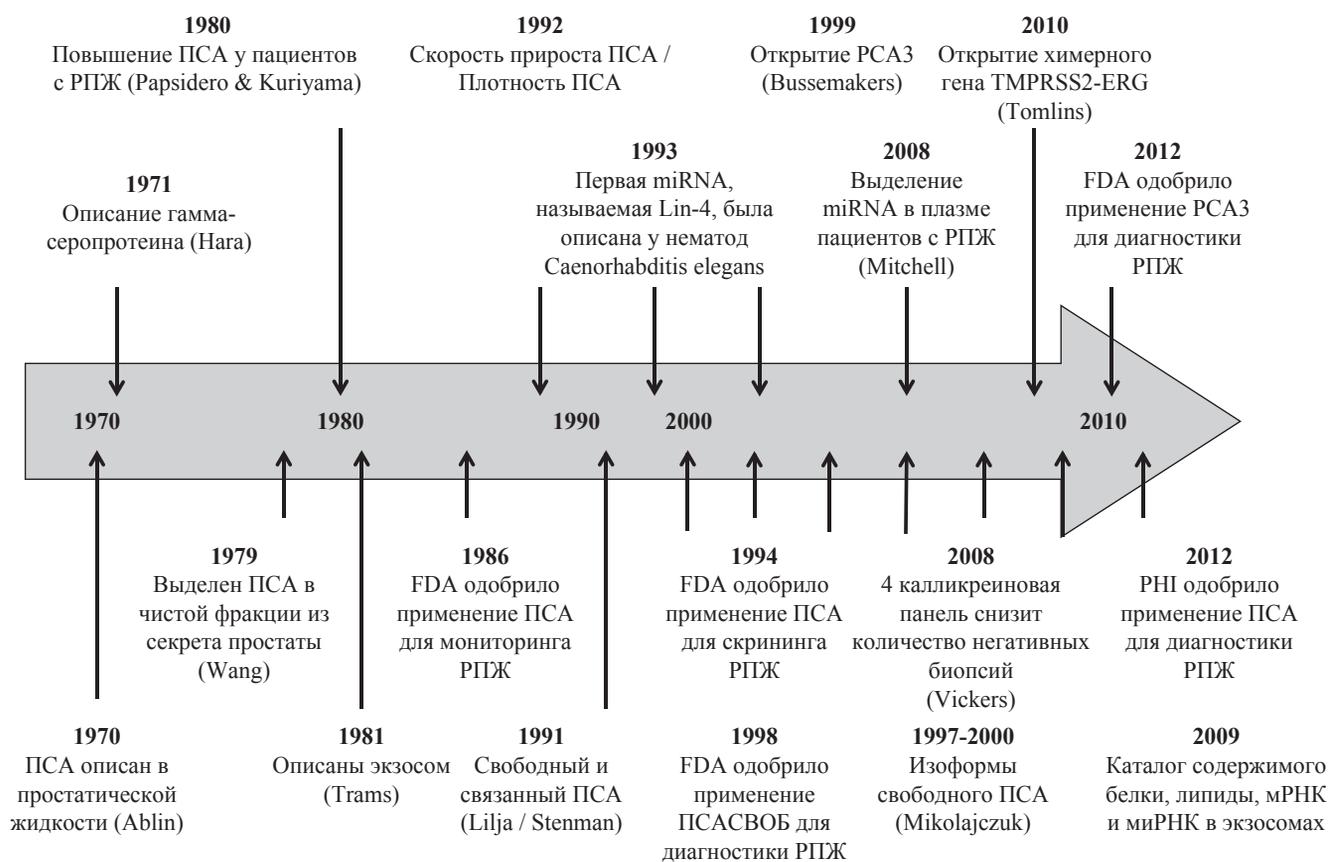


Рис. 1. Хронология ключевых событий, связанных с биомаркерами идентификации рака предстательной железы в 1970-2018 гг. Примечание. ПСА - простатический специфический антиген; РПЖ - рак предстательной железы; миРНК (siRNA) - малая интерферирующая РНК; мРНК - матричная (синоним - информационная) РНК; FDA - Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, US FDA); PCA3 - Prostate Cancer Antigen; индекс РНІ (Prostate Health Index) - индекс здоровья предстательной железы; ПСА<sub>своб</sub> - свободный ПСА.

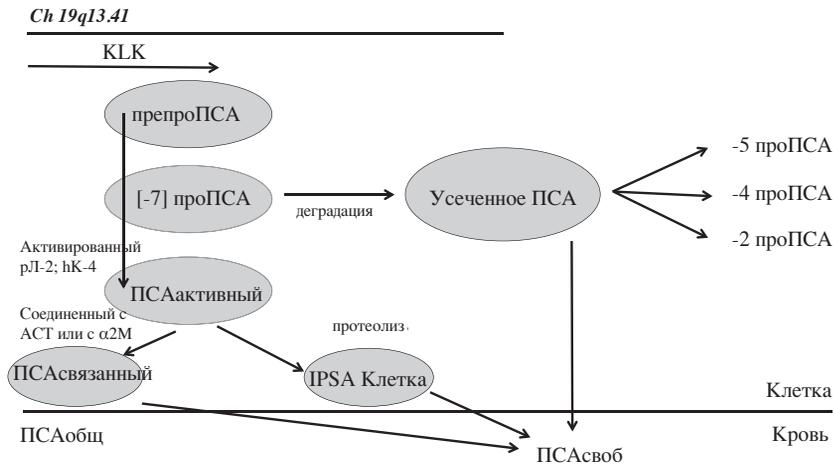


Рис. 2. Молекулярные формы ПСА, последовательность образования и локализации (в клетке и в сосудистом русле).

дуктов и лекарственных препаратов США (FDA) утвердило ПСА-тест, который произвёл революцию в области скрининга и диагностики РПЖ. Следует помнить, что тестирование на ПСА одобрено для раннего выявления РПЖ наряду с пальцевым ректальным обследованием у мужчин старше 50 лет [6, 7]. В США примерно 19 миллионов мужчин ежегодно проходят скрининг с тестированием на ПСА, в результате чего выполняется 1,3 млн процедур биопсии и выставляется 240 890 новых диагнозов РПЖ [8].

Тем не менее существуют известные ограничения на использование теста ПСА для скрининга РПЖ. Во-первых, тест может давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты. У большинства мужчин с повышенным уровнем ПСА (выше 4,0 нг/мл) РПЖ не обнаружен; только

около 25% мужчин, у которых выполняют биопсию предстательной железы из-за повышенного уровня ПСА, фактически имеют РПЖ. И наоборот, отрицательный результат может дать ложные подтверждения того, что РПЖ не обнаружен, когда на самом деле может существовать рак. Кроме того, раннее выявление РПЖ не может снизить для человека опасность умереть от этой болезни [9].

Проведение скрининга (PLCO) на рак простаты, лёгкого, прямой кишки и яичника было включено в крупное популяционное рандомизированное исследование, разработанное и спонсируемое Национальным институтом рака (NCI, США) для определения влияния скрининга на смертность от рака и вторичные конечные точки у мужчин и женщин в возрасте 55-74 лет. После 13 лет наблюдения в исследовании PLCO не было получено доказательств смертности для организованного ежегодного скрининга ПСА против оппортунистического скрининга, который является частью обычного ухода, и отсутствовала корреляционная связь между возрастом, исходной коморбидностью или результатами предварительного тестирования ПСА [10].

Однако E.D. Crawford и соавт. [11] при оценке мужчин, не имеющих сопутствующих заболеваний, в исследовании PLCO установили, что скрининг приводит к росту выживаемости. Примечательно также, что 11-летние результаты, полученные при проведении европейского рандомизированного исследования скрининга на рак предстательной железы, показали, что скрининг значительно снижает смертность от РПЖ [12]. Потенциальная причина этих разных результатов заключается в том, что в проведённом в США исследовании скрининга рака PLCO по меньшей мере 44% участников контрольной группы уже прошли тестирование на ПСА перед рандомизацией в исследование [10].

Для повышения чувствительности и специфичности тестирования сывороточного ПСА могут быть использованы несколько производных ПСА и изоформы (например, изоформы ПСА и плотность ПСА). Определение плотности ПСА имеет положительную прогностическую ценность при наличии РПЖ.

Индекс здоровья простаты - РНІ (Beckman Coulter, Brea, CA) может использоваться у мужчин в возрасте 50 лет и старше с уровнем ПСА в пределах 4–10 нг/мл без подозрения на рак предстательной железы при пальцевом ректальном исследовании (ПРИ), чтобы помочь определить необходимость биопсии. Оценка РНІ включает в себя измерение уровня общего и свободного ПСА - ПСА<sub>общ</sub>, ПСА<sub>своб</sub> и проэнзима [-2]-про-ПСА, являющегося ферментативно неактивным предшественником ПСА, который связан с раком предстательной железы и встречается как в периферической зоне предстательной железы, так и в сыворотке (рис. 2). Результаты физикального обследования переводятся в вероятность рака при получении результатов биопсии [13].

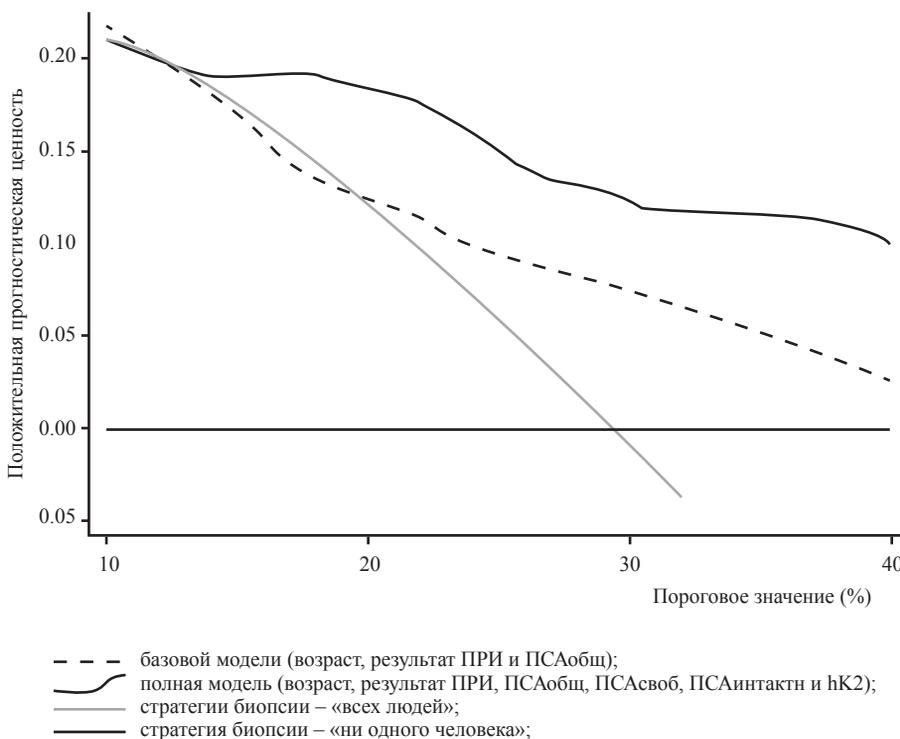


Рис. 3. Анализ кривой принятия решений.

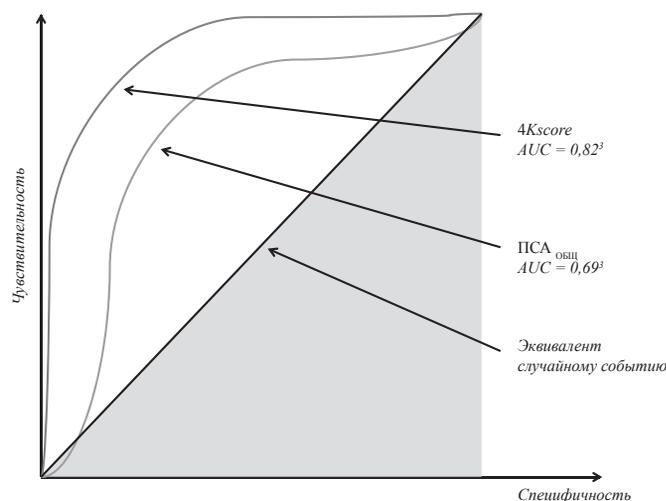


Рис. 4. Кривая канцерспецифичности (AUC 0,82) 4Kscore у пациентов с агрессивным раком предстательной железы.

Проспективное исследование, включающее пациентов с величиной ПСА 2-10 нг/мл и отрицательным результатом ПРИ, показало, что РН1 является высокоспецифичным для выявления рака предстательной железы. Кроме того, увеличенная оценка РН1 коррелировала с повышенным риском развития рака предстательной железы и шкалы Gleason 7-9 баллов. Показатель РН1 обладает более высокой прогностической точностью заболевания при аденокарциноме около 7 баллов по шкале Глисона, чем ПСА<sub>общ</sub>, ПСА<sub>своб</sub> или [-2]-про-ПСА-измерения по отдельности [14].

Клинические исследования подтвердили способность РН1 прогнозировать заболевание промежуточного и высокого риска (при Gleason 7 баллов и более) у мужчин и потенциально уменьшить количество необоснованных биопсий. Например, применение индикатора РН1 позволяет в 24,41% случаев отказаться от выполнения биопсии предстательной железы, сохраняя при этом высокую чувствительность и специфичность при наличии заболевания простаты [15]. Включение РН1-оценки помогает определить необходимость выполнить биопсию предстательной железы у биопсий-наивных или ранее перенёвших биопсию мужчин.

Значение РН1 ≤ 28,1 (калибровка ВОЗ) или РН1 ≤ 25,11 (по калибровке Huh1tech) будет свидетельствовать в пользу решения отложить выполнение биопсии простаты и назначить следующую сдачу анализа на РН1-индекс через 6-12 мес. Окончательное решение принимается врачом с учётом всей имеющейся информации о пациенте и всех сопутствующих показателей (общее состояние, наличие симптомов, результаты лабораторных исследований, семейный анамнез и пр.).

**4Kscore®**, или *Кому делать биопсию?* Тест 4Kscore® («ОРКО Health», Miami, FL) позволяет выявлять пациентов, которым необходимо выполнить биопсию или ребиопсию предстательной железы при повышении уровня ПСА или

клиническом выявлении симптомов, подозрительных для рака предстательной железы (например, по результатам ПРИ). С помощью 4Kscore измеряют в плазме уровни четырёх различных белков калликреина, полученных из предстательной железы: 1 - уровень ПСА<sub>общ</sub> (PSA<sub>total</sub>), ПСА<sub>своб</sub> (PSA<sub>free</sub>), ПСА<sub>интактный</sub> (PSA<sub>intact</sub>) и связанная с калликреином пептидаза, относящаяся к калликреину 2 (human kallikrein-2, hK2). Данный тест включает значения: возраст пациента, данные пальцевого ректального исследования (результат: узел присутствует/узел отсутствует) и результаты предыдущей биопсии (биопсия простаты выполнялась/биопсия простаты не выполнялась); в результате оценивается риск наличия у пациента агрессивного рака предстательной железы (шкала Глисона<sup>3</sup> 7 баллов) и определяется целесообразность выполнения биопсии простаты (рис. 3) под УЗ-контролем (при наличии положительного прогностического значения) [16].

Разработка 4Kscore включала ранние ретроспективные исследования с использованием данных европейских объектов. Измерение площади под кривой (AUC) для выявления рака предстательной железы улучшилось в 3 группах населения, когда панель 4-калликреина вошла в клинические модели, включая: 1 - возраст; 2 - уровень ПСА; 3 - результаты пальцевого ректального исследования, улучшение AUC с панелью из 4-х калликреинов - 0,72-0,84; 0,70-0,78 и 0,63-0,78 соответственно. Применение клинической модели к этим группам населения и рекомендация выполнить биопсию, когда вероятность рака предстательной железы составляла 20%, привела бы к консультированию против выполнения биопсий примерно у 50% мужчин с повышенным уровнем ПСА [17]. У мужчин, которым не рекомендована биопсия, в 13% случаев выявлен рак предстательной железы, из которых 82, 15 и 3% имели по шкале Gleason 6, 7 и 8 баллов соответственно [18]. Проспективное исследование, проведённое в США, показало, что тест 4Kscore обладал превосходными возможностями для выявления рака предстательной железы при оценке по шкале Gleason<sup>3</sup> 7 баллов по сравнению с данными калькулятора риска развития рака простаты, с AUC 0,82 (рис. 4) против 0,74 ( $p < 0,0001$ ).

Во всех исследуемых когортах доля биопсий, которых можно было избежать, составляет от 36% до 82%, тогда как вероятность потенциальной задержки (отсроченного) диагноза клинически значимого рака предстательной железы была минимальной (<5%) [19].

Было показано, что клиническая значимость теста 4Kscore не является существенной в 89% случаев и уменьшает срочность биопсии на 65% [17].

Применение теста 4Kscore не получило одобрения FDA (США), однако рекомендованы стандарты лечения рака NCCN (National Comprehensive Cancer Network) 2016 г. как вариант теста второй линии для пациентов, которые никогда не подвергались биопсии или после отрицательного результата первичной биопсии [20]. Таким образом, включение 4Kscore в рутинную практику помогает принимать клинические решения, уменьшая потенциальный вред, связанный с проведением необоснованной биопсии предстательной железы.

Использование 4Kscore приводит к улучшению на 8-10% прогнозирования РПЖ, подтверждённого биопсией, что указывает на то, что применение 4Kscore может потенциально сократить количество биопсий предстательной железы, которые в настоящее время проводятся в 48-56% случаев [21].

**Prostate Cancer Antigen-3 - антиген-3 рака простаты.** Ген *PCA3 Progenza®* («Gen-Probe», San Diego, CA) специфичен к ткани простаты и, как было установлено, его уровень увеличивается в 95% образцов мочи при раке предстательной железы.

Данный тест необходим для определения так-

#### Обзор биомаркеров ранней диагностики рака предстательной железы

Материал	Первичная биопсия	Повторная биопсия	Предписание
Сыворотка	ПСА	ПСА	ПСА
Сыворотка	Индекс здоровья РН1	Индекс здоровья РН1	ПСА <sub>общ</sub> ; [-2]-про-ПСА; ПСА <sub>своб</sub>
Плазма	4Kscore	4Kscore	ПСА <sub>общ</sub> ; ПСА <sub>своб</sub> ; ПСА <sub>интакт</sub>
Моча (после ПРИ)	<i>PCA3</i>	<i>PCA3</i>	ПСА и <i>PCA3</i>

тики ведения пациента после получения отрицательного результата биопсии предстательной железы. *PCA3* рассчитывается по результатам анализа мочи пациента после массажа предстательной железы и представляет собой континуум с оценкой отсечки 35, используемой для оценки риска у пациента неоттрансформации ткани при проведении последующей биопсии. Более высокий балл (> 35) свидетельствует о более высоком риске. Количество присутствующего *PCA3* нормализуется до количества ПСА в моче [22]. Два независимых исследования, проведенных в США и Европе, выявили, что уровень отсечения *PCA3* в 35 баллов имеет диагностическую специфичность 72% для выявления рака предстательной железы [23]. Иными словами, пациент с уровнем *PCA3* менее 35 баллов имеет 28%-ную вероятность рака предстательной железы при проведении последующей биопсии. Тест *PCA3* является малоинвазивным и может дать дополнительную информацию пациентам и врачам при оценке целесообразности проведения повторной биопсии простаты (см. табл.).

**Заключение.** Большая часть (70%) пациентов, которым выполнили биопсию предстательной железы, будут иметь отрицательный результат. Это приводит к необходимости определения времени проведения повторной биопсии и того, какие инструменты следует использовать для принятия данного решения. С учётом результатов клинических исследований и рекомендаций по применению биомаркеров, в настоящее время отсутствует идеальный биомаркер, позволяющий определить необходимость проведения повторной биопсии. Индекс здоровья простаты РН1, 4Kscore и *PCA3* повышают позитивную предсказательную ценность для диагностики РПЖ при биопсии. Использование новых молекулярных диагностических технологий, таких как эпигенетические тесты, является ещё одним возможным способом информирования о необходимости проведения повторной биопсии. Вместе с тем необходимы сравнительные исследования, чтобы найти оптимальный биомаркер и определить, какой из существующих тестов (или комбинация тестов) является наиболее рациональным для выбора тактики ведения пациента (динамическое наблюдение, активное выявление, проведение повторной биопсии или комбинированной терапии).

Биомаркеры РПЖ – это быстро расширяющаяся область, и последние разработки геномно-протеомных платформ, а также рост иммунотерапии открывают новые возможности для исследований в предстоящие годы. Разрабатываются также другие перспективные инновации, такие как биомаркеры визуализации. В текущей клинической практике перед повторной биопсией урологу (см. табл.), помимо определения группы маркеров (ПСА, РН1, *PCA3*, 4Kscore), также необходимо выполнить многопараметрическую магнитно-резонансную томографию в случаях, когда клиническое подозрение на наличие РПЖ сохраняется, несмотря на отрицательные результаты биопсии, с уровнем доказательств 1 и оценкой рекомендации А. Основной целью данного исследования является уточнение локализации опухолевого процесса для проведения таргетной биопсии и оптимизация процесса выявления клинически значимого РПЖ.

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

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3-23 см. REFERENCES)

2. Пешков М.Н., Генерозов Э.В., Кострюкова Е.С. Эволюция маркеров рака предстательной железы. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2015; 2: 55-6.

#### REFERENCES

1. Stamey T.A., Yang N., Hay A.R., McNeal J.E., Freiha F.S., Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N. Engl. J. Med.* 1987; 317: 909-16.
2. Peshkov M.N., Generozov E.V., Kostjukova E.S. The evolution of prostate cancer markers. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2015; 2: 55-6. (in Russian)
3. Potosky A.L., Feuer E.J., Levin D.L. Impact of screening on incidence and mortality of prostate cancer in the United States. *Epidemiol. Rev.* 2001; 23:181-6.
4. Etzioni R., Cha R., Feuer E.J., Davidov O. Asymptomatic incidence and duration of prostate cancer. *Am. J. Epidemiol.* 1998; 148:775-85.
5. Draisma G., Etzioni R., Tsodikov A., Mariotto A., Wever E., Gulati R. et al. Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009; 101:374-83.
6. Catalona W.J., Smith D.S., Ratliff T.L., Dodds K.M., Coplen D.E., Jerry J.J. Yuan et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 1991; 324:1156-61.
7. Chou R., Crosswell J.M., Dana T. Bougatsos C., Blazina I., Fu R. et al. Screening for prostate cancer: a review of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* 2011; 155:762-71.
8. Siegel R., Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J. Clin.* 2013; 63:11-30.
9. National Cancer Institute. Prostate-specific antigen (PSA) test. Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/PSA>. Accessed January 8, 2014.
10. Andriole G.L., Crawford E.D., Grubb R.L., Buys S.S., Chia D., Church T.R. et al. Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up. *J. Nat. Cancer Inst.* 2012; 104:125-32.
11. Crawford E.D., Grubb R., Black A. Comorbidity and mortality results from a randomized prostate cancer screening trial. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29:355-61.
12. Schröder F.H., Hugosson J., Roobol M.J., Teuvo L.J. Tammela, Ciatto S., Nelen V. et al. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366: 981-90.
13. Catalona W.J., Partin A.W., Sanda M.G., Wei J. T., Klee G.G., Bangma C.H. et al. A multi-center study of [-2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/mL prostate specific antigen range. *J. Urol.* 2011; 185:1650-5.
14. Loeb S., Sanda M.G., Broyles D.L., Shin S.S., Bangma C.H., Wei J.T. et al. The prostate health index selectively identifies clinically significant prostate cancer. *J. Urol.* 2015; 193:1163-9.
15. de la Calle C., Patil D., Wei J.T., Scherr D.S., Sokoll L., Chan D.W. et al. Multicenter evaluation of the Prostate Health Index to detect aggressive prostate cancer in biopsy naive men. *J. Urol.* 2015;194:65-72.
16. Konety B., Zappala S.M., Parekh D.J., Osterhout D., Schock J., Chudler R.M. et al. The 4Kscore(R) Test reduces prostate biopsy rates in community and academic urology practices. *Rev. Urol.* 2015; 17:231-40.
17. Benchikh A., Savage C., Cronin A., Salama G., Villers A., Lilja H. et al. A panel of kallikrein markers can predict outcome of prostate biopsy following clinical work-up: an independent validation study from the European Randomized Study of Prostate Cancer screening, France. *BMC Cancer.* 2010; 10:635.
18. Vickers A., Cronin A., Roobol M., Savage C., Peltola M., Pettersson K. et al. Reducing unnecessary biopsy during prostate cancer screening using a four-kallikrein panel: an independent replication. *J.Clin.Oncol.* 2010; 28:2493-8.
19. Parekh D.J., Punnen S., Sjoberg D.D., Asroff S.W., Bailen J.L., Cochran J.S. et al. A multi-institutional prospective trial in the USA confirm that the 4Kscore accurately identifies men with high-grade prostate cancer. *Eur.Urol.* 2015; 68:464-70.
20. National Cancer Comprehensive Network Clinical Practice Guidelines in Oncology: Prostate Cancer Early Detection Version 2.2016. Available at: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/prostate\\_detection.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate_detection.pdf). Last accessed: 9 September 2016.
21. Voigt J.D., Zappala S.M., Vaughan E.D., Wein A.J. The Kallikrein Panel for prostate cancer screening: its economic impact. *Prostate.* 2014; 74(3): 250-9.
22. Hesses D., Klein Gunnewiek J.M., van Oort I., Karthaus H.F., van Leenders G.J., van Balken B., et al. DD3 (PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur. Urol.* 2003;44:8-15.
23. Haese A., de la Taille A., van Poppel H., Marberger M., Stenzi A., Mulders P.F. et al. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur. Urol.* 2008; 54:1081-1088.

Поступила 15.06.18

Принята к печати 15.07.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 618.36-008.64-02:547.466

Погорелова Т.Н.<sup>1</sup>, Гулько В.О.<sup>1</sup>, Никашина А.А.<sup>1</sup>, Михельсон А.А.<sup>1</sup>, Михельсон А.Ф.<sup>1</sup>, Лебедеко Е.Ю.<sup>1</sup>, Аллилуев И.А.<sup>1,2</sup>

## ВЛИЯНИЕ ДИСБАЛАНСА АМИНОКИСЛОТ В ОРГАНИЗМЕ МАТЕРИ И ПЛОДА НА ФОРМИРОВАНИЕ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПЛАЦЕНТЫ И ТЕЧЕНИЕ НЕОНАТАЛЬНОГО ПЕРИОДА

<sup>1</sup>ФГБУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 344022, Ростов-на-Дону, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», 344006, Ростов-на-Дону, Россия

*С помощью метода ионообменной хроматографии оценено содержание аминокислот в сыворотке крови матери и в крови пуповины при физиологической беременности и плацентарной недостаточности (ПН). Установлено, что при ПН в сыворотке крови матери снижается содержание аргинина, серина, глутамина, аланина, цистеина, метионина, триптофана, лейцина, фенилаланина и пролина, которые участвуют во многих метаболических процессах, необходимых для поддержания нормального функционирования системы мать–плацента–плод. Противоположные отклонения имеют дикарбоновые аминокислоты, лизин, гистидин, глицин, тирозин и треонин, количество которых повышается, усиливая азотистый дисбаланс. В сыворотке крови пуповины для большинства аминокислот наблюдается сходная направленность изменений, однако степень её более выражена. Противоположная направленность изменений обнаружена для глицина, треонина, тирозина, содержание которых снижено. Результаты работы позволяют расширить представления о механизмах развития ПН и предложить информативные тесты для прогнозирования состояния новорождённых.*

**Ключевые слова:** свободные аминокислоты; сыворотка крови матери и плода; плацентарная недостаточность.

**Для цитирования:** Погорелова Т.Н., Гулько В.О., Никашина А.А., Михельсон А.А., Михельсон А.Ф., Лебедеко Е.Ю., Аллилуев И.А. Влияние дисбаланса аминокислот в организме матери и плода на формирование недостаточности плаценты и течение неонатального периода. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 610-614. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-610-614>

Pogorelova T.N.<sup>1</sup>, Gunko V.O.<sup>1</sup>, Nikashina A.A.<sup>1</sup>, Mikhelson A.A.<sup>1</sup>, Mikhelson A.F.<sup>1</sup>, Lebedenko E.Yu.<sup>1</sup>, Alliluev I.A.<sup>1,2</sup>

### INFLUENCE OF AMINO ACID IMBALANCE IN MATERNAL AND FETAL ORGANISMS ON THE DEVELOPMENT OF PLACENTAL INSUFFICIENCY AND THE COURSE OF THE NEONATAL PERIOD

<sup>1</sup>Rostov State Medical University, 344022, Rostov-on-Don, Russia

<sup>2</sup>Southern State University, 344006, Rostov-on-Don, Russia

*The content of amino acids in maternal serum and umbilical cord blood during physiological pregnancy and placental insufficiency (PI) was estimated using ion-exchange chromatography. It was found that the content of arginine, serine, glutamine, alanine, cysteine, methionine, tryptophan, leucine, phenylalanine and proline, which are involved in many metabolic processes necessary to maintain the normal functioning of the mother-placenta-fetus system, decreases in maternal serum at PI. Opposite deviations have dicarboxylic amino acids, lysine, histidine, glycine, tyrosine and threonine, the number of which increases, strengthening the nitrogen imbalance. In the blood serum of the umbilical cord for most amino acids, was a similar direction of changes, but the degree of it is more pronounced. The opposite direction of changes is found for glycine, threonine, tyrosine, the content of which is reduced. The results of the study make it possible to broaden the understanding of the mechanisms of PI development and to offer informative tests for predicting the state of newborns.*

**Key words:** free amino acids, serum of mother and fetus blood, placental insufficiency

**For citation:** Pogorelova T.N., Gunko V.O., Nikashina A.A., Mikhelson A.A., Mikhelson A.F., Lebedenko E.Yu., Alliluev I.A., Influence of amino acid imbalance in maternal and fetal organisms on the development of placental insufficiency and the course of the neonatal period. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (10): 610-614 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-610-614>

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

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

Mikhelson A.F.: <https://orcid.org/0000-0002-6792-0982>

Lebedenko E.Yu.: <https://orcid.org/0000-0003-2602-1486>

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

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

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

Received 31.10.2018  
Accepted 03.11.2018

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

*Введение.* Течение гестационного периода, процессы роста и развития плода во многом определяет аминокислотный баланс в системе мать–плацента–плод. Помимо участия в биосинтезе белков, аминокислоты выполняют многочисленные функции, в частности, как предшественники биоактивных соединений, нейромедиаторов, индукторы пролиферативных реакций, интенсивно протекающих в течение пренатального онтогенеза, регуляторы иммунного ответа и ионного равновесия в клетках [1]. Обеспечение плода этими важными компонентами во многом зависит от функционально-метаболического состояния плаценты, осуществляющего взаимосвязь между организмами матери и плода. Плацентарная недостаточность (ПН), являющаяся одной из серьёзных причин перинатальной заболеваемости и смертности, занимает значительное место среди осложнений беременности [2, 3]. В международную классификацию болезней ПН включена как основной диагноз патологического состояния плода (МКБ10 O36.5). Несмотря на большое число исследований, посвящённых этой акушерской патологии, биохимические аспекты её развития остаются не полностью выясненными.

Цель работы – определить аминокислотный состав сыворотки матери и крови пуповины при физиологической беременности и ПН для выяснения возможной роли выявленных нарушений в развитии данной патологии и оценить их влияние на состояние плода и развитие новорождённого в неонатальном периоде.

*Материал и методы.* В исследование включены 57 женщин в возрасте 24–32 лет, составивших две группы. В контрольную группу вошли 28 клинически здоровых женщин с неосложнённым течением беременности и своевременными родами (в 39–40 нед). Основную группу составили 29 женщин, беременность которых осложнилась ПН, верифицированной после родов. Диагноз ПН был поставлен на основании комплексного клиничко-лабораторного обследования, включающего ультразвуковую фетометрию, доплерографию маточно-плацентарно-плодового кровотока, кардиотокографию и определение активности специфического плацентарного изофермента глутаматдегидрогеназы. По возрасту, индексу массы тела, анамнезу, паритету беременностей и родов, экстрагенитальной и гинекологической патологии группы беременных были сопоставимы. Все женщины дали информированное согласие на расширенный алгоритм обследования. Критериями исключения из исследования служили: декомпенсированные формы соматических заболеваний, аутоиммунная патология, многоплодная беременность. Критериями включения в исследование были: возраст женщин до 35 лет, отсутствие признаков преэклампсии и задержки роста плода. У пациенток обеих групп питание было полноценным и сбалансированным по основным ингредиентам, в том числе по белковому компоненту. До наступления беременности их масса тела была нормальной, во время беременности наблюдали адекватное увеличение массы тела. Материалом для исследования служили сыворотка крови рожениц и сыворотка крови вены пуповины. Содержание свободных аминокислот определяли на автоматическом анализаторе модели ААА-400 (Microtechno, Чехия). Подготовку проб и анализ проводили согласно инструкции к анализатору по стандартной программе с использованием трёх натрий-цитратных буферных растворов с рН 3,25, 4,25, 5,28. На каждую хроматографическую колонку анализатора нанесли 0,3 мл пробы.

Скорость тока 70 мл/ч. Идентификация аминокислот, расчёт площадей пиков и определение концентрации осуществляли по результатам анализа соответствующих стандартных образцов (Sigma-Aldrich, США) для калибровки прибора.

Статистическую обработку данных проводили, используя лицензионный пакет программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc.). Степень соответствия данных нормальному распределению оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Однородность дисперсий проверяли по критерию Фишера. Достоверность различий между сравниваемыми показателями определяли по критерию Стьюдента (*t*-критерий). Результаты оценивали как статистически значимые при  $p < 0,05$ . Корреляционный анализ выполнен с использованием критерия Пирсона с расчётом коэффициента корреляции (*r*).

*Результаты.* Проведённые исследования выявили существенные отклонения в аминокислотном составе сыворотки крови матери и пуповины при ПН (см. таблицу). У пациенток основной группы обнаружено увеличение содержания ряда аминокислот: лизина, гистидина, глицина, тирозина, треонина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. Содержание аргинина, серина, глутамина, аланина, цистеина, метионина, триптофана, лейцина, фенилаланина и пролина, напротив, снижается по сравнению с аналогичными величинами в контрольной группе. В сыворотке крови вены пуповины для большинства аминокислот обнаружена сходная направленность изменений, однако степень её отличается от таковой в сыворотке крови матери. Кроме того, противоположная направленность обнаружена для глицина, треонина, тирозина.

Среди аминокислот, уровень которых повышается в сыворотке крови матери при ПН, наибольшая степень увеличения относительно нормальных величин отмечена для глутаминовой кислоты – на 38%. В то же время для её амида – глутамина установлено снижение содержания на 31%. Следует отметить, что между этими изменениями имеет место обратная корреляционная зависимость: коэффициент корреляции (*r*) равен  $-0,87$  ( $p < 0,01$ ), что подтверждает взаимозависимость данных показателей. Для второй дикарбоновой аминокислоты – аспарагиновой, установлено повышение концентрации на 30%. Уровень лизина и гистидина также повышается, в среднем на 30%. Дисбаланс диаминокислот усиливается в результате разнонаправленных изменений содержания аминокислот, о чем свидетельствует снижение количества аргинина на 32%. Содержание гидрофильных аминокислот треонина и тирозина в сыворотке крови матери повышается в среднем на 30%. Менее значимые, но достоверные отклонения отмечены для гидрофобной аминокислоты – глицина, содержание которого повышается на 19%. Проведённый корреляционный анализ выявил прямую взаимосвязь между изменением концентрации глицина и треонина ( $r = 0,85$ ,  $p < 0,01$ ).

К числу аминокислот, количество которых снижается в сыворотке крови матери при ПН в среднем на 25–30%, относятся ароматические кислоты – пролин, триптофан, фенилаланин. Следует отметить негативную корреляционную связь между уровнем тирозина и фенилаланина, который является субстратом для синтеза тирозина ( $r = -0,89$ ,  $p < 0,01$ ). Снижение содержания в среднем на 27% отмечено также для метаболически взаимосвязанных метионина и серина. Уменьшение на 28% и 30% характерно для цистеина и аланина; они относятся к разным

**Содержание аминокислот в сыворотке крови матери и крови пуповины при физиологической беременности и плацентарной недостаточности**

Показатель	Содержание аминокислот в крови матери		$p_1$	Содержание аминокислот в крови пуповины		$p_2$
	Физиологическая беременность	Плацентарная недостаточность		Физиологическая беременность	Плацентарная недостаточность	
Лизин	0,75 ± 0,05 (0,65 - 0,85)	0,96 ± 0,07 (0,82 - 1,10)	0,019	1,14 ± 0,09 (0,96 - 1,32)	1,48 ± 0,11 (1,37 - 1,70)	0,021
Гистидин	0,65 ± 0,04 (0,57 - 0,73)	0,85 ± 0,06 (0,73 - 0,97)	0,008	0,86 ± 0,08 (0,70 - 1,02)	1,22 ± 0,12 (1,10 - 1,46)	0,016
Аргинин	0,87 ± 0,07 (0,73-1,01)	0,59 ± 0,04 (0,51-0,67)	0,001	1,2 ± 0,11 (0,98-1,42)	0,84 ± 0,07 (0,77-0,98)	0,001
Аспарагиновая кислота	0,91±0,07 (0,77 - 1,05)	1,17±0,08 (1,01 - 1,33)	0,038	1,12±0,07 (0,98 - 1,26)	1,35±0,09 (1,26 - 1,53)	0,050
Треонин	0,80 ± 0,06 (0,68 - 0,92)	1,0 6± 0,09 (0,88 - 1,24)	0,020	1,19 ± 0,08 (1,03 - 1,35)	0,85 ± 0,05 (0,80 - 0,95)	0,002
Серин	0,90 ± 0,07 (0,76 - 1,04)	0,65 ± 0,08 (0,49 - 0,81)	0,023	1,34 ± 0,12 (1,10 - 1,58)	0,83 ± 0,06 (0,77 - 0,95)	0,003
Глутаминовая кислота	1,05 ± 0,11 (0,83 - 1,27)	1,45 ± 0,13 (1,20 - 1,70)	0,023	1,63 ± 0,12 (1,39 - 1,87)	2,13 ± 0,16 (1,97 - 2,44)	0,016
Глутамин	1,24 ± 0,08 (1,08 - 1,40)	0,86 ± 0,05 (0,76 - 0,96)	0,001	1,98 ± 0,18 (1,63 - 2,33)	1,09 ± 0,09 (1,00 - 1,27)	0,001
Глицин	0,95 ± 0,05 (0,85 - 1,05)	1,13 ± 0,07 (0,99 - 1,27)	0,042	1,51 ± 0,14 (1,24 - 1,78)	1,06 ± 0,09 (0,97 - 1,24)	0,009
Аланин	1,35 ± 0,10 (1,15 - 1,55)	0,98 ± 0,08 (0,82 - 1,14)	0,005	2,03 ± 0,16 (1,72 - 2,34)	1,24 ± 0,10 (1,14 - 1,44)	0,002
Цистеин	0,64 ± 0,04 (0,56 - 0,72)	0,45 ± 0,03 (0,39 - 0,51)	0,001	0,79 ± 0,06 (0,67 - 0,91)	0,49 ± 0,04 (0,45 - 0,57)	0,001
Валин	0,78±0,08 (0,62 - 0,94)	0,75±0,07 (0,61 - 0,89)	0,778	1,12±0,10 (0,92 - 1,32)	1,08±0,09 (0,99 - 1,26)	0,767
Метионин	0,60 ± 0,05 (0,50 - 0,07)	0,44 ± 0,03 (0,38 - 0,50)	0,008	0,76 ± 0,06 (0,64 - 0,88)	0,47 ± 0,05 (0,42 - 0,57)	0,001
Триптофан	0,72 ± 0,05 (0,62 - 0,82)	0,48 ± 0,04 (0,40 - 0,56)	0,002	0,95 ± 0,09 (0,77 - 1,13)	0,56 ± 0,05 (0,51 - 0,66)	0,002
Изолейцин	0,47 ± 0,04 (0,39 - 0,55)	0,43 ± 0,04 (0,35 - 0,51)	0,483	0,72 ± 0,07 (0,58 - 0,86)	0,78 ± 0,08 (0,70 - 0,94)	0,576
Лейцин	0,93 ± 0,06 (0,81 - 1,05)	0,70 ± 0,05 (0,60 - 0,80)	0,005	1,27 ± 0,11 (1,05 - 1,49)	0,84 ± 0,06 (0,78 - 0,96)	0,001
Тирозин	0,96 ± 0,06 (0,84 - 1,08)	1,22 ± 0,09 (1,04 - 1,40)	0,020	1,33 ± 0,08 (1,17 - 1,49)	0,95 ± 0,06 (0,89 - 1,07)	0,001
Фенилаланин	0,87 ± 0,06 (0,75 - 0,99)	0,65 ± 0,05 (0,55 - 0,75)	0,007	1,24 ± 0,09 (1,06 - 1,42)	0,85 ± 0,05 (0,80 - 0,95)	0,001
Пролин	0,45 ± 0,03 (0,39 - 0,51)	0,31 ± 0,03 (0,25 - 0,37)	0,002	0,63 ± 0,06 (0,51 - 0,75)	0,39 ± 0,03 (0,36 - 0,45)	0,001

Примечание.  $p_1$  – достоверность различий между показателями при физиологической беременности и плацентарной недостаточности в крови матери;  $p_2$  – между показателями при физиологической беременности и плацентарной недостаточности в крови пуповины. Данные представлены в виде средней величины ± ошибка среднего (в скобках – 95% доверительный интервал).

группам аминокислот (полярным и неполярным) и в то же время одинаково взаимодействуют с ацетил-КоА через пируват [4].

Что касается аминокислотного состава сыворотки крови вены пуповины, по которой плоду поступает кровь из плаценты, то при ПН для многих аминокислот изменения более выражены. Так, содержание глутамин в крови плода снижается на 45%. Большая степень уменьшения (на 35–40%) относительно показателей в крови матери имеет место и для количества аргинина, аланина, цистеина, метионина, триптофана, фенилаланина и пролина. В отличие от материнской крови, в которой содержание глицина, тирозина, и треонина повышено относительно контроля, в крови плода показатели этих аминокислот снижаются (в среднем на 30–35%). Подобно взаимосвязям между аминокислотами в крови матери, в крови плода также обнаружена прямая корреляция

между изменением количества треонина и глицина ( $r = 0,85, p < 0,01$ ).

*Обсуждение.* Нарушение баланса свободных аминокислот, учитывая их важные функции, может сопровождаться серьезными повреждениями метаболических процессов в биологической системе мать – плацента – плод, приводя к развитию ПН. Как показали результаты наших исследований, при ПН в крови как матери, так и плода обнаружены разнонаправленные изменения содержания аминокислот.

Увеличение содержания ряда аминокислот может быть вызвано усилением активности пептидгидролаз при ПН. Для дикарбоновых аминокислот повышение содержания, вероятно, связано также с уменьшением их использования в реакциях трансминирования, декарбоксилирования, амидирования в условиях осложненной гестации. Так, снижение активности глутаминазы,

установленное при ПН [5], сопровождается накоплением глутаминовой кислоты и уменьшением количества глутаминина. В свою очередь нарушение баланса этих важных компонентов приводит к негативным последствиям в фетоплацентарной системе, учитывая их влияние не только на азотистый, но и энергетический метаболизм, во взаимосвязи между которыми участвуют дикарбоновые аминокислоты. Накопление последних отражается и на состоянии буферных систем, в которых они выполняют функции анионов. Определённый вклад в развитие ПН, по-видимому, вносит снижение содержания аланина, так как это может отразиться как на интенсивности энергетического обмена (в результате модификации активности его трансминирования), так и на синтезе биоактивных соединений, в частности ансерина и карнозина [4].

Значительное влияние на азотистый дисбаланс и гемодинамику в системе мать – плацента – плод оказывает уменьшение концентрации аргинина, участвующего в регуляции процессов пролиферации клеток, апоптоза, ангиогенеза и являющегося источником вазодилататора – оксида азота [6]. Увеличение количества гистидина в сыворотке крови матери может сопровождаться усилением продукции гистамина, обладающего сосудосуживающими свойствами и, следовательно, ухудшающего маточно-плацентарный кровоток. Выявленное повышение содержания лизина, очевидно, является результатом нарушения его использования в любом из метаболических процессов, в которых он участвует: обеспечение митохондриального окисления жирных кислот, синтез карнитина и гемоглобина [7] с последующим накоплением самой аминокислоты и уменьшением концентрации продуктов его обмена с соответствующим снижением интенсивности их действия.

На развитие ПН и внутриутробной гипоксии, которая имеет место при этом осложнении беременности, вероятно, будет влиять снижение содержания аминокислот с антиоксидантными свойствами: триптофана, фенилаланина и цистеина [8, 9]. Последний участвует в синтезе активного антиоксиданта – глутатиона, нарушение продукции которого вследствие уменьшения количества цистеина дополняет падение общей антиоксидантной активности при ПН. Несомненный интерес для суждения о роли аминокислотного дисбаланса в сыворотке крови женщин основной группы представляют метионин и серин. Эти аминокислоты являются участниками так называемого одноуглеродного метаболизма, как источники метильных групп для синтеза пуриновых нуклеотидов, фосфолипидов и других соединений [10]. Особенно важная роль в этих процессах принадлежит метионину, который участвует в метилировании ДНК, белков, биогенных аминов [11]. Серин, в свою очередь, может метаболизироваться в ацетил-КоА, связываясь, таким образом, с циклом трикарбоновых кислот [12]. В связи с изложенными выше функциями не вызывает сомнения значение уменьшения количества аминокислот в развитии ПН. Ещё одной аминокислотой, для которой характерно уменьшение содержания в крови матери при ПН, является пролин. Его участие в синтезе коллагена – важного компонента сосудистой стенки, объясняет возможные последствия такого изменения для состояния эндотелия сосудов [13].

Тот факт, что степень изменения содержания многих аминокислот в крови плода превышает таковую в крови матери, объясняется не только метаболическими изме-

нениями в организме матери, но и влиянием нарушения обменных процессов в плаценте. Резкое снижение поступления глутаминина из плаценты при ПН весьма отрицательно влияет на развитие плода, поскольку этот амид необходим плоду для роста клеток больше, чем любая другая аминокислота [14]. С учётом метаболических функций аминокислот, содержание которых значительно уменьшается в крови плода, можно полагать, что такие отклонения по сравнению с контрольными данными будут сопровождать выраженное снижение антиоксидантных процессов в организме плода, нарушение гемодинамики, клеточной дифференцировки, изменение структуры макромолекул в результате посттрансляционных модификаций, в частности метилирования.

Изменение метаболизма в плаценте при её недостаточности особенно сказывается на содержании аланина в крови пуповины, так как основную часть этой аминокислоты, доставляемой плоду, синтезирует плацента [15]. Однонаправленные изменения содержания глицина и треонина, вероятно, можно объяснить участием треонина в синтезе глицина [16]. В связи с этим снижение количества треонина может сопровождаться последующим уменьшением в крови пуповины содержания глицина [17].

Снижение уровня тирозина, наряду с таковым триптофана и фенилаланина, увеличивает сдвиг баланса про- и антиоксидантов, усиливая хроническую внутриутробную гипоксию. В ряде случаев большую информативность значения аминокислотного дисбаланса имеет соотношение аминокислот, а не их абсолютные значения. Так, эффективным прогностическим маркёром пост- и неонатальной энцефалопатии может служить коэффициент отношения глутаминовой кислоты – возбуждающего нейромедиатора и глицина – тормозного нейромедиатора [18]. Величина этого отношения в сыворотке крови пуповины при ПН в 1,8 раза превышает аналогичный показатель при неосложнённой беременности. Ещё одним прогностическим тестом развития неонатальных повреждений у новорождённых служит отношение аргинина и гистидина, которое в крови пуповины в основной группе в 2,3 раза меньше, чем в контрольной группе. Такая направленность изменения данного показателя, с учётом воздействия этих аминокислот на сосудистые реакции и гемодинамику, может сопровождать последующее развитие кардиомиопатии. Информативность указанных коэффициентов подтверждается наблюдениями за новорождёнными основной группы, которые находились в отделении патологии новорождённых НИИАП. Если в крови пуповины коэффициент отношения глутаминовая кислота/глицин составлял 2,0 и более (в норме 1,08), то к 7–8 дням жизни новорождённого были диагностированы признаки церебральных отклонений. В тех случаях, когда до 0,65 снижался показатель аргинин/гистидин (в норме он равен 1,5), появлялись признаки сердечно-сосудистой патологии.

*Заключение.* Полученные данные свидетельствуют о том, что при беременности, осложненной ПН, происходят значительные изменения в аминокислотном составе сыворотки крови матери и плода. Более выраженные отклонения имеют место в крови плода, что, очевидно, связано с нарушением аминокислотного обмена в плаценте. Выявленные изменения в спектре аминокислот, обладающих важными регуляторными и трофическими функциями, приводят к нарушению общего гомеостаза в системе мать – плацента – плод. Результаты настоящего

исследования позволяют расширить наши представления о биохимических механизмах развития ПН и предложить тесты для прогнозирования нарушений в неонатальном периоде.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 4, 6-14, 16-18  
см. REFERENCES)

2. Стрижаков А.Н., Тимохина Т.Ф., Баев О.Р. Фетоплацентарная недостаточность: патогенез, диагностика, лечение. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2003; 2(2): 53-64.
3. Сидорова И.С., Макаров И.О. Клинико-диагностические аспекты фетоплацентарной недостаточности. М.: МИА; 2005.
5. Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Линде В.А. Дисбаланс системы глутамин-глутаминовая кислота в плаценте и околоплодных водах при плацентарной недостаточности. *Биомедицинская химия*. 2014; 60(5): 596-601.
15. Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Авруцкая В.В., Каушанская Л.В., Дурницына О.А. Нарушение плацентарного обмена аминокислот при задержке роста плода. *Биомедицинская химия*. 2017; 63(3); 266-71.

## REFERENCES

1. Wu G. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Adv. Nutr.* 2010; 1(1): 31-7.
2. Strizhakov A.N., Timokhina T.F., Baev O.R. Fetoplacental insufficiency: pathogenesis, diagnostics, treatment. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii*. 2003; 2(2): 53-64. (in Russian)
3. Sidorova I.S., Makarov I.O. Clinical and diagnostic aspects of fetoplacental insufficiency [Kliniko-diagnosticheskie aspekty fetoplatsentarnoj nedostatochnosti]. Moscow: MIA; 2005. (in Russian)
4. Bröer S., Bröer A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochem. J.* 2017; 474(12): 1935-63.
5. Pogorelova T.N., Gunko V.O., Linde V.A. Imbalance of system of glutamin – glutamic acid in the placenta and amniotic fluid at

- placental insufficiency. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2014; 60(5): 596-601. (in Russian)
6. Khalil A., Hardman L., O'Brien P. The role of arginine, homoarginine and nitric oxide in pregnancy. *Amino Acids*. 2015; 47(9): 1715-27.
7. D'Mello J.P.F., ed. Amino acids in human nutrition and health. Wallingford; CAB International; 2012.
8. Orczyk-Pawilowicz M., Jawien E., Deja S., Hirnle L., Zabek A., Mlynarz P. Metabolomics of human amniotic fluid and maternal plasma during normal pregnancy. *PLoS One*. 2016; 11(4):e0152740.
9. Xu K., Liu H., Bai M., Gao J., Wu X., Yin Y. Redox properties of tryptophan metabolism and the concept of tryptophan use in pregnancy. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(7). pii: E1595.
10. El-Hattab A.W. Serine biosynthesis and transport defects. *Mol. Genet. Metab.* 2016; 118(3):153-9.
11. Dasarathy J., Gruca L.L., Bennett C., Parimi P.S., Duenas C., Marczewski S. et al. Methionine metabolism in human pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010; 91(2): 357-65.
12. Metcalf J.S., Dunlop R.A., Powell J.T., Banack S.A., Cox P.A. L-Serine: a naturally-occurring amino acid with therapeutic potential. *Neurotox. Res.* 2018; 33(1): 213-21.
13. Wadsack C., Desoye G., Hiden U. The fetoplacental endothelium in pregnancy pathologies. *Wien. Med. Wochenschr.* 2012; 162(9-10): 220-4.
14. Neu J. Glutamine in the fetus and critically ill low birth weight neonate: metabolism and mechanism of action. *J. Nutr.* 2001; 131(9 Suppl.): 2585S-2589S.
15. Pogorelova T.N., Gunko V.O., Avruцкая V.V., Kaushanskaya L.V., Durnitsyna O.A. Impairments of placental amino acid metabolism in fetal growth restriction. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2017; 63(3); 266-71. (in Russian)
16. Rees W.D., Hay S.M., Antipatis C. The effect of dietary protein on the amino acid supply and threonine metabolism in the pregnant rat. *Reprod. Nutr. Dev.* 2006; 46(3):227-39.
17. Razak M.A., Begum P.S., Viswanath B., Rajagopal S. Multifarious beneficial effect of nonessential amino acid, glycine: a review. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017; 2017:1716701.
18. Wang W., Wu Z., Dai Z., Yang Y., Wang J., Wu G. Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health. *Amino Acids*. 2013; 45(3):463-77.

Поступила 31.10.18  
Принята к печати 03.11.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616-005.757.9

Белоус М.С.<sup>1</sup>, Певнев А.А.<sup>1</sup>, Рябиков Д.В.<sup>2</sup>, Яковлев А.Ю.<sup>1</sup>

## К ВОПРОСУ О ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЖИРОВОЙ ГЛОБУЛЕМИИ

<sup>1</sup>ГБУЗ НО «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко», 603126, Нижний Новгород;

<sup>2</sup>ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 13», 603018, Нижний Новгород

*У 60 пациентов с тяжелой сочетанной травмой проведено сравнительное определение плазмы крови на наличие жировых глобул с использованием способа Черкасова В.А. и разработанного нами способа. Применение этого способа повышает точность качественного и количественного анализа за счет снижения эмульгирующего действия этилового спирта в красителе судан IV, предупреждения неравномерной окраски и разрушения препарата в течение 3 мин после приготовления. Разработана классификация жировых глобул, выделены капилляроопасные глобулы размером  $\geq 8$  мкм и артериолоопасные глобулы  $\geq 50$  мкм.*

**Ключевые слова:** диагностика жировой эмболии, жировые глобулы, классификация.

**Для цитирования:** Белоус М.С., Певнев А.А., Рябиков Д.В., Яковлев А.Ю. К вопросу о лабораторной диагностике жировой глобулемии. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 615-618. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-615-618>

*Belous M.S.<sup>1</sup>, Pevnev A.A.<sup>1</sup>, Ryabikov D.V.<sup>2</sup>, Yakovlev A.Yu.<sup>1</sup>*

TO THE QUESTION OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF FAT DROPLETS

<sup>1</sup>Nizhniy Novgorod regional clinical hospital named after N.A. Semashko, Nizhniy Novgorod, 603126, Russian Federation;

<sup>2</sup>Nizhny Novgorod clinical hospital № 13, Nizhniy Novgorod, 603018, Russian Federation

*This study aims to compare of study of blood plasma for the presence of fat globules using the method of V.A. Cherkasov and the method what we developed in 60 patients with severe combined trauma. The use of the developed method increases the accuracy of qualitative and quantitative analysis by reducing the emulsifying action of the ethyl alcohol of Sudan IV, preventing uneven coloring and destruction of the preparation within 3 minutes after preparation. A classification of fat globules has been developed, capillary-hazardous globules of  $\geq 8$   $\mu$ m in size and arterioles-hazardous globules  $\geq 50$   $\mu$ m.*

**Key words:** diagnostics of fat embolism syndrome; fat droplets; classification.

**For citation:** Belous M.S., Pevnev A.A., Ryabikov D.V., Yakovlev A.Yu. To the question of laboratory diagnostics of fat droplets. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (10): 615-618 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-615-618>

**For correspondence:** Yakovlev A.Yu., Sc. D., Ass. Prof., ICU curator; e-mail: [aritmru@list.ru](mailto:aritmru@list.ru)

### Information about authors:

Belous M.S., <http://orcid.org/0000-0002-1869-6144>

Pevnev A.A., <http://orcid.org/0000-0002-2293-634X>

Ryabikov D.V. <http://orcid.org/0000-0002-4032-622X>

Yakovlev A.Yu. <http://orcid.org/0000-0002-4616-5711>

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

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

Received 24.10.2018

Accepted 01.11.2018

**Введение.** Жировая эмболия (ЖЭ) обусловлена множественной окклюзией артериальных сосудов жировыми эмболами (каплями триглицеридов, недифференцированными частицами липидов, цельными жировыми клетками, липидными комплексами размером более 7-8 мкм). Клиническое состояние пациента, как правило, характеризуют симптомы дыхательной недостаточности, проходящие нарушения кровообращения головного мозга и наличие на коже петехиальных (точечных) кровоизлияний. Жировая эмболия – это, в большинстве случаев, клинический диагноз, однако, к большому сожалению, до сих пор нет единого общепризнанного лабораторного показателя этого афизиологичного процес-

са, который бы обладал высокой чувствительностью и специфичностью. Лишь жировую глобулемии считают патогномичным признаком ЖЭ [1].

По данным литературы для выявления жировых глобул в крови используют световую микроскопию [2], вариант «темного поля» [3], флюоресцентную микроскопию [4], а также микроскопию плазмы крови, которую подвергли фильтрации [5] или ультрафильтрации [6]. При этом для обнаружения (окраски частиц жира) применяют как нейтральные жирорастворимые красители (нильский голубой сульфат, судан III, судан IV, липофильный краситель «Oil Red O»), а также и флюоресцентные (фосфин-3R) красители.

Первую попытку количественной оценки циркулирующего в крови жира в 1970 г. предпринял А. Gurd [7]. Для определения в пробирку помещают 2 - 10 мл

**Для корреспонденции:** Яковлев Алексей Юрьевич, д-р мед. наук, доц., куратор ОРИТ; e-mail: [aritmru@list.ru](mailto:aritmru@list.ru)

крови. После образования сгустка кровь центрифугируют в течение 10 мин. со скоростью 3500 об/мин<sup>-1</sup>. Полученный супернатант отбирают пипеткой и делят на две части. Первую используют для определения концентрации триглицеридов (ТГ); вторую часть фильтруют через бумажный микрофильтр с диаметром пор 8 мкм с последующим орошением фильтра липофильным красителем судан IV. Далее фильтр подвергли микроскопии с определением диаметра глобул при использовании объект- и окуляр-микрометра, видимых только на поверхности фильтра; их общей площади. Одновременно в фильтрате определяли концентрацию ТГ. Различие содержания липидов в плазме крови и фильтрате, весьма приблизительно, характеризовали как «патологические ТГ» при формировании ими глобул размером более 8 мкм.

В 1997 г. В.М. Кустов и соавт. [8] предложили более удобный для клинического применения полуколичественный метод определения глобулемии. Для приготовления препарата автор использовал 5 мл венозной крови, смешанной с 0,5 мл 3,8% цитрата натрия. После 20-30 мин отстаивания кровь центрифугировали при 1500 об/мин<sup>-1</sup> в течение 15 мин. Для определения брали верхний слой центрифугата: на предметное стекло наносили 0,02 мл плазмы в виде одной толстой капли. Для окрашивания жира в препарат добавляли 0,02 мл насыщенного раствора судана III в спирте, накладывали покровное стекло и проводили световую микроскопию для фиксации липидов в проходящем свете при увеличении 7 x 40 (280 x). Оценку проводили по разработанным авторами критериям (табл. 1).

Заметим, что наклеивание покровного стекла приводит к «утеканию», потере части исследуемого материала и визуальному увеличению размеров глобул в потоке; это, безусловно, влияет на точность проводимого измерения. При этом не проводят исследования количественных и качественных характеристик обнаруженных жировых глобул. Кроме того, разработанные авторами критерии предполагают описание либо отдельно взятого поля зрения, либо в динамике в четырех препаратах, приготовленных через интервалы времени от 30 мин. до 1 суток после протезирования крупных суставов. Это не позволяет провести объективную оценку жировой глобулемии.

В целях большей объективности диагностики жировой эмболии Черкасов В.А. и соавт. [9] в 2000 г. предложили способ, отличительной особенностью которого является использование для микроскопии образцов артериальной крови. Однако и этот метод не позволяет в динамике проводить оценку формирования жировой глобулемии.

Таблица 1

Оценка жировой глобулемии по Кустову В.М.

Степень глобулемии	Описание микроскопической картины
(+)	редкие жировые глобулы ( $d > 4$ мкм) в препарате;
(++)	единичные глобулы (до 10 мкм) в поле зрения;
(+++)	глобулы больших размеров и разной величины ( $d > 6-12$ мкм) в каждом поле зрения;
(++++)	слившиеся большие капли в каждом препарате;
(-)	жировые глобулы не обнаружены во всех четырех препаратах

Недостатки известных методов диагностики жировой глобулемии затрудняют широкое их применение и рассмотрение лечащими врачами, в первую очередь, травматологами и анестезиологами-реаниматологами; отсутствует возможность быстрого получения и интерпретации результатов анализа. В то же время, жировая глобулемия встречается более чем у 80 % пострадавших с тяжелой сочетанной травмой (ТСТ). Изложенное выше явилось побудительным фактором для разработки метода приготовления препарата крови с целью выявления наличия жировых глобул и классификации их по признаку опасности эмболизации сосудов системы микроциркуляции.

Цель исследования - разработка способа лабораторной диагностики и оценки выраженности жировой глобулемии.

*Материал и методы.* Проведено микроскопическое исследование плазмы крови на наличие жировых глобул у 60 пациентов с ТСТ (ISS  $\geq 17$  баллов), госпитализированных в отделение реанимации и интенсивной терапии Нижегородского регионального травматологического центра при ГБУЗ НО «НОКБ им. Н.А. Семашко». Кровь брали у пациентов в вакуумные пробирки с 3,2%-цитратом Na «BD Vacutainer» и проводили определение жировых глобул с помощью двух способов. В контрольной серии определение наличия жировых глобул проводили по методу Черкасова В.А. [9]: исследуемую кровь центрифугировали со скоростью 2000 об/мин<sup>-1</sup> в течение 15 мин. Затем полученную плазму в количестве 20 мкл наносили на предметное стекло в виде толстой капли. В каплю добавляли 6 капель спиртового насыщенного раствора судан IV. Через 1 мин препарат просматривали под микроскопом. В опытной серии использовали разработанный нами способ: кровь 10-15 мин центрифугировали со скоростью 2000 об/мин<sup>-1</sup>. 50 мкл плазмы вносили в пробирку с 50 мкл красителя судан IV. Содержимое смешивали трехкратным переворачиванием пробирки. Через 1 минуту из полученной смеси забирали 10 мкл и наносили на предметное стекло, после чего препарат исследовали под микроскопом. При увеличении в 100 раз полученный препарат рассматривали в 16 полях зрения. Подсчет глобул в контрольной серии проводили также в 16 полях зрения. Для нивелирования влияния разведения на оценку глобулемии использовали поправочный коэффициент 8, пропорциональный степени разведения сыворотки в контрольной серии определений.

Для микроскопического исследования препаратов в обеих сериях использовали микровизор медицинский проходящего света mVizo-101 (ЛОМО, Россия), который позволяет делать «цифровые» фотографии. Полученные микрофотографии обрабатывали с помощью компьютерной программы JMicroVision 1.2.7 [10]. Это позволило подсчитать общее количество глобул, размер глобул, а также общую площадь глобул. Статистическая обработка результатов определения проведена с помощью пакета прикладных программ PSPP 0.10.2. Все данные проверены в отношении нормальности распределения с помощью тестов Шапиро-Уилка, Колмогорова-Смирнова. Для сравнения количественных признаков с асимметричным распределением использовали U-критерий Манна-Уитни. Разницу считали статистически значимой при  $p \leq 0,05$ .

*Результаты и обсуждение.* Результаты выявили статистическую достоверность данных, полученных в контрольной и опытной сериях (табл. 2, 3).

**Количество и общая площадь глобул в препарате при световой микроскопии, Ме [0,25; 0,75]**

Параметр	Контрольная серия	Опытная серия
Количество глобул $\geq 8$ мкм, шт.	11,5 [7,5; 13,75]	21,5 [15,5; 37]*
Количество глобул $d = 8-20$ мкм, шт.	6,2 [3,5; 8,4]	11,4 [8,3; 14,5]*
Количество глобул $d = 21-50$ мкм, шт.	3,1 [0; 4,7]	7,0 [6,2; 9,9]*
Количество глобул $d \geq 50$ мкм, шт.	1,2 [0; 3,2]	3,4 [0; 6]*
Общая площадь глобул $d \geq 50$ мкм, мкм <sup>2</sup>	4784,2 [1673,8; 9855,9]	10022,5 [5125,7; 24660,2]*

\* - статистическая значимость различий значений опытной серии относительно значений контрольной серии ( $p \leq 0,05$ ).

Таблица 3

**Количество и площадь зон разрушения и неравномерной окраски препарата через 3 мин после приготовления,  $M \pm \sigma$ , Ме [0,25; 0,75]**

Параметр	Контрольная серия	Опытная серия
Количество зон разрушения, шт.	3,2 $\pm$ 1,46	0 [0; 0]*
Площадь зон разрушения, мм <sup>2</sup>	8,9 $\pm$ 4,06	0 [0; 0]*
Площадь зон неравномерного окрашивания, мм <sup>2</sup>	0,115 [0; 0,643]	0 [0; 0]*

\* - статистическая значимость различий значений опытной серии относительно значений контрольной серии ( $p \leq 0,05$ ).

Таблица 4

**Сравнительная характеристика методик диагностики жировой глобулемии**

Характеристики способа	Способ Черкасова В.А. и соавт. [9]	Модифицированная методика
Место окрашивания препарата	Предметное стекло	Пробирка
Количество необходимой плазмы, мкл	20	50
Количество необходимого красителя, мкл	300	50
Количество исследуемой смеси, мкл	320	10
Время экспозиции красителя, мин	1	1
Использование покровного стекла	нет	нет

При сравнении результатов видно, что при использовании разработанного способа зафиксировано статистически значимое увеличение количества глобул в препарате и общей площади глобул. При этом в опытной серии увеличилось количество жировых глобул диаметром  $\geq 50$  мкм, что соответствует размеру артериол в которых могут быть образованы эмболы. Глобулы диаметром  $\geq 50$  мкм следует считать потенциально эмбоопасными для артериол системы микроциркуляции, с последующим развитием полиорганной недостаточности, инициированной ЖЭ.

При использовании разработанного способа в опытной серии количество глобул статистически значимо превышало таковые в контрольной серии при отсутствии зон разрушения и неравномерного окрашивания препарата. Повышение качества идентификации жировых глобул в опытной серии мы связываем, прежде всего: а) со снижением количества спиртосодержащего красителя, необходимого для приготовления препарата и б) длительностью экспозиции смеси

плазмы крови и красителя не на предметном стекле, а в пробирке.

Необходимо отметить, что недостатки способа Черкасова В.А. [9] были известны и ранее. Во многом это определено тем, что целью разработанного авторами способа являлось определение наличия артериальной глобулемии, а не количественная ее оценка.

При данном способе диагностики жировой эмболии слишком высока степень разведения сыворотки пациента (20 мкл сыворотки / 6 капель красителя) затрудняет поиск жировых глобул в препарате, а также визуальную оценку жировой глобулемии.

На рис. 1 (см. обложку) изображен препарат плазмы крови, приготовленный с помощью способа Черкасова В.А. [9]. Видно интенсивное и неравномерное окрашивание препарата, при этом визуализируется лишь одна глобула (обозначена цифрой 1).

Спирт, в большом количестве входящий в состав красителя судан IV, может значимо влиять на размеры глобул жира [11] при высоком соотношении краситель/плазма, а за счет испарения спирта приводит к быстрому высыханию и разрушению препарата на предметном стекле.

На рис. 2 (см. обложку) видно разрушение центральной части препарата контрольной серии через 3 мин после его приготовления по мере испарения этилового спирта в составе красителя (обозначено цифрой 2).

Внесение красителя в сыворотку крови на предметном стекле не позволяет равномерно прокрашивать весь препарат, что приводит к затруднению подсчета жировых глобул в зонах слабого, или, наоборот, чрезмерного окрашивания препарата (рис. 3, см. обложку).

На рис. 3 видно, что препарат прокрашен не равномерно. Цифрами 2 и 3 обозначены области препарата с низкой и высокой степенью окрашивания, что затрудняет визуализацию жировых глобул. Цифрой 1 обозначена жировая глобула с нечеткими контурами за счет ее избыточного окрашивания.

Способ Черкасова В.А. [9] не позволяет количественно оценивать выраженность глобулемии; эта информация отсутствует в публикациях авторов. Это может быть связано с быстрым высыханием препарата, что препятствует объективной его оценке и с отсутствием объективных критериев выраженности глобулемии. Отличия модифицированной методики диагностики жировой глобулемии в сравнении со способом Черкасова В.А. представлены в табл. 4.

Модифицированный метод позволяет качественно идентифицировать жировые глобулы в плазме крови, дополнительно устанавливая общее количество и их площадь. Описанные преимущества связаны со снижением степени разведения нативной плазмы (1:1), меньшим содержанием спирта в смеси, меньшим временем экс-

позиции, отсутствием зон неравномерного окрашивания препарата, а так же с меньшим разрушением (особенно в краевых зонах) препарата.

Следует отметить, что фотографирование микропрепарата повышает скорость определения, а компьютерная обработка фотографий позволяет проводить быстрый математический анализ полученных результатов с получением количества глобул, их размера и общей площади. Последующее вычисление из площади глобул в препарате из 5 мкл исследуемой плазмы крови количества эмболоопасного жира в объеме циркулирующей крови позволяет прогнозировать течение органных нарушений, которые возникают вследствие эмболизации микроциркуляторного русла.

При цифровой обработке полученных результатов, жировые глобулы рационально классифицировать:

- Жировые глобулы размером  $\leq 7$  мкм;
- Жировые глобулы размером 8-20 мкм;
- Жировые глобулы размером 21-50 мкм;
- Жировые глобулы размером  $\geq 50$  мкм.

Следует считать все глобулы размером  $\geq 8$  мкм как капилляроопасные эмболы, глобулы размером  $\geq 50$  мкм - как артериолоопасные эмболы. Клиническое применение классификации позволит повысить унификацию методов определения жировых глобул и оценивать в динамике эффективность применяемых средств профилактики и лечения жировой эмболии.

#### Выводы:

Разработанный способ определения жировых глобул в крови двукратно повышает их выявление за счет снижения эмульгирующего действия этилового спирта, входящего в состав красителя судан IV, предупреждения неравномерной окраски препарата и разрушения в течение 3 мин. после его приготовления.

Оценку степени выраженности глобулемии рационально проводить по объективным критериям: количеству глобул размером  $\geq 8$  мкм, 8-20 мкм, 21-50 мкм,  $\geq 50$  мкм и их общей площади во всем препарате. Это позволяет прогнозировать течение жировой эмболии, оценивать влияние профилактики и лечения на глобулемию. При оценке жировой глобулемии необходима их классификация по степени эмболоопасности:  $\geq 8$  мкм – капилляроопасные,  $\geq 50$  мкм – артериолоопасные.

Цифровая форма регистрации и обработки результатов позволяет вносить объективные данные в историю болезни, обеспечивает их хранение, способствует стандартизации полученных результатов и оценке эффективности применяемых методов профилактики и лечения жировой эмболии.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-7, 10 см. REFERENCES)

1. Шифман Е. М. *Жировая эмболия: клиническая физиология, диагностика и интенсивная терапия*. Петрозаводск: ИнтелТек; 2003.
8. Кустов В. М., Перфилова П. Е., Нечуева И. Б. Роль лабораторных методов в диагностике жировой эмболии после операций на крупных суставах нижних конечностей. *Гений ортопедии*. 1997; 3: 25-8.
9. Черкасов В.А., Литвиненко С.Г., Рудаков А.Г. Способ диагностики травматической жировой эмболии. Патент РФ № 2195659; 2000.
11. Плахотина Е.Н., Бочаров С.Н., Творогова С.С., Дмитриева Л.А., Родионова Л.В., Кинаш И.Н. Эффективность лечения экспериментальной жировой эмболии наиболее часто применяемыми в клинической практике препаратами. *Acta Biomedica Scientifica*. 2005; 6: 157-61.

#### REFERENCES

1. Shifman E. M. *Fat embolism: clinical physiology, diagnosis and intensive care. Zhirovaya emboliya: klinicheskaya fiziologiya, diagnostika i intensivnaya terapiya*. Petrozavodsk: IntelTek, 2003. (in Russian)
2. Gage S. H, Fish P. A. Fat digestion, absorption, and assimilation in man and animals as determined by the dark-field microscope, and a fat-soluble dye. *Am. J. Anat.* 1924; 34: 1-85.
3. Frazer A.C. Stewart H.C. Ultramicroscopic particles in normal serum. *J. Physiol.* 1936; 87: 53-4.
4. Peltier L.F. The detection of fat droplets in the circulating blood. *Surgery*. 1954; 36 (2): 198-203.
5. Schlag G., Sommoggy S.V. Modification des Gurd-test zur Diagnostik der fettembolie im blat. *Act. Chir.* 1972; 7 (2): 347-50.
6. Tedeschi C.G., Castelli W., Kropp G., Tedeschi L.G. Fat macroglobulinemia and fat embolism. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1968; 126 (1): 83-90.
7. Gurd A.R. Fat embolism: an aid to diagnosis. *J. Bone Joint Surg. Br.* 1970; 52 (4): 732-7.
8. Kustov V. M., Perfiletova P. E., Nechueva I. B. The role of laboratory methods in the diagnosis of fat embolism after operations on large joints of the lower extremities. *Geniy ortopedii*. 1997; 3: 25-8. (in Russian)
9. Cherkasov V.A., Litvinenko S.G., Rudakov A.G. Method for the diagnosis of traumatic fat embolism. Patent RF N 2195659; 2000. (in Russian)
10. Roudit N. J. MicroVision: Image analysis toolbox for measuring and quantifying components of high-definition images. Version 1.2.7. <http://www.jmicrovision.com> (accessed 01 February 2016).
11. Plakhotina E.N., Bocharov S.N., Tvorogova S.S., Dmitrieva L.A., Rodionova L.V., Kinash I.N. The effectiveness of the treatment of experimental fat embolism most frequently used in clinical practice drugs. *Acta Biomedica Scientifica*. 2005; 6: 157-61. (in Russian)

Поступила 24.10.18

Принята к печати 01.11.18

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.017.1

Лахтин М. В., Лахтин В. М., Афанасьев С. С., Алёшкин В. А., Миронов А. Ю.

### ЛЕКТИНЫ И ГЛИКОКОНЪЮГАТЫ В ПРЕЗЕНТАЦИИ АНТИГЕНОВ И ЗАЩИТЕ ОТ ПАТОГЕНОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия

*Обобщены данные литературы о функционировании в защитных иммунных реакциях рецепторных лектинов. Отмечена перспективность гликоконъюгатных лигандов рецепторных лектинов при изучении кооперации иммунокомпетентных клеток. Распознающие паттерны рецепторные лектины иммунокомпетентных клеток (макрофагов, дендритных клеток, моноцитов, нейтрофилов, базофилов, лимфоцитов), участвуя в защите от сигналов опасности (PAMP, MAMP, DAMP, SAMP, TAMP) микробиоты и повреждённых структур организма являются неотъемлемыми составляющими участниками иммунного ответа при иммунологическом надзоре, модуляции, переключении путей, в зависимости от мини- и мегапаттерновой специфичности к гликоконъюгатам в составе сборочных структур (наночастиц, сом, дендримерных разветвлённых агрегатов), в том числе на основе конъюгированных или рекомбинантно слитых мультифункциональных гликоантигенов для эффективной презентации антигена. Рецепторные лектины участвуют в раннем биоконтроле связей врождённого иммунитета в глубинных узлах переключения сети презентации гликоантигенов и ответных реакций во взаимодействии с другими образраспознающими рецепторами. Лектины характеризуют функциональную биомаркёрность клеток в процессе созревания, перепрограммирования, переобучения, цепей клеточных связей и клеточных сетей, что важно для клинической лабораторной диагностики и прогноза. Рецепторные лектины вносят вклад в перераспределение про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов, интерферонов, фактора некроза опухоли в месте, необходимом для быстрого развития защитного ответа. Рецепторные лектины в коммуникационных межклеточных цепях являются мишенями для гликоконструкций профилактического, лечебного, информационного значения с целью регуляции иммунного ответа и клеточного тропизма для тканей и органов. Отмечены перспективы рецепторных лектинов при рассмотрении различных аспектов мукозального иммунитета, влияния на аутоиммунитет, использования против паттернов опасности в защитных и вакцинных стратегиях, при выборе наиболее эффективных специфических гликоконъюгатов и гликоадъювантов.*

**Ключевые слова:** лектины; гликоконъюгаты; адъюванты; паттерны-распознающие рецепторы; презентация антигенов; врождённый иммунитет; антигены-презентирующие клетки; дендритные клетки; макрофаги; нейтрофилы; базофилы; Т-лимфоциты; В-лимфоциты; межклеточные коммуникации; вакцинные стратегии.

**Для цитирования:** Лахтин М. В., Лахтин В. М., Афанасьев С. С., Алёшкин В. А., Миронов А. Ю. Лектины и гликоконъюгаты в презентации антигенов и защите от патогенов (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 619-625. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-619-625>

Lakhtin M. V., Lakhtin V. M., Afanasiev S. S., Aleshkin V. A., Mironov A. Yu.

#### LECTINS AND GLYCOCONJUGATES IN PRESENTATION OF ANTIGENS AND PROTECTION AGAINST PATOGENS.

G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology & Microbiology, Moscow, Russia

*The current data on using lectin receptors and glycoconjugates (GC) in study of pathways of intercellular communications within innate immunity network coupled to adaptive immunity were overviewed and systematized. A superfamily of GC-specific C-type lectin receptors (CLR), as a constituent of pattern recognizing receptors (PRR), involves in immunity to produce redistribution of groups of cytokines, chemokines and specific antibodies. CLR on surface of multiple subpopulations of antigen-presenting cells (APC) and other cells of immunity are under consideration (monocyte derived macrophages, macrophages, immature and mature dendritic cells, other myeloid cells, neutrophils, basophils, lymphocytes, etc.). CLR cofunction both each other and/or together with other PRR and immune receptors. CLR are favourable for quicker and GC-specific innate type presentation of important danger antigenic patterns (PAMP, MAMP, DAMP, SAMP, TAMP) using their specific targeting through currently/ adaptively optimal pathways within intercellular branched network of activated/polarized subpopulations of cells mentioned above. CLR agonist GC (recombinant, synthetic, conjugates to carriers (adaptive proteins, etc.), assembled into nanoparticles and liposomes) can serve successful and specific adjuvants in vaccine strategies. CLR and GC pairs participate in on duty biocontrol of immunobiological supervising in organism, modulate/ switch recognition and protection cell pathways of immune responses (presentation, reciprocally organized protective attacks, rates and amplitudes of activation and inhibition of cell communicative chains). Lectins characterized both cell and cell communicative chain current functional biomarkering that is of importance for clinical diagnostics. The knowledge on CLR-GC pattern relationships is perspective for study and influence fine mechanisms of cell GC-targeting and immunity, improvement of traditional vaccines, development of GC-specific and highly effective pattern vaccines against different*

*infections or tumors. New specific vaccine strategies are possible towards different biotopes in organism (also for mucosal opened cavities).*

**Key words:** *C-type lectins (CLR); glycoconjugates; adjuvants, patterns; PRR, innate immunity; mucosal immunity; antigen presentation cells (APC); macrophages; dendritic cells (DC); neutrophils; basophils; T-lymphocytes; B-lymphocytes; intercellular pathways; vaccines; vaccine strategies.*

**For citation:** *Lakhtin M. V., Lakhtin V. M., Afanasiev S. S., Aleshkin V. A., Mironov A. Yu. Lectins and glycoconjugates in presentation of antigens and protection against pathogens. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (10): 619-625 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-619-625>*

**For correspondence:** *Mironov A. Yu., Dr. Sci. Med., Professor, Head of the Department of Microbiology; e-mail: andy.60@mail.ru*

**Information about authors:**

Lakhtin M. V. <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>

Lakhtin V. M. <https://orcid.org/0000-0003-1737-0887>

Afanasiev S. S. <https://orcid.org/0000-0003-1737-0887>

Aleshkin V. A. <https://orcid.org/0000-0001-6785-0016>

Mironov A. Yu. <https://orcid.org/0000-0002-8544-523>

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

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

Received 31.05.2018

Accepted 15.06.2018

Лектины - белок-содержащие комплексы, распознающие гликоконъюгаты в виде пространственных образов - паттернов [1, 2, 25, 32, 39, 41]. Суперсемейство рецепторных лектинов С-типа (CLR: *C-type lectin receptors*), как и TLR (*Toll like receptors*), относится к паттерн-распознающим рецепторам (PRR: *pattern recognizing receptors*) [50]. PRR участвуют в кооперации иммунокомпетентных клеток: макрофагов, дендритных клеток [DC: *dendritic cells*], нейтрофилов, базофилов, Т-лимфоцитов CD<sub>4</sub><sup>+</sup> и CD<sub>8</sub><sup>+</sup>, В-лимфоцитов и др. [1, 2, 23, 39, 41]. Интерес к CLR обусловлен специфичным попаданием в клетки и разработкой на этой основе новых защитных стратегий. Конструкции гликоконъюгатов направленно достигают лектиновых рецепторов на клетках [28,33,36,39], обеспечивая постлектиновую презентацию антигенов [25, 32, 39, 41].

Участники межклеточных CLR-зависимых взаимодействий включают антигенпрезентирующие клетки: макрофаги; миелоидные клетки, в том числе незрелые и зрелые дендритные клетки, НК-клетки, базофилы, В- и Т-лимфоциты.

Иммунологический надзор в организме осуществляется за всей микробиотой, включая пробиотическую [41]. Сигналы опасности включают PAMP (pathogenic associated molecular patterns), MAMP (microbial associated molecular patterns); DAMP (damaged associated molecular patterns), SAMP (self associated molecular patterns) [23], TAMP (tumor associated molecular patterns) [10]. CLR распознают образы гликанов, осуществляют захват антигенов, их интернализацию, рециклический сортинг в лизосомы. CLR функционируют совместно с TLR. CLR мультифункциональны, они участвуют в распознавании образов гликоконъюгатов, функционируют как рецепторы фагоцитоза и молекулы адгезии [25]. CLR миелоидных клеток участвуют в их переключении, запускают пути активации или ингибирующие.

Лектины-гликоконъюгаты связаны с разработкой лекарственных препаратов, иммуномодуляторов, специфических гликоконъюгаты-адъювантов [2,3]. CLR на антигенпрезентирующих клетках являются перспективными мишенями при разработке антимикробных стратегий против гриппа, СПИДа, туберкулёза, дифтерии и др. [25].

Разнообразие CLR в организме человека (табл. 1) обусловлено типом клеток, их рецепторами, наличием в клеточных слоях, матриксах, тканях, органах совместно функционирующих клеток {антигенпрезентирующие клетки, дендритные клетки главных субпопуляций: cDC<sub>1</sub> [конвенциональные, миелоидные], cDC<sub>2</sub>, pDC [плазмацитойдные], moDC [монокитарного происхождения], LC [клетки Лангерганса {*Langerhans cells*}]}, макрофагов (M2 и др.), лимфоцитов (Т- и В-, НК, других)}, содержащих паттерны гликоконъюгатов, что обуславливает связь между CLR, CLR и TLR. Иммунокомпетентные клетки несут на своей поверхности различные CLR [10, 18, 23, 27, 31, 34, 35, 37, 41, 42, 45, 55]. Выраженность CLR, их сочетания с CD и другими PRR служит новыми критериями выявления функционально активных субпопуляций антигенпрезентирующих и защитных клеток (НК, других нейтрофилов, базофилов) (табл. 1).

Иммунный ответ организма реализуется через усиление сигнала при презентации антигена, перераспределение цитокинов и хемокинов, увеличение доли специфических антител. При развитии иммунного ответа дендритные клетки мигрируют в лимфоидную ткань и лимфоузлы, где взаимодействуют с Т- и В-лимфоцитами для инициации гуморального иммунного ответа [51].

Кооперация CLR заключается в их способности функционировать совместно друг с другом, с другими PRR, рецепторами интерферона (ИФН) и иммунорецепторами, в том числе в составе гетеродимеров и мультимеров [20, 23]. CLEC<sub>2</sub> функционирует в форме димера, способен агрегировать после связывания гликоконъюгаты [23]. MCL образует функциональный комплекс с Mincle (реализуется эндофагоцитозная способность MCL) и FcR-γ (реализуется сигнальная способность MCL) [23]. Dectin<sub>3</sub> образует гетеродимер с Dectin<sub>2</sub>. Только Dectin<sub>3</sub> является сенсором для индукции Mincle, усиливающего врождённый иммунитет против микобактерий [56]. Гетеродимер Dectin<sub>2</sub>-CLECSF<sub>8</sub> обладает повышенной чувствительностью к α-маннанам *C. albicans*. CLECSF<sub>8</sub> требуется и для индукции Mincle [10]. В других случаях совместно функционируют ковалентно связанные гетеродимеры, например, CD<sub>94</sub>/NKG2 (CLR; член семейства рецепторов НК-клеток человека [21]). Экспрессия

NKG2C на циркулирующих Т- и В-лимфоцитах усиливается при введении макакам живой ослабленной SIV (simian immunodeficiency virus) вакцины. При развитии иммунного ответа на патогенные бактерии Dectin<sub>3</sub> усиливает врождённый иммунитет через Mincle [56]. Мыши с дефицитом Dectin<sub>3</sub> или CARD<sub>9</sub> продуцируют меньше цитокинов и специфичных антител. DC-SIGN миелоидных клеток человека находится под контролем активированных TLR<sub>2</sub> (CD<sub>282</sub>), в результате чего в случае с пародонтопатогеном *Porphyromonas gingivalis* возможна блокада пути паттерновой аутофагии и внутриклеточное выживание патогена [14]. Внутриэпителиальные Т-лимфоциты слизистой оболочки несут CLR Nkrp1g, совместно функционирующий с C1r-f, экспрессированный только на дифференцированных эпителиальных клетках кишечника [30,45].

*Кооперация иммунокомпетентных клеток с участием CLR.* CLR функционируют совместно с другими рецепторами на активированных иммунокомпетентных клетках в присутствии гликоконъюгатных лигандов. Способность CLR к кооперации обусловлена наличием гликоконъюгатсвязывающих лектиновых доменов С-типа и других функционально значимых доменов, таких как ITAM/ITIM [10, 23]. ITAM (*integral immunoreceptor tyrosine-based activation*) включают Mincle, Dectin<sub>2</sub>, BDCA<sub>2</sub>, DCAR, MCL. Эти CLR сходным с рецептором Fc-α-RI образом запускают Туг-фосфатазный сигнальный путь (Syk-путь). Другой класс CLR, включающий MR, DEC<sub>205</sub>, DC-SIGN, SIGNR<sub>1</sub>, Langerin, MGL, CLEC<sub>1</sub>, DCAL<sub>1</sub>, LOX-1 миелоидных клеток характеризуется отсутствием функционирующих доменов ITAM или ITIM. Трегалоза-6'6'-димиколат-индуцированная (TDM) экс-

Таблица 1.

Рецепторные лектины С-типа (Ca<sup>2+</sup>-зависимые) человека и млекопитающих

Лектин	Альтернативное название	Специфичность	Клетки-носители	Ссылки
BDCA <sub>2</sub>	CD <sub>303</sub> , FcRγ-сцепленный рецептор	маркёр	плазмацитоидные дендритные клетки pDC	[23]
CARD <sub>9</sub>	Молекула подгруппы Dectin2	α-маннаны	нейтрофилы	[7, 13, 30, 56]
CD <sub>44</sub>	-	гиалуронан	дендритные клетки	[33]
CLEC2A	KAC <sub>1</sub> , Syk-сцепленный рецептор	паттерны ГК	антигенпрезентирующие клетки	[23]
CLEC2E	Clr-a	маркёр	эпителий кишечника мыши	[45]
CLEC10A	CLECSF14, CD <sub>301</sub>	маркёр	базофилы	[34]
DCAR	FcRγ-сцепленный рецептор	микобактериальные гликолипиды	моноциты при воспалении	[23; 37]
DCIR	-	Man-, Fuc-гликаны	дендритные клетки	[19]
DC-SIGN	CD <sub>209</sub>	Fuc и Man в LeX, LeY, LeA, LeB, маркёр	дендритные клетки CD <sub>14</sub> <sup>+</sup> , макрофаги, В-клетки	[14; 18; 23]
Dectin <sub>1</sub>	CLEC7A, CLECSF <sub>12</sub> , CD <sub>369</sub> , Syk-сцепленный рецептор	β-1, 3-глюканы/ маннаны, маркёр	макрофаги, дендритные клетки (DC CD <sub>11c</sub> <sup>+</sup> ), нейтрофилы, субпопуляции Т-клеток	[12; 35]
Dectin <sub>2</sub>	CLEC6A, CLECSF <sub>10</sub> , CLEC4N (мышь), Nkl, FcRγ-сцепленный рецептор	α-маннаны	дендритные клетки, дендритные клетки CD <sub>141</sub> <sup>+</sup>	[10; 35]
Dectin <sub>3</sub>	CLEC4D, CLEC <sub>6</sub> , CLECSF8, MCL, MPCL, CD <sub>368</sub> , Syk-сцепленный рецептор	паттерны ГК, маркёр	макрофаги	[10; 37]
DEC <sub>205</sub>	CD <sub>205</sub>	маркёр	базофилы	[34; 40; 47]
DNGR <sub>1</sub>	CLEC9A, Syk-сцепленный рецептор	паттерны ГК	cDC <sub>1</sub> , CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> , CD <sub>141</sub> <sup>+</sup>	[8; 35]
Langerin	CD <sub>207</sub>	Man <sub>олиго</sub> -лиганды, LeY	клетки Лангерганса (LC)	[11]
MDL <sub>1</sub>	CLEC5A	паттерны ГК	макрофаги костного мозга мыши	[49]
MGL <sub>1</sub>	-	Gal/GalNAc-лиганды, LeX, маркёр	CD <sub>11c</sub> <sup>+</sup>	[15, 25, 42]
Mincle	CLEC4E, CLECSF9, FcRγ-сцепленный рецептор	α-маннаны, трегалоза-6'6'-димиколат, дизфирные гликолипиды трегалозы	макрофаги	[22; 41]
MICL	CLEC12A, CLL <sub>1</sub> , DCAL-2, KLRL <sub>1</sub>	паттерны ГК	CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> , нейтрофилы	[10]
MMR	MR, MRC <sub>1</sub> , CLEC4D, CD <sub>206</sub>	маннаны	дендритные клетки CD <sub>141</sub> <sup>+</sup> , макрофаги	[34; 35; 41]
MRC <sub>2</sub>	CLEC13E, KIAA <sub>0709</sub> , TEM <sub>9</sub> , uPARAP, CD <sub>280</sub> , Endo 180	маннаны	макрофаги, базофилы	[34]
Nkrp1a	CD <sub>161</sub> , CD <sub>161inv</sub>	маркёр	NK, CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> , CD <sub>8</sub> <sup>+</sup> , CD <sub>103</sub> <sup>+</sup> /CD <sub>69</sub> <sup>+</sup> , Vα7.2 <sup>+</sup>	[17; 27; 43; 45]
Nkrp1g	-	паттерны ГК	NK мыши, CD <sub>103</sub> <sup>+</sup>	[31]
NKG2D, Nkrp1d, Nkrp1f	-	паттерны ГК	NK мыши	[45]
Siglec <sub>1</sub>	CD <sub>169</sub>	сиалоГК, маркёр	дендритные клетки свиньи	[55]
SIGNR <sub>1</sub>	CD <sub>209b</sub> , гомолог DC-SIGN мыши	man <sub>олиго</sub> -лиганды, маркёр	DC-подобные фагоциты	[26]

прессия Mincle зависит от Dectin<sub>3</sub>-обусловленного пути NF-κB. Dectin<sub>3</sub> активирует NF-κB-путь через комплекс CARD<sub>9</sub>-BCL<sub>10</sub>-MALT<sub>1</sub> (CARD<sub>9</sub>-путь) [56]. Происходит перераспределение функций интернализации антиген-презентирующих клеток паттернов различными CLR (MR, DC-SIGN, MGL, DCIR - второстепенная по значимости мишень с меньшей скоростью захвата гликозиллированных, влияет на DC-SIGN-путь) [19]. При функционировании сигнальной оси Syk (*Spleen tyrosine kinase/Caspase*)/Card9-путь (участие CLR: Dectin<sub>1</sub>, Dectin<sub>2</sub>, Mincle, MCL, DCAR [37]), Card9-зависимый ответ в нейрорепрессии реализуется с участием генов CLR (Dectin<sub>1</sub> [минимальная роль], Dectin<sub>2</sub> [возможная репрессивная роль], Mincle [ведущая роль]) [30]. В результате регистрируются Card9-зависимая Th<sub>17</sub>-поляризация и Th<sub>17</sub> (но не Th<sub>1</sub>)-ассоциированный антигенспецифичный ответ. Syk-киназные пути клеточных цепей сцеплены с CLR миелоидных клеток: hDCIR (человек), mDcir1 (DCIR мышь), mDcir2, MICL, MAgH, Ly49Q [23]. CLEC<sub>2</sub> и SIGN-R3, сцепленный с Syk-киназой, являются сигналами активации [23]. Макрофаги через лектин DNGR<sub>1</sub> контролируют локальное увеличение пула NK-клеток в ответ на патоген [8]. CLECSF<sub>14</sub>, Dectin<sub>1</sub>, Dectin<sub>2</sub> изменяют внутриклеточную передачу сигнала антигенпрезентирующих клеток [34]. При презентации антигенпрезентирующими клетками антигена Т-лимфоцитам происходит переключение путей [53]. Установлено преимущество CD<sub>40</sub> (DC) над CLR в отношении связей дендритных клеток с клетками CD<sub>8</sub><sup>+</sup>, но оно существенно уступает другим CLR [LOX1(DC) и Dectin<sub>1</sub> (DC)] при связях с клетками CD<sub>4</sub><sup>+</sup> [53]. Наблюдается CLR-зависимое переключение главных путей Th<sub>1</sub> (супрессия) — Th<sub>2</sub> (MGL+CD<sub>11c</sub><sup>+</sup> - активация) с усилением антипаразитарного ответа [42]. При аллерген-специфической иммунотерапии происходит перераспределение выраженности CLR на альвеолярных макрофагах (CD<sub>206</sub><sup>+</sup>, Dectin<sub>1</sub>) и дендритных клетках (CLEC9A, CD<sub>206</sub><sup>+</sup>, Dectin<sub>1</sub>) [35]. В отличие от миелоидных дендритных клеток, у которых CLR характеризуются только ингибиторной активностью, CLR моноцитов человека активируют и ингибируют антигенпрезентирующие клетки, придавая им свойства распознавания образцов и передачи сигнала [9].

Тропность и хоминг отражают сродство ГК-конструкций к клеткам, тканям, органам с участием CLR. Т-клетки памяти CD<sub>8</sub><sup>+</sup> с экспонированным лектином CD<sub>161</sub>(int) содержат ассоциированные с тропизмом к слизистой оболочке кишечника рецепторы CD<sub>103</sub> и CD<sub>69</sub>, что указывает на совместное функционирование путей мукозальной тканеспецифичности и способности осуществлять лекарственное или гликоконъюгат/адьювант/вакцина-направленное проникновение в лимфоциты [17]. Имеет место лангерин-обусловленный тропизм дендритных клеток в слизистой оболочке кишечника к субэпителиальным купольным областям Пейеровых бляшек [11]. Гликопротеин, кодируемый посредством Clec2e, является тканеспецифичным биомаркером кишечника, причём адьювант может снижать его экспрессию [45]. DNGR<sub>1</sub> экспрессирован только на дендритных клетках CD<sub>141</sub><sup>+</sup>, что обеспечивает высокоэффективную специфичную доставку в них [35]. Т-клетки CD<sub>161</sub><sup>+</sup>, CD<sub>8</sub><sup>+</sup> мукозальной ткани продуцируют больше ИЛ-17 и ИФН-γ, чем клетки крови; усиливают Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-функции клеток CD<sub>161</sub><sup>+</sup>, CD<sub>8</sub><sup>+</sup> [45]. Субпопуляции Т-клеток CD<sub>161</sub><sup>+</sup> Vα7.2<sup>+</sup> характеризуются различающимися паттернами хоминга [27]. При подкожной вакцинации на клетках

CD<sub>4</sub><sup>+</sup> активируется экспрессия DC-SIGN, MR, DCIR [16]. Специфичные к типу CLR ГК обуславливают преимущество иммунного ответа при накожной аппликации ГК-белковых конъюгатов [12].

*Пути модуляции.* Функции пространственной ориентации CLR не ограничиваются распознаванием паттернов мишеней, их пино- и фагоцитозом, влиянием на внутриклеточный путь передачи сигнала. Они важны для специфичной доставки лекарств в клетку и изменения функции клеток [32]. CLR моноцитов человека активируют и ингибируют антигенпрезентирующие клетки, придают им уникальные свойства распознавания паттернов и передачи сигнала [9].

*Пути усиления* иммунного ответа с участием CLR:

- кооперация рецепторов (несколько типов CLR на одном типе клеток, разных типах клеток; при восприятии сигналов от группы патогенов, например, с паттернами маннансодержащих полисахаридов, гликолипидов, других [41]); при этом повышается надёжность (за счёт шунтирования межклеточных путей) и усиливается результирующая презентация групп гликоантигенов.

- совместное функционирование CLR с TLR<sub>2</sub> (CD<sub>282</sub>), TLR<sub>4</sub> (CD<sub>284</sub>), TLR<sub>9</sub> (CD<sub>289</sub>); в результате образующихся мультикомплексов модифицируется специфичность к сигналам (вклад стыков рецепторов), усиливается восприятие сиаловых и сульфатированных лигандов; приобретает способность к восприятию наночастиц и липосомных гликоконъюгатов, подлежащих дальнейшему фагоцитозу; совместное функционирование TLR и CLR в сигнальных каскадах MAPK, NF-κB, Syk; рециклическое использование CLR-доставки во внутриклеточные сомы [33]; переключение путей ингибирования и активации [53].

- для усиления иммунного ответа ГК-конструкции вводятся совместно с другим типом гликоадьюванта (лектиновыми – гликозилированными В-субъединицами холерного токсина, энтеротоксинами *E. coli* и др.) [38, 41].

- перспективен поиск новых иммуномодуляторов, индукторов NK-клеток, ИФН-γ. Компоненты растений активируют через TLR-2,4 и CLR на дендритных клетках усиление продукции ИФН-γ и ИЛ-12 [52]. При разработке вакцин используется способность клеток растений к N-гликозилированию лектиновых В-субъединиц холерного токсина в качестве адьюванта [38].

- взаимодействие с другими защитными системами человека; CD<sub>205</sub> и CD<sub>206</sub>, одновременно являются рецепторами к компонентам комплемента.

*Влияние на аутоиммунитет.* Установлено влияние CARD<sub>9</sub>-пути на аутоиммунитет, в том числе его приостановление [7,41]. ДНК-вакцины, предусматривающие попадание антигена в клетки с помощью лектина DEC<sub>205</sub>, перспективны для лечения аутоиммунных болезней, обусловленных нарушениями кооперации клеток [40]. Сильный адьювант (В-субъединицы холерного токсина) способен нарушать аутоиммунитет [48].

*Специфичность.* Для усиления иммунного ответа важны CLR-фагоцитозо-чувствительные мультигликоконаноконструкции как адьюванты, в том числе липосомы и мультиантенные конгломераты [32]. Рекомбинантный MGL-Fc(человека)-слитый лектин в 10 раз сильнее связывается с мультиантенными N-гликанами, экспонирующими эпитопные трисахаридные структуры Льюиса - Lewis X (Le(X) при сравнении с моновалентным Le(X)-трисахаридом; иммунизация поли-

валентным конъюгатом Le(X)-овальбумин усиливает продукцию цитокинов и гуморальный иммунный ответ [15]. SIGNR<sub>1</sub> путём фагоцитоза наиболее эффективны в реализации врождённого иммунитета [26]. DC-SIGN моноцитных производных дендритных клеток участвует в фагоцитозе промастигот, но не амастигот, то есть зависит от стадии жизненного цикла патогенного простейшего *Leishmania mexicana* [4]. Ассоцианты CLR и других PRR (в первую очередь, TLR) важны для мобильной адекватности и соответствия презентуемых антигенов патогенов (на стыках, например CLR и TLR, меняется специфичность комплексного PRR, воспринимаемая как регулируемая мегапаттерновая). Выбор путей CLR-зависимых коммуникаций (Syk/каспазы-зависимых, сцепленных с CARRD9-путями) обусловлен наборами паттерновых ГК-лектиновых агонистов [37].

*Специфическое вовлечение антигенпрезентирующих клеток через CLR посредством ГК-агонистов CLR.* Раньше при конструировании вакцин внимание уделялось АТ-обусловленной доставке антигена к CLR как мишени. В последние годы интерес возрос в отношении основанной на гликанах специфической доставке антигенных конструкций к CLR [6, 22, 25, 26, 28, 32, 33, 39]. Миелоидные CLR, экспрессированные на антигенпрезентирующих клетках, являются перспективными мишенями для действия гликоконъюгатов на иммунный ответ [24]. Разрабатываются дисплеи ГК-паттернов мультивалентных гликанов на наночастицах, сомах, разветвлённых структурах (дендримерах), сборках субъединиц и молекул для эффективного попадания в антигенпрезентирующие клетки через CLR со специфическим усилением иммунного ответа [24, 33]. Небольшие структурные изменения в ГК-конструкциях могут значительно усилить результативность презентации антигена [6, 22, 28].

Использование синтетического О-2-корового β-1,2-N-гликана, конъюгированного с овальбумином, значительно повышает результирующее достижение CLR дендритных клеток [6]. В качестве коровых носителей в конъюгатных антигенах используются тетра- и гептавалентные гликокластеры D-глюкозы и гентабиозы, которые в составе конъюгатов с бычьим сывороточным альбумином позволяют выбирать антиген по его размеру и топологии [28]. Рациональный дизайн синтетического β-1,3-глюканового гексасахарид (агониста Dectin<sub>1</sub>), конъюгированного с генетически детоксицированным дифтерийным токсином, позволил усилить гуморальный иммунный ответ [12]. Новые пути усиления иммунного ответа открываются с использованием новых паттернов распознавания посредством Mincle - гликолипидных диэфирных производных трегалозы с двумя ацильными цепями (адьювантом, активирующим Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub>-путь) [22].

*Адьюванты вакцин.* Показателями изменений в микробиоте выступают CLR-вовлекаемые альтернативные шунтовые цепочки клеток [41]. При использовании неспецифических адьювантов (на алюминиевой основе и др.) могут возникать побочные эффекты, отсутствующие у гликоконъюгатов. Привлекательно обусловленное гликанами и CLR попадание в дендритные клетки [6]. Местный иммунитет активно изучается; мукозальные ГК-адьюванты включают гликопротеиновые лектиновые токсины (холерный, термолabile LTК<sub>3</sub> и LTR<sub>72</sub> из *E. coli*, хитозан [5, 48]. Разработка специфических ГК-адьювантов положена в основу получения эффективных

вакцин против патогенов. Поставлена задача разработки адьювантных индукторов мощного Th<sub>1</sub>-ответа для повышения эффективности вакцинации против внутриклеточных патогенов таких, как ВИЧ и малярийные плазмодии [51].

Толерогенность антигена может быть обусловлена его аллергенностью. При аллерген-специфической иммунотерапии возможно нарушение способности субпопуляций дендритных клеток реагировать с аллергеном, что индуцирует толерантность к нему [35]. Клетки периферической крови через год аллерген-специфической иммунотерапии при развитии толерантности к антигену характеризуются снижением экспрессии лектинов CD<sub>206</sub> и Dectin<sub>2</sub> на фоне снижения у дендритных клеток выраженности CLEC9A, CD<sub>206</sub> и повышения Dectin<sub>1</sub> [35], что указывает на потенциальную биомаркёрность толерогенности наборами CLR, и вовлечение в процесс толерогенности нескольких путей CLR-зависимых способных к переключению межклеточных связей. Поведение лектина DEC<sub>205</sub> на дендритных клетках при вакцинации может интерферировать с аутоиммунитетом [47].

*Связь CLR и их гликоконъюгатов с патологией.* Физиологическое влияние CLR зависит от возраста, типа ткани, типа распознаваемых паттернов, свойств агонистов CLR, развития иммунологической толерантности; наличия патологии, воспаления, инициированных направлений CLR-модуляции клеточных цепочек путей метаболизма и т. д. [39].

На мышцах апробирована высокоэффективная вакцина против вируса гриппа типа А с использованием адаптерных адьювантов, конъюгированных с антителами против лектина DEC<sub>205</sub> [40]. CLEC5A усиливает воспалительный ответ миелоидных клеток против вируса, у CLEC5A-дефицитных мышей наблюдаются сниженные уровни ФНО-α на фоне повышенного уровня ИФН-α [49]. Специфичная доставка в дендритные клетки CD<sub>205</sub><sup>+</sup> усиливает продолжительность индуцированного вакцинной иммунного ответа на ВИЧ<sub>1</sub> в желудочно-кишечном тракте [21, 44]. Против вируса Epstein-Barr (ВЭБ) используются подложечные белки (возможны лектиновые) в сборке ВЭБ-вакцинных эпитопов [3]. В ветеринарии против вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (PRRS-вируса) в качестве антивирусных мишеней перспективно использование сиалоадгезина CD<sub>169</sub> и DC-SIGN (CD<sub>209</sub>) [55].

Против *Mycobacterium tuberculosis* и других микобактерий [8, 56] реализуются ответы на паттерны: трегалоза-6,6'-димиколат (TDM, cord factor), липоарабиноманнан (LAM), липоманнан (LM), фосфатидинозитолманнозиды (PIM) [37]. CLEC9A вызывают обусловленное макрофагами местное пополнение числа нейтрофилов в ответ на убитые нагреванием клетки *M. tuberculosis* H37Ra, обуславливает продукцию цитокинов и хемокинов (ИЛ-1β, CXCL8) макрофагами [8]. В иммунном ответе на микобактерии Dectin<sub>3</sub> необходим для усиления врождённого иммунитета посредством Mincle [56]. Гексасахарид β-1,3-глюкана (специфичный к Dectin<sub>1</sub>), конъюгированный с анатоксином CRM197, позволяет получить высокую продукцию противодифтерийных антител при внутрикожном и подкожном введении антигена мышам [12]. Нетоксигенные *C. diphtheriae* и *C. ulcerans* уничтожаются макрофагами через связывание гликолипидной коринемиколиевой кислоты бактерий с рекомбинантным Mincle, причём экспрессия Mincle находится под управлением TLR<sub>2</sub> [46]. Защитные свойства

MGL используются в борьбе с острой пневмонией, вызванной *Klebsiella pneumoniae*, наряду с увеличением числа NK-клеток, имеющих набор CLR [24] и против заболеваний пародонта, вызванных *Porphyromonas gingivalis* [14].

CARD9 сигнальный путь защищает слизистые оболочки и центральную нервную систему от грибов [13].  $\beta$ -глюканы грибов запускают ROS-зависимый процесс продукции определённых субпопуляций нейтрофилов и дендритных клеток, содержащих Dectin<sub>1</sub>. Это дополняет процесс распознавания маннанов грибов рецепторами TLR, CD<sub>14</sub>, Dectin<sub>1</sub> и повышает надёжность и разнообразие форм иммунного ответа [54]. В иммунном ответе на *Candida albicans* Dectin<sub>1</sub> регулирует фагоцитоз, аутофагию, респираторный взрыв, продукцию противовоспалительных цитокинов (ИЛ-23, ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$ ), стимулирует продукцию интерферонов типа I [10]. Dectin<sub>1</sub> дендритных клеток и макрофагов ингибирует воспаление, индуцированное C5a-компонентом комплемента, распознает N-гликаны на опухолевых клетках. При специфичной лектиновой доставке в клетки  $\beta$ -глюкановые агонисты лектина Dectin<sub>1</sub> обладают противоопухолевым действием, и защищают от диабета I типа [10]. Наиболее активные в продукции ИФН типа I плазмацитоидные миелоидные дендритные клетки экспрессируют совместно функционирующие системы PRR: лектины с антимикотическим действием (Dectin<sub>1</sub>, Dectin<sub>2</sub>, Dectin<sub>3</sub>, MR), TLR<sub>4</sub> (CD<sub>282</sub>), TLR<sub>9</sub> (CD<sub>289</sub>) [36]. Dectin<sub>2</sub> распознает маннозные гликоконъюгаты с экспонированными  $\alpha$ -маннанами (кандиды) или гликопротеинами с O-присоединенной маннобиозой и запускает межклеточные защитные пути против *Candida* и *Malassezia* [10]. Отмечено антифунгальное действие Gal-специфичного лектина *Agrocybe aegerita* через CLR [41].

SIGN-фагоцитоз дендритных клеток инициируется промастиготами *Leishmania mexicana* на фоне резистентности амастигот [4, 41]. Клетки MGL<sup>+</sup> CD<sub>11c</sub><sup>+</sup> (результат направленного каскада активации *Fasciola hepatica*-MGL<sup>+</sup>-CD<sub>11c</sub><sup>+</sup>) специфичного в отношении гельминтов пути Th<sub>2</sub> экспрессируют ИЛ-10, ФНО- $\alpha$ , TGF- $\beta$  на фоне супрессии альтернативного пути Th<sub>1</sub>-регуляторных субпопуляций клеток [42].

**Заключение.** CLR вместе с другими PRR объединены в универсальную сеть коммуникаций врождённого иммунитета, связанного с адаптивным иммунитетом в рамках единой сети презентации антигенов и усиления защиты организма. CLR являются мощным резервом осуществления маневра иммунобиологическим надзором организма; повышения надёжности формирования защитного ответа на патоген или группу патогенов, системные нарушения в организме, в том числе опухолевой природы; являются основой для подстраховки, разнообразия, ускорения, переключения, корректировки направленности презентационной и эффекторной активностей гликоконъюгатов. CLR представляют интерес как мишени для терапии, применяются при изучении вакцин и конструировании специфичных паттерновых адъювантных кандидатов в вакцины повышенной эффективности. CLR являются важными участниками раннего значимого для функционирования паттерновых вакцин иммунного ответа. Перспективно использовать взаимоотношения рецепторный лектин-гликоконъюгат для оптимизации существующих вакцин, разработки вакцин нового поколения и стратегий вакцинации, в том числе на основании знаний о состоянии микробиоты

биотопов, в особенности, слизистых открытых полостей организма. CLR представляют интерес для клиники, клинической лабораторной диагностики, оценки функционального состояния иммунной системы.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-56 см. REFERENCES)

1. Лахтин М. В., Лахтин В. М., Афанасьев С. С., Алёшкин В. А. Взаимоотношения систем комплемента, Toll-подобных рецепторов, CD-антигенов и цитокинов в норме и при патологиях. *Acta Biomedica Scientifica*. 2015; 6: 62-6.
2. Лахтин М. В., Лахтин В. М., Алёшкин В. А., Афанасьев С. С., Корсун В. Ф. Лектины в терапии. *Проблемы научной мысли*. 2017; 10 (2): 77-84.

#### REFERENCES

1. Lakhtin M. V., Lakhtin V. M., Afanas'ev S. S., Alyoshkin V. A. Interrelation between the system of complement, Toll-like receptors, CD antigens and cytokines in normal and pathological condition (review). *Acta Biomedica Scientifica*. 2015; 6: 62-6. (in Russian)
2. Lakhtin M. V., Lakhtin V. M., Aljoshkin V. A., Afanas'ev S. S., Korsun V. F. Lectins in therapy. *Problemy nauchnoy mysli*. 2017; 2(10): 77-84. (in Russian)
3. Alonso-Padilla J., Lafuente E. M., Reche P. A. Computer-Aided Design of an Epitope-Based Vaccine against Epstein-Barr Virus. *J. Immunol. Res.* Volume 2017: Article ID 9363750: 1-15.
4. Apostólo Jde S., Lunardelli V. A., Coirada F. C., Boscardin S. B., Rosa D. S. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *J. Immunol. Res.* 2016: 1459394.
5. Argueta-Donohué J., Wilkins-Rodríguez A. A., Aguirre-García M., Gutiérrez-Kobeh L. Differential phagocytosis of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes by monocyte-derived dendritic cells. *Microbiol. Immunol.* 2016; 60(6): 369-81.
6. Brzezicka K., Vogel U., Serna S., Johannsen T., Lepenies B., Reichardt N. C. Influence of core  $\beta$ -1,2-xylosylation on glycoprotein recognition by murine c-type lectin receptors and its impact on dendritic cell targeting. *ACS Chem. Biol.* 2016; 11(8): 2347-56.
7. Brown B. R., Lee E. J., Snow P. E., Vance E. E., Iwakura Y., Ohno N. et al. Fungal-derived cues promote ocular autoimmunity through a Dectin-2/Card9-mediated mechanism. *Clin. Exp. Immunol.* 2017; 190(3): 293-303.
8. Cheng A. C., Yang K. Y., Chen N. J., Hsu T. L., Jou R., Hsieh S. L. et al. CLEC9A modulates macrophage-mediated neutrophil recruitment in response to heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. 2017; 12(10): e0186780.
9. Damasceno D., Andrés M. P., van den Bossche W. B., Flores-Montero J., de Bruin S., Teodosio C. et al. Expression profile of novel cell surface molecules on different subsets of human peripheral blood antigen-presenting cells. *Clin. Transl Immunology*, 2016; 5(9): e100.
10. Dambuza I. M., Brown G. D. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr. Opin. Immunol.* 2015; 32: 21-7.
11. De Jesus M., Ostroff G. R., Levitz S. M., Bartling T. R., Mantis N. J. A population of Langerin-positive dendritic cells in murine Peyer's patches involved in sampling  $\beta$ -glucan microparticles. 2014; 9(3): e91002.
12. Donadei A., Gallorini S., Berti F., O'Hagan D. T., Adamo R., Baudner B. C. Rational Design of Adjuvant for Skin Delivery: Conjugation of Synthetic  $\beta$ -Glucan Dectin-1 Agonist to Protein Antigen. *Mol. Pharm.* 2015; 12(5): 1662-72.
13. Drummond R. A., Lionakis M. S. Mechanistic Insights into the Role of C-Type Lectin Receptor/CARD9 Signaling in Human Antifungal Immunity. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2016; 6: 39.
14. El-Awady A. R., Miles B., Scisci E., Kurago Z. B., Palani C. D., Arce R. M. et al. *Porphyromonas gingivalis* evasion of autophagy and intracellular killing by human myeloid dendritic cells involves DC-SIGN-TLR2 crosstalk. *PLoS Pathog.* 2015; 10(2): e1004647.
15. Eriksson M., Serna S., Magliano M., Schlegel M. K., Seeberger P. H., Reichardt N. C. et al. Biological evaluation of multivalent Lewis X-MGL-1 interactions. *Chembiochem.* 2014; 15(6): 844-51.

16. Fehres C. M., Bruijns S. C., Sotthewes B. N., Kalay H., Schaffer L., Head S. R. et al. Phenotypic and functional properties of human steady state CD<sub>14</sub><sup>+</sup> and CD<sub>14</sub><sup>hi</sup> antigen presenting cells and epidermal langerhans cells. *PLoS One*. 2015; 10(11):e0143519.
17. Fergusson J. R., Hühn M. H., Swadling L., Walker L. J., Kurioka A., Llibre A. et al. CD<sub>161</sub><sup>int</sup> CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T cells: a novel population of highly functional, memory CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T cells enriched within the gut. *Mucosal Immunol*. 2016; 9(2): 401-13.
18. Ferguson D., Mattiuzzo G., Ham C., Stebbings R., Li B., Rose N. J. et al. Early biodistribution and persistence of a protective live attenuated SIV vaccine elicits localised innate responses in multiple lymphoid tissues. *PLoS One*. 2014; 9(8):e104390.
19. García-Vallejo J. J., Bloem K., Knippels L. M. Garssen J., van Vliet S. J., van Kooyk Y. The consequences of multiple simultaneous C-type lectin-ligand interactions: DCIR alters the endo-lysosomal routing of DC-SIGN. *Front. Immunol.*, 2015; 6: 87.
20. Geijtenbeek T. B., Gringhuis S. I. (2016). C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol*. 2016; 16(7): 433-48.
21. Hodara V. L., Parodi L. M., Keckler M. S., Giavedoni L. D. Increases in NKG2C expression on T cells and higher levels of circulating CD<sub>8</sub><sup>+</sup> B cells are associated with sterilizing immunity provided by a live attenuated SIV vaccine. 2016; 32(10-11): 1125-34.
22. Huber A., Kallerup R. S., Korsholm K. S., Franzky H., Lepenies B., Christensen D. et al. Trehalose diester glycolipids are superior to the monoesters in binding to Mincle, activation of macrophages invitro and adjuvant activity in vivo. *Innate Immun*. 2016; 22(6): 405-18.
23. Iborra S., Sancho D. (2015). Signalling versatility following self and non-self sensing by myeloid C-type lectin receptors. *Immunobiology*. 2015; 220(2): 175-84.
24. Johannssen T., Lepenies B. Glycan-Based cell targeting to modulate immune responses. *Trends Biotechnol*. 2017; 35(4): 334-46.
25. Jondle C. N., Sharma A., Simonson T. J., Larson B., Mishra B. B., Sharma J. Macrophage galactose-type lectin-1 deficiency is associated with increased neutrophilia and hyperinflammation in gram-negative pneumonia. *J. Immunol*. 2016; 196(7): 3088-96.
26. Kawauchi Y., Takagi H., Hanafusa K., Kono M., Yamatani M., Kojima N. SIGNR1-mediated phagocytosis, but not SIGNR1-mediated endocytosis or cell adhesion, suppresses LPS-induced secretion of IL-6 from murine macrophages. 2015; 71(1): 45-53.
27. Kurioka A., Jahun A. S., Hannaway R. F., Walker L. J., Fergusson J. R., Sverremark-Ekström E. et al. Shared and distinct phenotypes and functions of human CD<sub>161</sub><sup>++</sup> Va7.2<sup>+</sup> T cell subsets. *Front. Immunol*. 2017; 8:1031.
28. Kushwaha D., Xu P., Kováč P. Carbohydrates as potentially versatile core subcarriers for multivalent immunogens. *RSC Adv*. 2017; 7(13): 7591-7603.
29. Kveberg L., Sudworth A., Todros-Dawda I., Inngjerdigen M., Vaage J. T. Functional characterization of a conserved pair of NKR-P1 receptors expressed by NK cells and T lymphocytes in liver and gut. *Eur. J. Immunol*. 2015; 45(2): 501-12.
30. Lee E. J., Brown B. R., Vance E. E., Snow P. E., Silver P. B., Heinrichs D. et al. Mincle activation and the Syk/Card9 signaling axis are central to the development of autoimmune disease of the eye. *J. Immunol*. 2016; 196(7): 3148-58.
31. Leibelt S., Friede M. E., Rohe C., Gütle D., Rutkowski E., Weigert A. et al. Dedicated immunosensing of the mouse intestinal epithelium facilitated by a pair of genetically coupled lectin-like receptors. *Mucosal Immunol*. 2015; 8(2): 232-42.
32. Lepenies B., Lee J., Sonkaria S. Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2013; 65(9): 1271-81.
33. Liang X, Li X, Duan J, Chen Y, Wang X, Pang L, Kong D. et al. Nanoparticles with CD<sub>44</sub> targeting and ROS triggering property as effective in vivo antigen delivery system. *Mol. Pharm*. 2018; 15(2): 508-18.
34. Lundberg K., Rydnert F., Broos S., Andersson M., Greiff L., Lindstedt M. C-type lectin receptor expression on human basophils and effects of allergen-specific immunotherapy. *Scand. J. Immunol*. 2016; 84(3): 150-7.
35. Lundberg K., Rydnert F., Broos S., Andersson M., Greiff L., Lindstedt M. Allergen-specific immunotherapy alters the frequency, as well as the FcR and CLR expression profiles of human dendritic cell subsets. *PLoS One*. 2016; 11(2): e0148838.
36. Maldonado S., Fitzgerald-Bocarsly P. Antifungal activity of plasmacytoid dendritic cells and the impact of chronic HIV infection. *Front. Immunol*. 2017; 8:1705.
37. Marakalala M. J., Ndlovu H. Signaling C-type lectin receptors in antimycobacterial immunity. *PLoS Pathogens*. 2017; 13(6): Article e1006333: 1-8.
38. Matoba N. N-glycosylation of cholera toxin B subunit: serendipity for novel plant-made vaccines? *Front. Plant Sci*. 2015; 6: 1132.
39. Monteiro J. T., Lepenies B. Myeloid C-type lectin receptors in viral recognition and antiviral immunity. *Viruses*. 2017; 9(3): pii: E59.
40. Niezold T., Storcksdieck Genannt Bonsmann M., Maaske A., Temchura V., Heinecke V. et al. DNA vaccines encoding DEC205-targeted antigens: immunity or tolerance? *Immunology*. 2015; 145(4): 519-33.
41. Patin E. C., Orr S. J., Schaible U. E. Macrophage inducible C-type lectin as a multifunctional player in immunity. *Front. Immunol*. 2017; 8:861.
42. Rodríguez E., Carasi P., Frigerio S., da Costa V., van Vliet S., Noya V. et al. *Fasciola hepatica* Immune regulates CD<sub>11c</sub><sup>+</sup> cells by interacting with the macrophage Gal/GalNAc lectin. *Front. Immunol*. 2017; 8: 264.
43. Rout N. Enhanced Th<sub>1</sub>/Th<sub>17</sub> Functions of CD<sub>161</sub><sup>+</sup> CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T cells in mucosal tissues of rhesus macaques. *PLoS One*. 2016; 11(6): e0157407.
44. Ruane D., Do Y., Brane L., Garg A., Bozzacco L., Kraus T. et al. A dendritic cell targeted vaccine induces long-term HIV-specific immunity within the gastrointestinal tract. *Mucosal Immunol*. 2015; 9(5): 1340-52.
45. Rutkowski E., Leibelt S., Born C., Friede M. E., Bauer S., Weil S. et al. Clr-a: a novel immune-related C-type lectin-like molecule exclusively expressed by mouse gut epithelium. *J. Immunol*. 2017; 198(2): 916-26.
46. Schick J., Etschel P., Bailo R., Ott L., Bhatt A., Lepenies B. et al. Toll-like receptor 2 and mincle cooperatively sense corynebacterial cell wall glycolipids. *Infect. Immun*. 2017; 85(7). pii: e00075-17.
47. Spiering R., Margry B., Keijzer C., Petzold C., Hoek A., Wagenaar-Hilbers J. et al. DEC<sub>205</sub><sup>+</sup> dendritic cell-targeted tolerogenic vaccination promotes immune tolerance in experimental autoimmune arthritis. *J. Immunol*. 2015; 194(10): 4804-13.
48. Stratmann T. Cholera toxin subunit B as adjuvant - an accelerator in protective immunity and a break in autoimmunity. *Vaccines (Basel)*. 2015; 3(3): 579-96.
49. Teng O., Chen S. T., Hsu T. L., Sia S. F., Cole S., Valkenburg S. A. et al. CLEC5A-mediated enhancement of the inflammatory response in myeloid cells contributes to influenza virus pathogenicity in vivo. *J. Virol*. 2016; 91(1). pii: e01813-16.
50. Vajjhala P. R., Ve T., Bentham A., Stacey K. J., Kobe B. The molecular mechanisms of signaling by cooperative assembly formation in innate immunity pathways. *Mol. Immunol*. 2017; 86: 23-37.
51. Vasou A., Sultanoglu N., Goodbourn S., Randall R. E., Kostrikis L. G. Targeting pattern recognition receptors (PRR) for vaccine adjuvantation: from synthetic PRR agonists to the potential of defective interfering particles of viruses. *Viruses*. 2017; 9(7): pii: E186.
52. Yamamoto K., Furuya K., Yamada K., Takahashi F., Hamajima C., Tanaka S. Enhancement of natural killer activity and IFN-gamma production in an IL-12-dependent manner by a *Brassica rapa* L. *BioSci. Biotechnol. Biochem*. 2018; 82(4): 654-68.
53. Yin W., Gorvel L., Zurawski S., Li D., Ni L., Duluc D. et al. Functional specialty of CD<sub>40</sub> and dendritic cell surface lectins for exogenous antigen presentation to CD<sub>8</sub><sup>(+)</sup> and CD<sub>4</sub><sup>(+)</sup> T Cells. *EBioMedicine* 2016; 5: 46-58.
54. Zawrotniak M., Bochenska O., Karkowska-Kuleta J., Seweryn-Ozog K., Aoki W., Ueda M. et al. Aspartic proteases and major cell wall components in *Candida albicans* trigger the release of neutrophil extracellular traps. *Front. Cell Infect. Microbiol*. 2017; 7: 414.
55. Zhang Q., Yoo D. PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Vet. Microbiol*. 2015; 177(3-4): 229-41.
56. Zhao X.Q., Zhu L.L., Chang Q., Jiang C., You Y., Luo T. et al. C-type lectin receptor dectin-3 mediates trehalose 6,6'-dimycolate (TDM)-induced Mincle expression through CARD9/Bcl10/MALT1-dependent nuclear factor (NF)-κB activation. *J. Biol. Chem*. 2014; 289(43): 30052-62.

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.127-005.4+616.12-008.331.1]-078.33

Хараева З.Ф., Хоконова Т.М., Камбачокова З.А., Барокова Е.Б., Накова Л.В.

## СЫВОРОТОЧНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИЕЙ

ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М.Бербекова» Министерства образования и науки РФ, Нальчик

*Исследованы показатели цитокинов (уровни провоспалительного цитокина – интерлейкина-1 $\beta$ , противовоспалительного цитокина - интерлейкин-10, лиганда CD40 (CD40L)) у пациентов с артериальной гипертензией 2 и 3 степени и ишемической болезнью сердца. Показатели провоспалительного цитокина - интерлейкина-1 $\beta$  и противовоспалительного цитокина - интерлейкина-10 были достоверно повышены у пациентов с артериальной гипертензией и ИБС по сравнению с данными значениями у здоровых лиц. Повышенные показатели интерлейкина-1 $\beta$  и CD40L у пациентов с артериальной гипертензией и ИБС по сравнению с данными значениями у здоровых лиц свидетельствуют о воспалительном процессе в эндотелии. Повышение показателя ИЛ-10 может свидетельствовать о наличии хронического вялотекущего системного воспалительного процесса, в котором, вероятно, принимает активное участие сосудистый эндотелий. Длительно сохраняющиеся высокие показатели ИЛ-1 $\beta$  приводят к повышенной активности клеток видового иммунитета, продукты метаболизма которых, вовлечены в активацию надпочечников. Таким образом, нарушение цитокинового профиля может рассматриваться в качестве дополнительного лабораторного показателя атеросклеротического поражения сосудов.*

**Ключевые слова:** интерлейкин-1 $\beta$ ; интерлейкин-10; CD40L; артериальная гипертензия; ишемическая болезнь сердца.

**Для цитирования:** Хараева З.Ф., Хоконова Т.М., Камбачокова З.А., Барокова Е.Б., Накова Л.В. Сывороточные значения цитокинов у пациентов с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 626-629. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-626-629>

*Kharaeva Z.F., Khokonova T.M., Kambachokova Z.A., Barokova E.B., Nakova L.V.*

### SERUM VALUES OF CYTOKINES IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE AND ARTERIAL HYPERTENSION

FSBEI HE "Kh.M. Berbekov Kabardino-Balkarian State University", The Ministry of Education and Science of Russia, Nalchik

*The studied levels of cytokines (levels of Pro-inflammatory cytokine – interleukin-1 $\beta$ , anti-inflammatory cytokine - interleukin-10, CD40 ligand (CD40L)) in patients with arterial hypertension and ischemic heart disease. Indicators of Pro-inflammatory cytokine - interleukin-1 $\beta$  and anti-inflammatory cytokine - interleukin-10 were significantly increased in patients with arterial hypertension and ischemic heart disease compared with values in healthy individuals. Elevated interleukin-1 $\beta$  and CD40L in patients with arterial hypertension and ischemic heart disease compared with values in healthy individuals indicate inflammatory process in the endothelium. An increase in the IL-10 may indicate the presence of chronic systemic inflammation, in which vascular endothelium is likely to take an active part. Long-term high IL-1 $\beta$  rates lead to increased activity of cells of species immunity, whose metabolic products are involved in the activation of the adrenal glands. Thus, the cytokine profile disorder can be considered as an additional laboratory indicator of atherosclerotic vascular damage.*

**Key words:** arterial hypertension; ischemic heart disease; interleukin-1 $\beta$ ; interleukin-10; CD40L.

**For citation:** *Kharaeva Z. F., Khokonova T. M., Cambazola Z. A., Barakova E. B., L. V. Nakova Serum values of cytokines in patients with ischemic heart disease and arterial hypertension. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (10): 626-629 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-626-629>*

**For correspondence:** *Khokonova T.M., Ph.D. (Medicine), assistant of Microbiology, Virology and immunology Department (course of pharmacology); e-mail: tomek83@mail.ru*

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

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

Received 13.06.2018  
Accepted 01.10.2018

Исследование воспалительных процессов в стенке сосудов подвергло сомнению, доминировавшее в XX веке представление о том, что атеросклероз обусловлен исключительно нарушением метаболизма отдельных фракций холестерина. Впоследствии прогрессирование заболеваний сердечно-сосудистой системы, в особенно-

сти их осложненных форм (нестабильная стенокардия, инфаркт миокарда (ИМ)), стали объяснять не только влиянием на эндотелий липопротеинов низкой плотности, но и развитием в пораженной области сосудистой стенки воспаления, причем не всегда связанного с инфекционным возбудителем [1-4, 6, 8, 9, 13-16]

На сегодняшний день доказан факт наличия тесных взаимосвязей между хроническим воспалением и основными механизмами развития и прогрессирования сердечной недостаточности (СН), в том числе процесса-ми ремоделирования постишемизированного миокарда

**Для корреспонденции:** *Хоконова Тамара Муратовна, канд. мед. наук, ассистент каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии (курс фармакологии); e-mail: tomek83@mail.ru*

(его перегрузка объемом и/или давлением), формированием кардиосклероза [6-9, 13-17]. Вместе с тем, не до конца изучены вопросы о роли про/противовоспалительных цитокинов в формировании и прогрессировании АГ, морфо-функциональных изменений в миокарде при ИБС [6, 7, 13-16]. Вполне вероятно, что различные воспалительные процессы могут вовлекаться в механизмы формирования ишемической и гипертензивной СН [6, 7, 10-12, 16]. Именно поэтому весьма актуально исследование сыровоточных показателей воспаления у пациентов с патологией сердечно-сосудистой системы, в особенности – с АГ и ИБС.

Настоящая работа посвящена исследованию влияния АГ и ИБС на состояние стенки артерий, а также на цитокиновый профиль исследуемого контингента больных.

Цель исследования – исследование уровней цитокинов (уровней провоспалительного цитокина – интерлейкина-1 $\beta$ , противовоспалительного цитокина – интерлейкин-10, лиганда CD40 (CD40L)) у пациентов с артериальной гипертензией 2 и 3 степени и ишемической болезнью сердца.

**Материал и методы.** Обследованы пациенты, проходившие лечение в кардиологическом отделении Городской клинической больницы №1 города Нальчика, а также амбулаторные больные, наблюдавшиеся в ГБУЗ “Городская поликлиника №2” города Нальчика. Обследовано 78 пациентов (35 мужчин и 43 женщины, средний возраст 58 $\pm$ 7 лет, разделенных на 3 группы. Первую группу составили 26 пациентов с АГ 2 и 3 степени (12 мужчин и 14 женщин, средний возраст 57 $\pm$ 8). Вторую группу составили 27 больных с ИБС (12 мужчин и 15 женщин, средний возраст 57 $\pm$ 10). Третью группу составил 25 пациенты с ИБС и постинфарктным кардиосклерозом (ПИК) (11 мужчин и 14 женщин, средний возраст 56 $\pm$ 9). Контрольную группу составили 20 соматически здоровых лиц (10 мужчин, 10 женщин, средний возраст 55 $\pm$ 10 лет). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. В обследование не были включены пациенты с уровнем гликозилированного гемоглобина более 10 %, анемией, почечной недостаточностью, недавними (до 10 суток) эпизодами острой СН, острым коронарным синдромом в течение предшествующих 3 месяцев, воспалительными заболеваниями в стадии обострения, пароксизмальными тахикардиями, окклюзирующими заболеваниями сосудов нижних конечностей. В комплекс инструментальных методов входили: рентгенография органов грудной клетки с верификацией признаков венозного застоя в легких, эхокардиография, тест 6-минутной ходьбы, электрокардиография, суточное мониторирование АД [5], центральной гемодинамики с оценкой параметров сосудистой ригидности [4].

Интерлейкин-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ), интерлейкин-10 (ИЛ-10) («Вектор-Бест» (Россия) и CD40L (Bender System, USA) определяли в сыровотке крови твердофазным иммуноферментным методом.

Измерение параметров центрального давления в аорте (ЦДА) и жесткости сосудистой стенки проводилось с помощью суточного монитора АД «BPLab» с расширенной версией программного обеспечения «BPLab Vasotens»–фирмы «Петр Телегин» (Россия). Фиксировались следующие показатели: САДао (систолическое аортальное

артериальное давление); ДАДао (диастолическое аортальное артериальное давление); СрАДао (среднее аортальное артериальное давление); ПАДао (центральное пульсовое артериальное давление); АIхао (индекс аугментации в аорте); РТТ (время распространения пульсовой волны); ASI (индекс ригидности); SSY (систолический индекс площади); PWV (скорость распространения пульсовой волны) [1, 3-5].

Статистическую обработку проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 10,0. Рассчитывали средние арифметические и среднеквадратичные отклонения исследуемых величин и ошибки репрезентативности. Нормальное распределение полученных данных представлялось в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – средняя арифметическая исследуемых величин,  $m$  – ошибка репрезентативности. Разницу показателей в группах оценивали по t-критерию Стьюдента. Критическим считался уровень значимости различия  $p=0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** При исследовании цитокинов у больных в группах было выявлено, что у пациентов всех трех групп отмечалось выраженное статистически значимое повышение уровня ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-10 и CD40L в сравнении с показателями контрольной группы ( $p<0,001$ ) (табл. 1).

При оценке значений ИЛ-1 $\beta$  в группах было выявлено, что у больных с ИБС и ИБС с ПИК (2-я и 3-я группы соответственно) отмечались более низкие показатели ИЛ-1 $\beta$  (72,6 $\pm$ 3,6 пг/мл - во 2-й группе и 72,2 $\pm$ 2,7 пг/мл - в 3-й группе), по сравнению с пациентами с АГ из 1-й группы (79,9 $\pm$ 2,2 пг/мл) ( $p < 0,05$ ).

При оценке значений ИЛ-10 в группах было выявлено, что у больных с АГ 2 и 3 степени и ИБС (1-я и 2-я группы соответственно) отмечались более высокие показатели ИЛ-10 (49,2 $\pm$ 3,2 пг/мл - в 1-й группе и 53,6 $\pm$ 3,2 пг/мл - во 2-й группе), по сравнению с пациентами с ИБС с ПИК из 3-й группы (42,1 $\pm$ 2,6 пг/мл) ( $p < 0,05$ ).

Предполагается, что CD40L является потенциальным индикатором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Его уровень повышен при ИМ, сердечной недостаточности, инсульте [11]. При оценке значений CD40L в группах было выявлено, что у больных с ИБС и ИБС с ПИК (2-я и 3-я группы соответственно) отмечались более высокие показатели CD40L (142 $\pm$ 16 пг/мл - во 2-й группе и 278 $\pm$ 29 пг/мл - в 3-й группе), по сравнению с пациентами с АГ из 1-й группы (70 $\pm$ 19 пг/мл) ( $p < 0,05$ ) (см. табл. 1).

Результаты суточного мониторирования ЦДА в группах представлены в табл. 2.

Исходя из полученных данных видно, что наибольшие изменения параметров ЦДА (САДао, СрАДао, ПАДао,

Таблица 1

Показатели уровней интерлейкина-1 $\beta$ , интерлейкина-10 и CD40L у пациентов с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца

Показатель	1-я группа АГ (n=26)	2-я группа ИБС (n=27)	3-я группа ИБС+ПИК (n=25)	4-я группа (здоровые) (n=20)
Интерлейкин 1 $\beta$ (пг/мл)	79,9 $\pm$ 2,2*	72,6 $\pm$ 3,6*#	72,2 $\pm$ 2,7*#	15,0 $\pm$ 3,0
Интерлейкин 10 (пг/мл)	49,2 $\pm$ 3,2* <sup>1</sup>	53,6 $\pm$ 3,2* <sup>1</sup>	42,1 $\pm$ 2,6*	10,0 $\pm$ 3,0
CD40L (пг/мл)	70 $\pm$ 19*	142 $\pm$ 16*#	278 $\pm$ 29*#	32 $\pm$ 12

Примечание: \* - различия достоверны по отношению к показателям 4-й группы сравнения- здоровых ( $p<0,001$ ); # - различия достоверны по отношению к показателям 1-й группы – пациентов с АГ ( $p<0,05$ ); <sup>1</sup> - различия достоверны по отношению к показателям 3-й группы – пациентов с ИБС и ПИК ( $p<0,05$ ).

Таблица 2

Динамика показателей центрального давления в аорте у пациентов с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца

Показатели ЦДА	1-я группа АГ (n=26)	2-я группа ИБС (n=27)	3-я группа ИБС+ПИК (n=25)	4-я группа (здоровые) (n=20)
САДао, мм рт.ст.	125,7±2,37**	135,9±2,38**	141,5±5,41***	110,4±2,37
ДАДао, мм рт.ст.	77,5±1,88	79,8±1,77*	82,8±3,91*	73,2±0,81
СрАДао, мм рт.ст.	88,7±2,32	100,1±3,93*	107,2±5,69**	83,3±1,11
ПАДао, мм рт.ст.	47,2±1,89*	62,7±3,84***	68,5±4,21***	37,7±1,36
Индекс аугментации в аорте (АІхао), %	25,3±2,26*	28,2±3,45**	37,1±4,39***	16,1±1,22
Индекс аугментации в аорте (АІхао), %, приведенное к ЧСС=75 уд./мин.	24,6±2,09*	28,1±3,32**	33,6±4,51**	17,6±1,86

Примечание: \* - различия достоверны по отношению к показателям группы сравнения – здоровых ( $p < 0,05$ ), \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ .

Таблица 3

Динамика показателей ригидности артерий у пациентов с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца

Параметры ригидности артерий	1-я группа АГ (n=26)	2-я группа ИБС (n=27)	3-я группа ИБС+ПИК (n=25)	4-я группа (здоровые) (n=20)
РТТ, сек - до лечения	130,2±3,4**	144,5±4,4***	155,1±5,8***	115,2±2,3
ASI, мм рт.ст.	148,5±5,6*	177,2±4,5***	190,3±8,1***	132,1±4,1
SSY, мм рт.ст.	8,4±1,6*	17,3±1,5**	22,4±2,3***	3,9±1,7
PWV (СРПВ), м/с	10,5±1,3*	15,3±1,4**	17,3±1,7**	6,7±1,2

Примечание. РТТ – время распространения пульсовой волны, ASI – индекс ригидности, SSY – систолический индекс площади, PWV (СРПВ) – скорость распространения пульсовой волны; \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  – различия достоверны по отношению к показателям группы сравнения.

АІхао) отмечены в 3-й группе больных с ИБС+ПИК.

Динамика показателей ригидности артерий в группах представлена в табл. 3.

Из полученных данных видно, что наибольшие изменения параметров артериальной жесткости отмечены в 3-й группе больных с ИБС+ПИК (см. табл. 2, 3).

**Выводы.** 1. Показатели провоспалительного цитокина - интерлейкина-1 $\beta$  и противовоспалительного цитокина - интерлейкина-10 были достоверно повышены у пациентов с артериальной гипертензией и ИБС по сравнению с данными значениями у здоровых лиц.

2. Показатель провоспалительного цитокина интерлейкина-1 $\beta$  был выше у больных с артериальной гипертензией и достоверно снижался у пациентов с ишемическими и кардиосклеротическими изменениями в миокарде. Уровень противовоспалительного цитокина интерлейкина-10 был достоверно выше у пациентов с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца, не сопровождающейся кардиосклеротическим поражением миокарда (то есть без ПИК). Наиболее высокие значения CD40L наблюдались у пациентов с ИБС и ИБС + ПИК (2-я и 3-я группы соответственно).

3. Наиболее выраженное повышение значений ЦДА, сосудистой жесткости, а также снижение эластичности артериального русла были отмечены у пациентов с ИБС и рубцовыми изменениями в миокарде.

**Заключение.** Таким образом, повышенные концентрации ИЛ-1 $\beta$  и CD40L свидетельствуют о наличии выраженной воспалительной реакции в организме пациентов обследуемого контингента. В то же время, повышение показателя ИЛ-10 может свидетельствовать о наличии хронического вялопротекающего системного воспалительного процесса, в котором, вероятно, принимает активное участие сосудистый эндотелий. В свою очередь,

воспалительный характер поражения эндотелия может быть вовлечен в атеросклеротическое поражение сосудов. В тоже время, длительно сохраняющиеся высокие показатели ИЛ-1 $\beta$  приводят к повышенной активности клеток видового иммунитета, продукты метаболизма которых, вовлечены в активацию надпочечников. Таким образом, создается патофизиологическая цепь неблагоприятного течения АГ, которую необходимо учитывать в комплексной терапии, а показатели цитокинов использовать в качестве диагностических и прогностических маркеров.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 7–17 см. REFERENCES)

1. Кац Я.А., Пархонюк Е.В., Акимова Н.С. Жесткость сосудистой стенки с позиции повреждения соединительной ткани при сердечно-сосудистых заболеваниях. *Фундаментальные исследования*. 2013; 5(1): 189-95.
2. Кобалава Ж.Д., Котовская Ю.В. Артериальная гипертензия в XXI веке: достижения, проблемы, перспективы. М.: Бионика Медиа; 2015.
3. Недогода С.В., Чаляби Т.А. Сосудистая жесткость и скорость распространения пульсовой волны: новые факторы риска сердечно-сосудистых осложнений и мишени для фармакотерапии. *Consilium Medicum: Болезни сердца и сосудов*. 2006; 4: 25-9.
4. Полупанов А.Г., Мамасаидов Ж.А., Гелесханова Ю.Н., Алимбекова Д.Б. Центральное аортальное давление и сосудистая жесткость: влияние антигипертензивной терапии. *Вестник Кыргызско-Российского славянского университета*. 2015; 15(11): 134-7.
5. Пшеницин А. И., Мазур Н.А. Суточное мониторирование артериального давления. М.: Медпрактика; 2007.

6. Турмова Е.П., Маркелова Е.В., Силаев А.А., Лукьянов П.А., Чикаловцев И.В. Особенности цитокинового статуса у больных с атеросклерозом. *Медицинская иммунология*. 2014; 16(4): 323-32.

## REFERENCES

1. Katz Ya. A., Parkhonyuk E. V., Akimova N. S. Stiffness of the vascular wall from the position of connective tissue damage in cardiovascular diseases. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013; 5(1): 189-95. (in Russian)
2. Kobalava Zh. D., Kotovskaya Yu. V. Arterial hypertension in XXI century: achievements, problems, prospects. Moscow: «Bionika Media»; 2015. (in Russian)
3. Nedogoda S. V., Chalabi T. A. Vascular stiffness and pulse wave velocity: new risk factors for cardiovascular complications and targets for pharmacotherapy. *Consilium Medicum: Bolezni serdtsa i sosudov*. 2006; 4: 25-9. (in Russian)
4. Polupanov A. G., Mamasaidov J. A., Geliskhanov Yu. N., Alimbekova D. B. Central aortic pressure and vascular stiffness: influence of antihypertensive therapy. *Vestnik Kyrgyzsko-Rossiyskogo slavyanskogo universiteta*. 2015; 15 (11): 134-7. (in Russian)
5. Pshenitsin A. I., Mazur N. Ah. Daily monitoring of blood pressure. Moscow: Medpraktika. 2007. (in Russian)
6. Turova E. P., Markelova E. V., Silaev A. A., Lukyanov P. A., Chikalovets I. V. Peculiarities of cytokine status in patients with atherosclerosis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2014; 16 (4): 323-32. (in Russian)
7. Amir O., Rogowski O., David M. Lahat N, Wolff R, Lewis B.S. Circulating interleukin-10: association with higher mortality in systolic heart failure patients with elevated tumor necrosis factor-alpha. *Isr. Med. Assoc. J*. 2010; 12(3): 158—62.
8. Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). 2013; 31(7): 1105–87.
9. Kalogeropoulos A.P., Georgiopoulou V.V., Butler J. From risk factors to structural heart disease: the role of inflammation. *Heart. Fail. Clin*. 2012; 8(1): 113-23.
10. Kaur K., Dhingra S., Slezak J., Sharma A.K., Bajaj A., Singal P.K. Biology of TNFalpha and IL-10, and their imbalance in heart failure. *Heart Fail. Rev*. 2009; 14(2): 113-23.
11. Kooten C., Banchereau J. CD40-CD40ligand. *J. Leukocyte Biology*. 2000; 2—13.
12. Lindberg E., Magnusson Y., Karason K., Andersson B. Lower levels of the host protective IL-10 in DCM—a feature of autoimmune pathogenesis? *Autoimmunity*. 2008; 41(6): 478—83.
13. Matsunaga Y., Vardavas C.I., Plada M., Wärnberg J. The relationship between cotinine concentrations and inflammatory markers among highly secondhand smoke exposed non-smoking adolescents. *Cytokine*. 2014; 66(1): 17–22.
14. Myriantsefs P.M., Lazaris N., Venetsanou K., Smigadis N., Karabatsos E., Anastasiou-Nana M.I. et al. Immune status evaluation of patients with chronic heart failure. *Cytokine*. 2007; 37(2): 150-4.
15. Oikonomou E., Tousoulis D., Siasos G., Zaromitidou M., Papavassiliou A.G., Stefanadis C. The role of inflammation in heart failure: new therapeutic approaches. *Hellenic J. Cardiol*. 2011; 52(1): 30-40.
16. Pasqui A.L., Di Renzo M., Maffei S., Pastorelli M., Pompella G., Auteri A. et al. Pro/Anti-inflammatory cytokine imbalance in postischemic left ventricular remodeling. *Mediators Inflamm*. 2010. Article ID 974694. 8 pages. doi:10.1155/2010/974694.
17. World Health Organization. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013–2020. [Electronic resource]. – URL: [http://www.who.int/nmh/events/ncd\\_action\\_plan/en/](http://www.who.int/nmh/events/ncd_action_plan/en/) (date accessed: 19.04.2017).

Поступила 13.06.18

Принята к печати 01.10.18

## МИКРОБИОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:579.841.95]-078

Горбатов А.А.<sup>1</sup>, Соловьёв П.В.<sup>1</sup>, Баранова Е.В.<sup>1</sup>, Титарёва Г.М.<sup>1</sup>, Куликалова Е.С.<sup>2</sup>, Бикетов С.Ф.<sup>1</sup>, Мазепа А.В.<sup>2</sup>

### СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И КОММЕРЧЕСКИХ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТИВОТУЛЯРЕМИЙНЫХ АНТИТЕЛ У ЛЮДЕЙ

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, пос. Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока 664047, Иркутск, Российская Федерация

Разработаны экспериментальные серологические тесты для определения противотуляремийных антител у людей в форматах иммунохроматографии (ИХ-тест ЛПС Ft15) и иммуноферментного анализа (ИФА ЛПС Ft15) с использованием в качестве антигена высокоочищенного ЛПС *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Проведён анализ чувствительности и специфичности разработанных тестов и коммерческого туляремийного антигена РНГА-Тул-Аг-СтавНИИПЧИ (производства Ставропольского научно-исследовательского противочумного института) в сравнении с коммерческим референс-антигеном, зарегистрированным в РФ для количественного определения туляремийных IgG человека – ELISA classic *Francisella tularensis* IgG SERION, Германия (ELISA IgG SERION). Исследование проб сывороток крови людей, вакцинированных против туляремии, показало, что чувствительность и специфичность детекции противотуляремийных антител с помощью ИФА ЛПС Ft15 при сравнении с ELISA IgG SERION составили 97,7 и 100%. При определении противотуляремийных антител антигеном ИХ-тест ЛПС Ft15 данные параметры составили по сравнению с ELISA IgG SERION 94,3 и 100%. Чувствительность и специфичность РНГА-Тул-Аг-СтавНИИПЧИ составили по сравнению с ELISA IgG, SERION 59,1 и 80%.

Ключевые слова: туляремия; *Francisella tularensis*; серодиагностика; ЛПС; ИФА; иммунохроматография.

**Для цитирования:** Горбатов А. А., Соловьёв П. В., Баранова Е. В., Титарёва Г. М., Куликалова Е. С., Бикетов С. Ф., Мазепа А. В. Сравнительное исследование экспериментальных и коммерческих серологических тестов для определения противотуляремийных антител у людей. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 630-635. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-630-635>

Gorbatov A.A.<sup>1</sup>, Soloviev P.V.<sup>1</sup>, Baranova E.V.<sup>1</sup>, Titareva G.M.<sup>1</sup>, Kulikalova E.S.<sup>2</sup>, Biketov S.F.<sup>1</sup>, Mazepa A.V.<sup>2</sup>

A COMPARATIVE STUDY OF EXPERIMENTAL AND COMMERCIAL SEROLOGICAL TESTS FOR DETECTION OF ANTIBODIES IN HUMANS WITH TULAREMIA

<sup>1</sup>142279, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation; <sup>2</sup>Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, 664047, Irkutsk, Russian Federation

Experimental serological tests were developed to determine anti-tularensis antibodies in humans in immunochromatography formats (LF-test LPS Ft15) and enzyme immunoassay (ELISA LPS Ft15) using as an antigen highly purified LPS *F. tularensis* 15 NIEG. Analysis was conducted of the sensitivity and specificity of the developed tests and commercial tularemia antigen «RNGA-Tul-AG» (production Stavropol research anti-plague Institute) in comparison with the commercial reference antigen, registered in the Russian Federation for the quantitative determination of human IgG tularemia – «ELISA classic *Francisella tularensis* IgG» SERION, Germany (IgG SERION ELISA). A study of human blood serum vaccinated against tularemia showed that the sensitivity and specificity of detection of anti-tularensis antibodies by «ELISA LPS Ft15» were 97.7 and 100%, compared with «ELISA IgG series». When determining anti-tularensis antibodies with the diagnosis «LF-test LPS Ft15», these parameters were compared to «ELISA IgG series» 94.3 and 100%. The sensitivity and specificity of «RNGA-Tul-AG» made compared to the «IgG ELISA, SERION» of 59.1% and 80%.

Key words: tularemia; *Francisella tularensis*; serodiagnosis; LPS; ELISA; immunochromatography.

**For citation:** Gorbatov A. A., Soloviev P. V., Baranova E. V., Titareva G. M., Kulikalova E. S., Biketov S. F., Mazepa A. V. A comparative study of experimental and commercial serological tests for detection of antibodies in humans with tularemia. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (10): 630-635 (in Russ.) .DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-630-635>

**For correspondence:** Gorbatov A.A., Junior researcher of the department of immunobiochemistry of pathogen microorganisms; e-mail: [gorbatov1986@mail.ru](mailto:gorbatov1986@mail.ru)

#### Information about authors:

Gorbatov A.A., <http://orcid.org/0000-0002-0799-893X>  
Baranova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-6455-5756>

Soloviev P.V., <http://orcid.org/0000-0001-7355-8396>  
Titareva G.M., <https://orcid.org/0000-0001-9478-5563>

Для корреспонденции: Горбатов Алексей Александрович, мл. науч. сотр. отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов; e-mail: [gorbatov1986@mail.ru](mailto:gorbatov1986@mail.ru)

Kulikova E.S., <https://orcid.org/0000-0001-7034-5125>  
Mazepa A.V., <https://orcid.org/0000-0002-0843-4757>

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

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

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

Received 17.07.2018  
Accepted 10.10.2018

**Введение.** Туляремия – зоонозная природно-очаговая инфекция, вызываемая грамотрицательной коккобациллой *Francisella tularensis*. Высокая восприимчивость для человека и значительная летальность (26,8%) [1] при отсутствии мер противодействия являются причиной отнесения туляремии к особо опасным инфекциям и потенциальным рецептурам для биологического оружия [2–4]. Распространённость переносчиков (мышей) в лесных и лесостепных ландшафтах, доминирующих на территории РФ, обусловила существование ряда природных очагов туляремии, в которых, несмотря на вакцинопрофилактику, ежегодно отмечаются спорадические и эпидемические случаи заболевания среди населения (МУ 3.1.2007-05 Эпидемиологический надзор за туляремией). В последней крупной вспышке в Ханты-Мансийском автономном округе зарегистрировано более 1000 случаев заболеваний человека преимущественно в язвенно-некротической форме [5, 6]. При расследовании вспышки использованы такие методы лабораторной диагностики туляремии, как аллергические пробы с тулярином и серологические тесты в формате РНГА [7], что указывает на недостаточную обеспеченность практического здравоохранения средствами диагностики туляремии. Подтверждение диагноза туляремии может быть получено путём выделения чистой культуры из клинических образцов, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), при помощи серологических реакций, показывающих наличие специфических антител к возбудителю туляремии в сыворотках пациентов [8, 9]. Выделение чистой культуры из крови пациентов с бактериемией даёт положительный результат не более чем у 10% пациентов [10]. Зачастую это связано с тем, что клинические образцы получают уже после проведения антибактериальной терапии. Результаты ПЦР-анализа могут быть использованы для подтверждения диагноза туляремии в случае обнаружения ДНК возбудителя в отделяемом кожных язв и в конъюнктивальных или глоточных экссудатах [8, 9]. Отсутствие специализированных ПЦР-лабораторий, имеющих разрешение на проведение работ с бактериальными агентами I–II групп биологической опасности, к которым относится данный возбудитель [11], сложность выделения чистой культуры туляремийного микроба, приводит к тому, что постановка диагноза туляремии чаще всего основывается на результатах серологических анализов. Всё это делает актуальным для диагностики туляремии совершенствование методов выявления антитуляремийных антител в крови у людей и животных, применимых как для постановки предварительного диагноза, так и для оценки напряжённости поствакцинального иммунитета и проведения эпидемиологического мониторинга в эндемичных районах. В действующих МУ «Эпидемиологический надзор за туляремией» 2011 г. предписывается использовать целый ряд серологических тестов на антитуляремийные антитела: реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), реакцию агглютинации (РА), метод флуоресцирующих антител (МФА), иммуноферментный анализ

(ИФА), реакцию нейтрализации антител (РНAt) (МУ 3.1.2007-05 Эпидемиологический надзор за туляремией) [12], однако в РФ для определения антитуляремийных антител доступен только один зарегистрированный коммерческий туляремийный диагностикум – РНГА-Тул-Аг-СтавНИИПЧИ (производства Ставропольского научно-исследовательского противочумного института). РНГА является простой в применении и подходит для исследования клинических образцов, полученных от человека и животных, для постановки данной реакции требуется от 6 до 24 ч; по некоторым данным литературы она недостаточно чувствительна [13, 14]. РНГА недостаточно специфична и может давать ложноположительные результаты при исследовании сывороток переболевших или больных некоторыми другими инфекциями, в частности бруцеллёзом [15, 16].

Наиболее распространёнными форматами серологических тестов в мире являются иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХ). Проведение ИФА требует оборудования, квалифицированного персонала и занимает не менее 3–6 ч, но даёт возможность количественной оценки и обеспечивает высокую аналитическую чувствительность. ИХ подходит для быстрой оценки наличия иммунитета (положительная реакция при титре сыворотки от 1:400) и может применяться в условиях плохо оснащённой лаборатории, фельдшерского пункта, у постели больного, в полевых условиях при работе в природных очагах туляремии. Результаты работ указывают на эффективность применения ИФА и ИХ для детекции специфических антитуляремийных антител в сыворотках крови человека [13, 17–20]. В большинстве из указанных работ для детекции антител использованы экспериментальные серии тестов и лишь в двух – коммерческие тесты: ИФА тест-система – ELISA classic *Francisella tularensis* IgG (SERION, Германия) и ИХ тест-система – VIRapids (Santa Fé, Испания) [17, 18]. В РФ к началу 2018 г. коммерческие туляремийные серологические диагностикумы в форматах ИФА или ИХ не производятся, что делает весьма актуальными задачи по их разработке.

Поскольку при туляремии антительный иммунный ответ в основном направлен на иммунодоминантные эпитопы липополисахарида *F. tularensis* (ЛПС) [21, 22], использование стандартного очищенного туляремийного ЛПС в ИФА-диагностикумах и ИХ-тестах позволило достичь высоких показателей их чувствительности, специфичности, воспроизводимости [13, 23].

Цель исследования – разработка отечественных туляремийных серологических диагностикумов в форматах ИХ (ИХ-тест ЛПС Ft15) и ИФА (ИФА ЛПС Ft15) с использованием в качестве антигена высокоочищенного ЛПС *F. tularensis* 15 НИИЭГ (ЛПС Ft15). В качестве референс-диагностикума использован зарегистрированный в РФ коммерческий ИФА-диагностикум для количественного определения туляремийных IgG человека – ELISA classic *Francisella tularensis* IgG (SERION, Германия).

**Материал и методы. Образцы сывороток.** Условно положительные сыворотки (от людей, вакцинированных против туляремии) в количестве 94 образцов ( $n = 94$ ) предоставлены сотрудниками противочумной станции (ПЧС) г. Горно-Алтайск (Республика Алтай). Данные сыворотки получены от людей, год назад вакцинированных живой туляремийной вакциной. В качестве отрицательных контролей использовали сыворотки от здоровых людей в количестве 15 образцов ( $n = 15$ ).

**Получение препарата ЛПС.** Выделение ЛПС проводили методом экстракции по Westphal [1965] [24]. Для экстракции бактериальные клетки *F. tularensis* 15 НИИЭГ прогревали при температуре 68°C в 45% водном растворе фенола. После охлаждения смесь центрифугировали для разделения фаз. Водную фазу, содержащую ЛПС, осторожно отбирали и диализовали против дистиллированной воды в течение четырёх суток, контролируя процесс диализа путём определения изменения (уменьшения) значения оптической плотности раствора при длине волны 260 нм [25]. Очистку препаратов ЛПС от примесей нуклеиновых кислот проводили с использованием ферментов: ДНКазы и РНКазы. Инкубировали растворы ЛПС при температуре 37°C в течение 3–18 ч в присутствии трис-HCl до 10 мМоль (pH 7,2), сульфата магния до 10 мМоль, ДНКазы, РНКазы до 100 мкг/мл. Процесс гидролиза нуклеиновых кислот контролировали спектрометрически и по окрашиванию бромидом этидия электрофоретически разделённых образцов. Для очистки препаратов от белковых примесей использована протеиназа К (Sigma) в концентрации от 10 мкг/мл до 100 мкг/мл, инкубацию вели при температуре 65°C в течение 3–5 ч. После обработки ферментами проводили диализ препаратов против дистиллированной воды в течение дня со сменой воды каждые 2 ч. Для заключительной очистки ЛПС использовали ультрацентрифугирование при 100 тыс. g, которое проводили не менее четырёх раз, контролируя снижение содержания нуклеиновых кислот в супернатанте по уменьшению оптической плотности при 260 нм [26]. Очищенные препараты ЛПС лиофилизировали.

**Определение примесей в препаратах ЛПС.** Электрофоретический контроль препаратов ЛПС проводили по U. Laemmli [27] и O. Ostermanu [28] в 15% SDS-ПААГ. Для визуализации ЛПС гели окрашивали аммиачным раствором оксида серебра после окисления йодной кислотой в соответствии с рекомендациями C. Tsai и C. Frash [29]. Для визуализации белковых примесей использовали Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva). Концентрацию белков определяли по M. Bradford [30] и O. Lowry [31]. Содержание нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность при 260 нм [26], и дополнительно по окрашиванию препаратов бромидом этидия после электрофоретического разделения в 0,7% агарозном геле. Содержание белковых примесей в препаратах не превышало 3%, нуклеиновые кислоты отсутствовали.

**Иммуноферментный анализ с использованием экспериментального диагностикума (ИФА ЛПС Ft15).** Анализ проводили по стандартной методике [32]. В качестве антигена, сорбированного на планшет, использован полученный, как описано выше, ЛПС Ft15, который адсорбирован на иммунологические планшеты средней степени адсорбции (Nunc, Дания) в концентрации 1 мкг на лунку в карбонат-бикарбонатном буфере pH 9,6 при температуре 4°C в течение 18 ч. Свободные центры связывания блоки-

ровали 5% раствором сухого обезжиренного молока (Fluka, Швейцария) в течение 30 мин при 37°C. Сыворотки (в исходном разведении 1:200) исследовали параллельно в двух рядах с двукратным шагом титрования. Планшеты с сыворотками инкубировали при 37°C в течение 1 ч с последующей четырёхкратной отмывкой 0,05% фосфатно-солевым раствором с твин-20 (ФБР-Т). Для выявления связанных антител использовали антиглобулиновую сыворотку козы против IgG человека, конъюгированную с пероксидазой хрена (ИМТЕК, Россия), в рабочем разведении 1:10000. Планшеты с антиглобулиновой сывороткой инкубировали при 37°C в течение 30 мин с последующей четырёхкратной отмывкой ФБР-Т. Для визуализации реакции использовали субстрат для пероксидазы ТМВ (Pierce). Учёт результатов проводили на спектрофотометре «Униплан» («Пикон», Россия) при длине волны 450 нм.

При постановке ИФА на каждом планшете предусматривали следующие контроли: отрицательная сыворотка в исходном разведении 1:200, положительная сыворотка в исходном разведении 1:200, контроль конъюгата, контроль субстратной смеси. За титр сыворотки принимали разведение, оптическая плотность которого при 450 нм ( $OP_{450}$ ) превышала  $OP_{450}$  отрицательной сыворотки в том же разведении не менее чем в 2 раза. Положительными считались сыворотки с титром 1:400 и выше. Сыворотки с титром 1:200 интерпретировали как сомнительный результат.

**Иммуноферментный анализ с использованием коммерческого диагностикума (ELISA IgG, SERION).** Диагностикум «ELISA classic Francisella tularensis IgG» SERION, Германия; регистрационное удостоверение № ФСЗ 2012/12631 от 30.07.2012 (срок годности до 02. 2018) позволяет количественно определять человеческие IgG к туляремийному ЛПС. Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя –SERION, Германия.

**РНГА.** Для постановки РНГА использовали диагностикум РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ (серия 1-17, срок годности до 02. 2018) производства Ставропольского научно-исследовательского противочумного института (Россия), согласно инструкции производителя.

**Конструирование и изготовление экспериментальных образцов (ИХ-тест ЛПС Ft15).** При изготовлении ИХ-тестов основными технологическими этапами являются: получение/выбор материалов, золотоконьюгата, организация тестовой (содержащей антиген) и контрольной (содержащей рецептор к золотоконьюгату) зон. В тестовой зоне могут накапливаться специфические антитела против антигена (при их наличии в пробе) и золотоконьюгат, в контрольной (независимо от наличия антител в пробе) – золотоконьюгат, что и обеспечивает визуализацию результата. Выбор материалов проводили, учитывая следующие параметры: сорбционную ёмкость мембран, однородность формирующихся тестовых (Т) и контрольных (С) зон, равномерность продвижения фронта жидкости при анализе, уровень неспецифической сорбции золотоконьюгата на мембране. Для формирования тестовой зоны использован полученный как описано выше ЛПС Ft, для контрольной – кроличьи антитела IgG (ИМТЕК, Россия). Растворы ЛПС Ft и антител наносили диспенсером («IsoFlow», Imagine Technology, США) на нитроцеллюлозную мембрану 8 мкм в концентрации 0,5 мг/мл со скоростью нанесения 4 мм/с и объёмом 0,2 мкл/мм. В качестве стабилизирующих добавок использовали 10% глицерин, 1% БСА и

Таблица 1  
Результаты анализа сывороток крови вакцинированных против туляремии и здоровых людей на наличие антитюляремийных антител, полученные с помощью различных диагностикумов

Диагностикум	Количество исследованных сывороток, абс (%)			
	вакцинированных против туляремии (n = 94)		здоровых доноров (n = 15)	
	Положительная реакция	Отрицательная реакция	Положительная реакция	Отрицательная реакция
ИФА ЛПС Ft15	86 (91,5%)	8 (8,5%)	0 (0%)	15 (100%)
ИХ-тест ЛПС Ft15	83 (88,3%)	11 (11,7%)	0 (0%)	15 (100%)
РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ	52 (55,3%)	42 (44,7%)	3 (20,0%)	12 (80,0%)
ELISA IgG, SERION	88 (93,6%)	6 (6,4%)	0 (0%)	15 (100%)

0,01% азид натрия. Раствор золотокоњюгата, коњюгированного с белком G (Arista Biologicals, США) наносили на стекловолоконные фильтры со скоростью 8 мм/с в объёме 1,6 мкл/мм. Мембраны после формирования (Т) и (С) зон подклеивали к фильтру с золотокоњюгатом, сорбирующей и поглощающей подушечкам (MDI, Индия), сушили на воздухе при 25% влажности и при температуре 30°C. Мембраны нарезали с помощью нарезчика стрипов (Index Cutter, США) на полоски шириной 0,5 см. Полоски герметично упаковывали и хранили до использования при температуре 4°C.

При постановке ИХ сыворотку крови человека предварительно разводили в 10 раз в 0,1 мл ФБР, вносили в лунку 96-луночного планшета и помещали в неё ИХ-тест. Учёт результатов проводили через 30 мин и интерпретировали по следующим критериям:

- положительный результат (наличие видимых глазом окрашенных линий в зоне С и Т;
- отрицательный результат (наличие окрашенной линии только в зоне С);
- тест не работает (отсутствие линии в зоне С даже при наличии окрашенной линии в зоне Т или отсутствие окрашенной линии в зоне С и в зоне Т).

**Результаты и обсуждение.** Протестировано 109 сывороток крови людей (от вакцинированных против туляремии, n = 94, и от здоровых доноров, n = 15). Выявление антитюляремийных антител в сыворотках крови проводили с помощью экспериментальных серодиагностикумов ИХ-тест ЛПС Ft15 и ИФА ЛПС Ft15 и зарегистрированного в РФ отечественного туляремийного серодиагностикума РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ. В качестве референс-диагностикума использован зарегистрированный в РФ ИФА-диагностикум для количественного определения IgG человека к ЛПС *Francisella tularensis* производства SERION, Германия. По результатам полученных экспериментальных данных проведён

сравнительный анализ чувствительности и специфичности различных диагностикумов. Результаты сравнительных исследований представлены в табл. 1.

Представленные в табл.1 данные свидетельствуют о том, что ИФА ЛПС Ft15 и ИХ-тест ЛПС Ft15 лишь незначительно уступают референс-диагностикуму ELISA IgG, SERION по чувствительности (ИФА на 2,1%, ИХ-тест на 5,3%). Более низкая чувствительность ИХ-тестов, обусловлена, вероятно, тем, что для данных тестов предел определения соответствует титрам антитюляремийных антител в ИФА 1:400.

Полученные в 6,4% случаев отрицательные результаты в группе сывороток вакцинированных людей (см. табл. 1), помимо чувствительности диагностикума, могут быть объяснены тем, что количество специфических антител в сыворотке крови вакцинированных зависит от качества вакцинации, сроков забора проб сывороток, индивидуальных особенностей иммунного ответа, когда, например, клеточно-опосредованный иммунитет, стимулируемый преимущественно антигенами белковой природы, может преобладать над гуморальным иммунитетом и не наблюдается корреляции между напряжённостью клеточного ответа и уровнем синтезируемых антител. [33–36].

Полученные данные позволили оценить чувствительность и специфичность ИФА ЛПС Ft15, ИХ-тест ЛПС Ft15 и РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ относительно референс-диагностикума ELISA IgG, SERION (табл. 2).

*Относительную чувствительность* оценивают как способность диагностического метода давать истинный результат и определяют как отношение положительных результатов, определяемых экспериментальной тест-системой, к положительным результатам референсной тест-системы [37]. Соответственно под *специфичностью* понимают способность диагностического метода не давать ложноположительных результатов [37]. Расчёт относительной чувствительности проводят по формуле 1, относительной специфичности – по формуле 2.

$$\text{Чувствительность} = \frac{N \text{ полож. тестируемых}}{N \text{ полож. референс "SERION"}}, \text{ (формула 1)}$$

где N полож. тестируемых – количество положительных результатов при определении специфических антител в сыворотках тестируемых тест-систем, N полож. референс «SERION» – количество положительных результатов при определении специфических антител в сыворотках тестируемых референсной системой «ELISA IgG, SERION».

$$\text{Специфичность} = \frac{N \text{ отриц. тестируемых}}{N \text{ отриц. референс "SERION"}}, \text{ (формула 2)}$$

где N отриц. тестируемых – количество отрицательных результатов при определении специфических антител в сыворотках тестируемых тест-систем;

N полож. референс «ELISA IgG, SERION» – количество отрицательных результатов при определении специфических антител в сыворотках тестируемых референсной системой ELISA IgG, SERION.

Как видно из табл. 2, оба экспериментальных теста показывают 100% специфичность. Чувствительность экспериментальной «ИФА ЛПС Ft15» по отношению к референсной «ELISA IgG, SERION» составила 97,7%, а чувствительность «ИХ-тест ЛПС Ft15» – 94,3%. Чув-

Таблица 2

Чувствительность и специфичность экспериментальных тест-систем и РНГА относительно чувствительности коммерческой ИФА тест-системы при выявлении антитюляремийных антител в сыворотках крови вакцинированных людей

Тест-система	Чувствительность, %	Специфичность, %
ИФА ЛПС Ft15	97,7	100
ИХ-тест ЛПС Ft15	94,3	100
РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ	59,1	80

ствительность «РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ» оказалась относительно низкой – всего лишь 59,1% при специфичности в 80%, Наиболее чувствительным методом анализа, как показало исследование, является ИФА. Результаты, полученные с использованием экспериментальной и коммерческой ИФА тест-систем, наиболее близки во всех исследованных группах. «ИХ-тест ЛПС Ft15» при высокой специфичности показал в исследовании чувствительность, несколько меньшую, чем ИФА. С учётом простоты проведения и быстроты получения результатов (30 мин) ИХ-тест имеет большие перспективы для широкого использования в эпидемиологических исследованиях.

Более низкие показатели чувствительности и специфичности РНГА-диагностикума могут быть связаны с тем, что для изготовления сенсibilизированных эритроцитов – основного компонента РНГА, используют целые клетки *Francisella tularensis*. При конъюгации бактерий с эритроцитами могут повреждаться те эпитопы ЛПС, к которым выработаны антитела, что снижает способность сенсibilизированных эритроцитов взаимодействовать со специфическими иммуноглобулинами сывороток и снижает показатель чувствительности. На поверхности бактерий остаётся активным ряд неспецифических эпитопов, общих для некоторых грамотрицательных микроорганизмов, в частности бруцелл, иерсиний, эшерихий, что обуславливает перекрестные реакции с соответствующими сыворотками и ведёт к снижению специфичности. Цельные бактериальные клетки с трудом поддаются стандартизации, что ухудшает воспроизводимость реакции от партии к партии производимого диагностикума [14; 38].

Можно сделать вывод о том, что благодаря простоте и достаточно высокой чувствительности разработанные ИХ- и ИФА-тесты можно использовать при контроле эффективности вакцинации больших групп людей и расследовании вспышек туляремии. Использование ИХ-тестов на основе ЛПС Ft позволит без специального оборудования и наличия квалифицированного персонала быстро выявлять антитела к возбудителю туляремии в сыворотках людей с диагностически значимыми титрами ИФА (1:400 и выше). Применение таких тестов для экспресс-диагностики туляремии открывает новые перспективы в решении задач практического здравоохранения, в частности, они могут использоваться для проведения эпидемиологических исследований, серологических исследований в полевых условиях, у постели больного. С учётом подтверждённой в данной работе перспективности ИХ-теста на основе ЛПС Ft15 для серодиагностики туляремии запланирована подготовка его для проведения испытаний и государственной регистрации.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках диссертационной работы.

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

ЛИТЕРАТУРА (пп.1,5,6,7,12,21,28,32,37  
см. REFERENCES)

1. Бачинский А.Г., Низоленко Л.Ф. Оценка влияния мер противодействия на последствия локальных эпидемий, вызываемых возбудителями особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 2: 9-12.
5. Павлов В.М., Козлова И.И., Мокриевич А.Н., Шутко О.Д., Тимофеев В.С., Миронова Р.И., Кузнецова Т.С., Файзуллина Н.М.,

Кудрявцева Т.Ю., Комбарова Т.И., Дятлов И.А. Характеристика штаммов туляремийного микроба, выделенных от больных людей и мелких грызунов во время эпидемии туляремии в Ханты-Мансийске в 2013 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 2: 58-62.

6. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке на территории Ханты-Мансийского автономного округа – Югры в 2013 году». Югра: Управление Роспотребнадзора по ХМАО-Югре; 2014.
7. Боронина Л.Г., Лакно Т.И., Борзунов В.М., Чмелёв С.А. Активация очагов туляремии в уральском федеральном округе. Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции - «Инновации в медицинской, фармацевтической, ветеринарной и экологической микробиологии». СПб.: Человек и его здоровье; 2017.
12. Сырова, Н.А., Терешкина Н.Е., Девдариани З.Л. Современное состояние иммунодиагностики туляремии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2008; 97: 12–15.
21. Аронова Н.В., Павлович Н.В. Сравнительный анализ иммунного ответа кролика на антигены живых и убитых бактерий рода *Francisella*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2001; 2: 26-30.
28. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука; 1981.
32. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б. и др. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая Школа; 1991.
37. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1998.

## REFERENCES

1. Bachinsky A.G., Nizolenko L.F. Assessment of the impact of countermeasures on the effects of local epidemics caused by pathogens of especially dangerous infections. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2015; 2: 9-12. (in Russian)
2. Rotz, L.D., Khan A.S., Lillibridge S.R., Ostroff S.M., Hughes J.M. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg. Infect. Dis*. 2002; 14(2): 225-30.
3. Oyston P.C., Sjostedt A., Titball R.W. Tularemia: bioterrorism defense renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat. Rev. Microbiol*. 2004 ; 2: 967-78.
4. Maurin M. *Francisella tularensis* as a potential agent of bioterrorism? *Expert Rev. Anti Infect. Ther*. 2015; 13: 141-4.
5. Pavlov V.M., Kozlova I.I., Mokrievich A.N., Shutko O.D., Timofeev V.S., Mironova R.I., Kuznetsova T.S., Faizullina N.M., Kudryavtseva T.Yu., Kombarova T.I., Dyatlov I.A. Characteristics of Tularemia Agent Strains Isolated from Patients and Small Rodents during Tularemia Epidemic in Khanty-Mansiisk in 2013. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2015; 2: 58-62. (in Russian)
6. State report «On sanitary and epidemiological situation in Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Yugra in 2013». Yugra: Upravlenie Rospotrebnadzora po KHMAO-Yugra; 2014. (in Russian)
7. Boronina L. G., Lakhno T. I., Borzunov V. M., Shmelev S. A. Activation of tularemia foci in the Ural Federal district. Collection of materials of the all-Russian scientific-practical conference – «Innovations in medical, pharmaceutical, veterinary and environmental Microbiology». St.Peterbug: Chelovek i ego zdorov'e; 2017. (in Russian)
8. Hepburn M.J., Simpson A.H. Tularemia: current diagnosis and treatment options. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008; 6: 231-40.
9. Tärnvik A., Chu M.C. New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2007; 1105: 378-404.
10. Karagöz S., Kiliç S., Berk E., Uzel A., Çelebi B., Çomoğlu Ş., Karagöz A., Akyar I., Can S. *Francisella tularensis* bacteremia: report of two cases and review of the literature. *New Microbiol*. 2013; 36: 315-23.
11. Shapiro D.S., Schwartz D.R.. Exposure of laboratory workers to *Francisella tularensis* despite a bioterrorism procedure. *J.Clin. Microbiol*. 2002; 40: 2278-81.
12. Syrova N. A., Tereshkina N. Y., Devdariani Z. L. Current state of immunodiagnosics of tularemia. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2008; 97: 12-5. (in Russian)

13. Schmitt P., Spletstoesser W., Porsch-Ozcürümez M., Finke E.J., Grunow R. A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia. *Epidemiol. Infect.* 2005; 133: 759-66.
14. Yanes, H. et al. Evaluation of in-house and commercial serological tests for diagnosis of human tularemia. *J.Clin. Microbiol.* 2018; 56: 1440-7.
15. Behan K.A., Klein G.C. Reduction of Brucella species and Francisella tularensis cross-reacting agglutinins by dithiothreitol. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 16: 757-6.
16. Bevanger L., Maeland J.A., Naess A.I. Agglutinins and antibodies to Francisella tularensis outer membrane antigens in the early diagnosis of disease during an outbreak of tularemia. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 433-7.
17. Chaignat V., Djordjevic-Spasic M., Ruettger A., Otto P., Klimpel D., Müller W., Tomaso H. Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia. *BMC Infectious Diseases.* 2014; 14: 234.
18. Kilic S., Celebi B., Yesilyurt M. Evaluation of a commercial immunochromatographic assay for the serologic diagnosis of tularemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2012; 74 (1): 1-5.
19. Porsch-Ozcürümez M., Kischel N., Priebe H., Spletstoesser W., Finke E.J., and Grunow R. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004; 11: 1008-15.
20. Sharma N., Hotta A., Yamamoto Y., Fujita O., Uda A., Morikawa S., Yamada A., Tanabayashi K. Detection of Francisella tularensis-specific antibodies in patients with tularemia by a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Vaccine Immunol.* 2013; 20: 9-16.
21. Aronova N. V., Pavlovich N. V. Comparative analysis of the immune response of a rabbit to antigens to live and killed Francisella species bacteria *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologia i virusologia.* 2001; 2: 26-30. (in Russian)
22. Sandstrom G., Sjostedt A., Johansson T., Kuoppa K., and Williams J. C. Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from Francisella tularensis LVS. *FEMS Microbiol. Immunol.* 1992; 5: 201-10.
23. Spletstoesser W., Guglielmo-Viret V., Seibold E., Thullier P. Evaluation of an immunochromatographic test for rapid and reliable serodiagnosis of human tularemia and detection of Francisella tularensis-specific antibodies in sera from different mammalian species. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(5): 1629-34.
24. Westphal O., Jann K. Bacterial Lipopolysaccharides. Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry.* 1965; 5: 83-91.
25. Wetmur J.G., Davidson N.J. Kinetics of renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* 1968; 31: 349.
26. Twine S.M., Petit M.D., Fulton K.M., House R.V., Conlan J.W., Tripp R., eds. Immunoproteomics Analysis of the Murine Antibody Response to Vaccination with an Improved Francisella tularensis Live Vaccine Strain (LVS). *PLoS ONE.* 2010; 5: 100-2.
27. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-5.
28. Osterman L.A. Methods of research of proteins and nucleic acids: Electrophoresis and ultracentrifugation (practical guide) [Metody issledovaniya belkov i nukleinykh kislot](prakticheskoe posobie). Moscow: Nauka; 1981. (in Russian)
29. Tsai C.M., Frash C.E. A sensitive silverstain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1982; 119.
30. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
31. Lowry O.H., Rosenbrough N.R., Farr A.L. et al. Protein measurement with the folin phenol. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 115-9.
32. Egorov A. M., Osipov A. P., Dzantiev B. B., etc. Theory and practice of enzyme immunoassay [Teoriya i praktika immunofermentnogo analiza]. Moscow: Vysshaya shkola; 1991. (in Russian)
33. Sandstrom G., Tarnvik A., Wolf-Watz H., and Lofgren S. Antigen from Francisella tularensis: nonidentity between determinants participating in cell-mediated and humoral reactions. *Infect. Immun.* 1984; 45: 101-6.
34. Koskela P., and Herva E. Cell-mediated immunity against Francisella tularensis after natural infection. *Scand. J. Infect. Dis.* 1980; 12: 281-7.
35. Tarnvik A., Lofgren M. L., Lofgren S., Sandstrom G., and Wolf-Watz H. Long-lasting cell-mediated immunity induced by a live Francisella tularensis vaccine. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22: 527-30.
36. Tarnvik A., and Lofgren S. Stimulation of human lymphocytes by a vaccine strain of Francisella tularensis. *Infect. Immun.* 1975; 12: 951-7.
37. Glants S. Medico-biological statistics [Mediko-biologicheskaya statistika]. Moscow: Praktika; 1998. (in Russian)
38. Sharma N., Hotta A., Yamamoto Y., Uda A., Fujita O., Mizoguchi T., Shindo J., Park C.H., Kudo N., Hatai H., Oyamada T., Yamada A., Morikawa S., Tanabayashi K. Serosurveillance for Francisella tularensis among wild animals in Japan using a newly developed competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014; 14(4): 234.

Поступила 17.07.18  
Принята к печати 10.10.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.126-002-022.7-078.3

Синицкий М. Ю.<sup>1,2</sup>, Асанов М. А.<sup>1,2</sup>, Тхоренко Б. А.<sup>1</sup>, Одаренко Ю. Н.<sup>1</sup>, Понасенко А. В.<sup>1</sup>

## МИКРОФЛОРА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННЫМ ЭНДОКАРДИТОМ

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», 650002, Кемерово;

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, 650000, Кемерово

*Инфекционный эндокардит – тяжёлое воспалительное заболевание, связанное с поражением клапанов сердца и других частей эндокарда. Обследован 91 пациент с подтверждённым диагнозом «инфекционный эндокардит», госпитализированный в ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (г. Кемерово, Россия) с 2010 по 2015 г. Определение спектра микроорганизмов в образцах периферической крови пациентов проводили методом ПЦР с использованием наборов реагентов ООО НПФ «Литех» (Москва, Россия), позволяющих обнаруживать в образцах биологического материала *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalacticae*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*. Статистическую обработку результатов исследования выполняли в программе StatSoft STATISTICA 10. У 83,5% пациентов в периферической крови обнаружено наличие *Staphylococcus spp.*, остальные возбудители отмечены значительно реже (от шести случаев выявления энтерококков до одного случая выявления *Streptococcus agalacticae* и *Proteus spp.*). У девяти пациентов ни один из анализируемых возбудителей не выявлен, у ряда пациентов определено наличие микробных ассоциаций. Не обнаружено достоверных данных о различии состава микрофлоры в зависимости от пола, наркозависимости, типа инфекционного эндокардита, поражённого клапана. Результаты ПЦР образцов периферической крови и культурального исследования тканей поражённых клапанов, удалённых в ходе кардиохирургического вмешательства, значительно различаются. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости более углублённых исследований, включающих ПЦР-анализ образцов периферической крови, смывов с поражённых клапанов, гомогенизированных образцов ткани клапана, что позволит получить более подробные данные и сделать вывод о возможности использования ПЦР образцов крови в качестве диагностического теста для раннего определения возбудителя.*

**Ключевые слова:** сердечно-сосудистые заболевания; инфекционный эндокардит; бактериальная микрофлора; полимеразная цепная реакция.

**Для цитирования:** Синицкий М.Ю., Асанов М.А., Тхоренко Б.А., Одаренко Ю.Н., Понасенко А.В. Микрофлора периферической крови пациентов с инфекционным эндокардитом. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 636-640. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-636-640>

Sinitsky M. Yu.<sup>1,2</sup>, Asanov M. A.<sup>1,2</sup>, Tkhorenko B. A.<sup>1</sup>, Odarenko Y.N.<sup>1</sup>, Ponasenko A. V.<sup>1</sup>

MICROFLORA OF PERIPHERAL BLOOD OBTAINED FROM PATIENTS WITH INFECTIVE ENDOCARDITIS

<sup>1</sup>The Federal State Budget Scientific Institution «Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases», 650002, Kemerovo, Russia;

<sup>2</sup>The Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, 650000, Kemerovo, Russia

*Infective endocarditis is a serious inflammatory disease associated with damage of heart valves and other parts of endocardium. This study included 91 patients with a confirmed diagnosis of «infectious endocarditis» and hospitalized at the Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Disease (Kemerovo, Russia) from 2010 to 2015. The determination of the spectrum of microorganisms in the samples of patients' peripheral blood was carried out using the PCR method using reagents produced by Lyteh Ltd. (Moscow, Russia) allowing detect *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalacticae*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* in the samples of biological material. Statistical analysis was performed in the StatSoft STATISTICA 10 software. 83.5% of patients were characterized by presence *Staphylococcus spp.* in the peripheral blood; the other pathogens were detected much less often (from six cases of enterococci detection to one case of *Streptococcus agalacticae* and *Proteus spp.*). In nine patients, none of the analyzed pathogens was detected, and a number of patients were characterized by the simultaneous presence of several pathogens. There was no reliable data on the difference in microflora structure depending on sex, drug addiction, the type of infective endocarditis and the damaged valve. It was established that the results of PCR of peripheral blood samples and microbiological examination of the tissues of damaged valves that were removed during cardiac surgery, differ significantly. The obtained results testify to the need for more in-depth studies including PCR analysis of peripheral blood samples, flushing from damaged valves, and also homogenized valve tissue samples, which will allow us to obtain more detailed data and conclude that PCR can be used as a diagnostic test for early detection microbiological agent as causative.*

**Key words:** cardiovascular diseases; infective endocarditis; bacterial microflora; polymerase chain reaction.

**For citation:** Sinitsky M.Y., Asanov M.A., Tkhorenko B.A., Odarenko Y.N., Ponasenko A.V. Microflora of peripheral blood obtained from patients with infective endocarditis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (10): 636-640 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-636-640>

**For correspondence:** Asanov M. A., junior researcher of the Laboratory of Genome Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; e-mail: [asanma@kemcardio.ru](mailto:asanma@kemcardio.ru)

**Information about authors:**

Sinitsky M.Y., <http://orcid.org/0000-0002-4824-2418>  
Tkhorenko B.A., <http://orcid.org/0000-0002-5243-2599>  
Ponassenko A.V., <http://orcid.org/0000-0002-3002-2863>

Asanov M.A., <http://orcid.org/0000-0002-0747-2495>  
Odarenko Y.N., <http://orcid.org/0000-0001-5624-4539>

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

**Acknowledgment.** *The study was supported by the comprehensive program of fundamental scientific research of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the framework of the fundamental subject of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases № 546-2015-0011*

Received 03.10.2018  
Accepted 15.10.2018

**Введение.** Инфекционный эндокардит (ИЭ) – тяжёлое воспалительное заболевание инфекционного генеза, связанное преимущественно с поражением клапанов сердца, в более редких случаях – других частей эндокарда [1]. ИЭ является полиэтиологическим заболеванием, в патогенезе которого участвует большое количество различных возбудителей [2]. К числу приоритетных патогенов, вызывающих ИЭ, относятся *Streptococcus viridans* (около 45% от общего числа возбудителей), *Streptococcus bovis* (10%), *Staphylococcus aureus* (около 15%), *Enterococcus spp.* (6–10%). К числу редких патогенов ИЭ относятся *Haemophilus spp.*, *Actinobacillus spp.*, *Cardiobacterium spp.*, *Eikenella spp.*, *Kingella spp.*, которые высеваются примерно в 3% случаев [2–5]. Отмечается тенденция к увеличению доли ИЭ, вызванного *Staphylococcus aureus* [6], смертность от которого остаётся довольно высокой (30–40%), что в 4 раза превышает смертность от ИЭ, вызванного стрептококками [7]. Инфицирование нативных клапанов *Staphylococcus epidermidis* и *Enterococcus spp.* встречается достаточно редко [3, 4]. У инъекционных наркоманов значительно увеличивается доля ИЭ, вызванного микроорганизмами, колонизирующими поверхность кожи, в частности *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (50–60% от общего числа патогенов), при этом стрептококки и энтерококки встречаются значительно реже, примерно в 20% случаев [5]. В 5% случаев причиной ИЭ становятся грибы, часто в ассоциации с бактериями [5; 8].

Отдельную проблему для современной медицины представляют протезный ИЭ, составляющий до 20% от всех случаев заболевания ИЭ. Патогенная микрофлора отмечается в крови пациентов и на удалённых протезах в течение года после имплантации искусственного клапана. Приоритетными патогенами раннего протезного ИЭ являются *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, инфицирование которыми происходит во время операции или в раннем послеоперационном периоде; поздний протезный ИЭ возникает на фоне транзиторной бактериемии и характеризуется спектром патогенов, сходным с таковым при ИЭ нативных клапанов [3, 4].

Заболеваемость ИЭ в мире составляет около 7 случаев на 100 тыс. человек, причём в последние годы наблюдается тенденция к увеличению заболеваемости и смертности от данной патологии (особенно в группах повышенного риска), доли пациентов, нуждающихся в оперативном лечении. Данная ситуация усугубляется растущей резистентностью возбудителей к антибактериальным препаратам, что негативно сказывается на эффективности консервативного лечения ИЭ [2, 6]. Всё это обуславливает необходимость изучения патогенеза ИЭ и поиск путей более эффективной диагностики и лечения данной патологии.

Диагностика ИЭ проводится культуральным методом. Одним из быстрых и современных методов детекции патогенных микроорганизмов в исследуемом биологическом материале является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) [2], при этом остаётся неизученным вопрос, насколько сопоставимы данные, полученные в ходе такого анализа, с результатами культурального метода.

**Цель исследования** – изучить спектр бактериальной микрофлоры в образцах периферической крови пациентов с ИЭ как нативных, так и искусственных клапанов сердца.

**Материал и методы.** Материалом исследования служили образцы периферической крови 91 пациента с подтверждённым диагнозом ИЭ, госпитализированного в ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (г. Кемерово, Россия) в период 2010–2015 гг. Средний возраст пациентов составил  $46 \pm 2$  года. По результатам посевов образцов ткани поражённых клапанов сердца у 71% пациентов этиология ИЭ не установлена, у 15% заболевание вызвано стафилококками, по 7% случаев приходилось на стрептококки и прочих возбудителей (*Neisseria meningitidis*, *Actinobacter baumani*, *Spingobacterium multiverum*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Salmonella enteritidis*, *Enterococcus faecium*). Клинико-демографическая характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Проведено выделение ДНК из сыворотки крови пациентов с использованием наборов «ДНК-СОРБЕНТ» (ООО НПФ «Литех», г. Москва, Россия). Вакутейнеры с цельной кровью размораживались и отстаивались в течение 1 ч при температуре 4°C, центрифугирование проводилось при 3000 об/мин в течение 20 мин. Сыворотку переносили в отдельную пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл и использовали для выделения ДНК по стандартному протоколу производителя наборов «ДНК-СОРБЕНТ». Выделенную ДНК хранили при температуре -20°C.

Индикация возбудителей в исследуемых образцах проводилась методом ПЦР-РВ с использованием ПЦР-тестов ООО НПФ «Литех» (г. Москва, Россия). Использованы ПЦР-тесты: «СТАФИПОЛ-species-РВ» (*Staphylococcus spp.*), «СТАФИПОЛ-РВ» (*Staphylococcus aureus*), «СТРЕПТОПОЛ-А-РВ» (*Streptococcus pyogenes*), «СТРЕПТОПОЛ-В-РВ» (*Streptococcus agalacticae*), «ЭНТЕРОПОЛ-РВ» (*Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*), «ПРОТЕПОЛ-РВ» (*Proteus spp.*), «ИНФЛЮЭНЗА-РВ» (*Haemophilus influenza*), «ЭНКОПОЛ-РВ» (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*). ПЦР-тесты представляют собой пробирки типа Эппендорф вместимостью 200 мкл с добавленной в них готовой амплификационной смесью. Пробирки размораживались, в них добавляли

Таблица 1

**Клинико-демографическая характеристика пациентов, включенных в исследование**

Показатель	Мужчины	Женщины	Всего
Число обследованных (n)	62	29	91
Возраст, годы (M ± m)	44 ± 2	50 ± 3	46 ± 2
Число наркозависимых (n)	13	1	14
Тип ИЭ (n)			
Нативных клапанов	56	22	78
Искусственных клапанов	6	7	13
Поражённый клапан (n)			
МК	16	15	31
АК	16	7	23
ТК	15	2	17
МК + АК	14	3	17
МК + ТК	1	1	2
АК + ТК	0	1	1
Этиология (n)			
Не установлена	42	23	65
<i>Staphylococcus spp.</i>	13	1	14
<i>Streptococcus spp.</i>	3	3	6
Другой возбудитель	5	1	6

7 мкл ДНК с концентрацией 10 нг/мкл. В качестве отрицательного и положительного контроля использовали соответственно разбавитель и положительный контрольный образец ДНК, входящие в состав ПЦР-теста. Амплификацию образцов проводили на детектирующем амплификаторе ДТ-96 («ДНК-Технология», г. Москва, Россия) в течение 40 циклов по следующему протоколу: денатурация – 10 с при 94°C, отжиг – 23 с при 64°C, элонгация – 20 с при 72°C. Анализ результатов исследования проводили с помощью программы RealTime PCR v7.9 («ДНК-Технология», г. Москва, Россия).

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с использованием программы StatSoft STATISTICA 10. Статистическая значимость различий между относительными показателями рассчитывалась с помощью критерия  $\chi^2$ -квадрат Пирсона. Для уменьшения вероятности ошибки первого типа в случаях, когда ожидаемые явления принимали значения от 10 до 5, использовали критерий  $\chi^2$ -квадрат с поправкой Йейтса; менее 5 – точный критерий Фишера. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинской декларации. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИ КПСЗ. До включения в исследование у всех участников получено добровольное письменное информированное согласие.

**Результаты.** Установлено, что у подавляющего большинства пациентов с ИЭ (76 человек, что составило 83,5% от общего числа обследованных) в периферической крови отмечается наличие *Staphylococcus spp.*, причём *Staphylococcus aureus* выявлен только у трёх пациентов. Остальные возбудители выявляются значительно реже (от шести случаев выявления энтерококков до одного случая выявления *Streptococcus agalacticae* и *Proteus spp.*) (табл. 2). У девяти пациентов не удалось выявить ни одного из анализируемых возбудителей. В

образцах крови ряда пациентов определялось несколько микроорганизмов. *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* одновременно встречались у пяти пациентов; *Staphylococcus spp.* и *Haemophilus influenzae* – у двух, у трёх пациентов одновременно определено наличие возбудителей из трёх родов: *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* (без идентификации вида в связи с ограниченностью наборов для молекулярного типирования).

Шесть пациентов продемонстрировали бактериемию *Staphylococcus spp.* в ассоциации с другими микроорганизмами – каждое сочетание встретилось в единственном случае. У одного пациента определена бактериемия *Staphylococcus spp.* (молекулярно-генетическое типирование позволило определить вид *Staphylococcus aureus*) и *Streptococcus agalacticae*; в одном случае – *Staphylococcus spp.* (определён *Staphylococcus aureus*) и *Streptococcus pyogenes*; в одном случае – *Staphylococcus spp.* (*Staphylococcus aureus*) и *Haemophilus influenzae*; в одном случае *Staphylococcus spp.* (без определения видовой принадлежности) и *Streptococcus pyogenes*; в одном случае определены микроорганизмы, принадлежащие к *Staphylococcus spp.* и *Proteus spp.*

Спектр бактериальной микрофлоры периферической крови пациентов с ИЭ представлен в табл. 2. Не выявлено статистически значимых различий в структуре возбудителей у пациентов различных подгрупп.

Сопоставлены результаты посевов образцов ткани удалённых в ходе кардиохирургического вмешательства клапанов, на основе которых определялась этиология ИЭ у пациентов (результаты бактериологического исследования крови не являлись информативным, так как ни в одном случае роста на питательных средах после трехкратного посева крови не получено, что связано с наличием антибактериальной терапии на догоспитальном этапе), и результатов ПЦР образцов периферической крови. В 26 случаях, когда возбудитель ИЭ был выделен, методом ПЦР удалось подтвердить только три: два случая стрептококковой инфекции и один – стафилококковой. Практически у всех пациентов, у которых результаты посевов образцов поражённого клапана оказались отрицательными, в образцах крови обнаружена ДНК микроорганизмов, в шести случаях результаты ПЦР отрицательные.

**Обсуждение.** Диагностика ИЭ основана на критериях Дьюка, разработанных в 1994 г в США [9] и модифицированных в 2000 г. [10]. Выделение гемокультуры является одним из двух важных диагностических критериев ИЭ. Культуральный метод позволяет выявить возбудитель ИЭ и определить его чувствительность к антибиотикам, однако он занимает много времени, что является его недостатком. Для выделения культуры необходимо провести три последовательных забора периферической крови в течение суток с интервалом не менее 15 мин; причём успех роста гемокультуры возрастает с каждым последующим посевом крови от 80 до 99%. В ряде случаев культуральный метод может не дать положительных результатов. Это может свидетельствовать о том, что этиология ИЭ обусловлена бактериями, редко ассоциирующимися с эндокардитом (*Lactobacillus spp.*, *Klebsiella spp.*), микроорганизмами требовательными к составу питательных сред (бактерии группы НА-СЕК), грибами, внутриклеточными паразитами (*Coxiella burnetii*, *Chlamidia*, *Tropheryma whipplei*), выделить которые в обычной клинической практике сложно [11]. Вышеперечисленные возбудители могут быть выявлены

Микрофлора пациентов с ИЭ

Показатель	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus agalacticae</i>	<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
Пол								
Мужской	51	2	3	0	2	1	4	3
Женский	25	1	1	1	3	0	0	3
Наркозависимость								
Да	11	1	1	0	0	0	1	1
Нет	65	2	3	1	5	1	3	5
Тип ИЭ								
Нативных клапанов	64	3	4	1	4	1	4	6
Искусственных клапанов	12	0	0	0	1	0	0	0
Поражённый клапан	28	2	2	1	2	0	2	1
МК	19	0	1	0	0	0	0	4
АК	15	1	0	0	0	0	1	1
ТК	12	0	0	0	3	1	1	0
МК + АК	2	0	0	0	0	0	0	0
МК + ТК	0	0	1	0	0	0	0	0
АК + ТК								
Общая выборка	76	3	4	1	5	1	4	6

Примечание. АК – аортальный клапан; ИЭ – инфекционный эндокардит; МК – митральный клапан; ТК – трикуспидальный клапан.

путём углублённых бактериологических исследований с использованием селективных питательных сред, иммунологических и иммуногистохимических методов, ПЦР образцов крови и удалённых при кардиохирургических вмешательствах тканей клапанов [12].

В изучаемой группе пациентов бактериологическое исследование ткани клапанов сердца, удалённых в ходе кардиохирургического вмешательства, в 71% случаев не позволило установить этиологию ИЭ. Среди оставшихся случаев выявлено двукратное преобладание стафилококков над стрептококками и другими возбудителями, что несколько противоречит имеющимся данным о стрептококке как о ведущем этиологическом агенте ИЭ, однако последующий углублённый анализ показал, что 79% случаев выявления стафилококков приходилось на выборку инъекционных наркоманов ( $p = 0,0025$ ), что полностью соответствует данным литературы [5].

Согласно результатам ПЦР образцов периферической крови пациентов с ИЭ в большинстве образцов отмечено наличие стафилококков, однако расчёт  $\chi$ -квадрата Пирсона показал отсутствие статистически значимых различий ( $p > 0,05$ ) между частотой встречаемости данного возбудителя в группе инъекционных наркоманов и пациентов без наркозависимости, в выборках пациентов с ИЭ нативных клапанов и протезов (согласно данным литературы, доля ИЭ стафилококковой этиологии повышается у больных ранним и поздним ИЭ искусственных клапанов сердца) [5]. Стафилококковый ИЭ характеризуется наиболее острым течением, быстрым разрушением клапанов, большим количеством осложнений, зачастую ассоциирован с госпитальными инфекциями, особенно у пожилых пациентов [11, 13]. Учитывая, что остальные изученные возбудители выявлялись в образцах крови обследованных пациентов значительно реже, чем представители рода *Staphylococcus*, представляет

интерес детальное изучение видового состава микроорганизмов данной группы.

Отдельный интерес представляет сопоставимость данных, полученных в результате молекулярно-биологического анализа спектра микроорганизмов периферической крови пациентов с ИЭ и результатов культурального исследования тканей поражённого клапана. Культуральный метод является общепринятым и в зарубежных лабораториях обладает 95% эффективностью определения этиологии ИЭ [14], в подавляющем большинстве Российских медицинских учреждений в силу объективных причин добиться такого показателя невозможно [5]. Это обуславливает необходимость разработки и внедрения более эффективных методов диагностики возбудителей у пациентов с ИЭ, которые бы позволили на раннем этапе, до начала лечения, определить этиологию заболевания и выбрать соответствующую терапию, специфичную для конкретного возбудителя. К числу таких методов можно отнести метод ПЦР, являющийся достаточно точным и позволяющим получить результаты в короткий срок. Необходимо понимать, насколько данные, полученные в ходе ПЦР образцов периферической крови пациентов и характеризующие спектр возбудителей (которые необязательно являются причиной ИЭ), присутствующие в кровотоке, соответствуют результатам посевов ткани поражённого клапана. Методом ПЦР удалось подтвердить возбудителя ИЭ, выделенного при посеве образца поражённого клапана только в трёх случаях, общее количество пациентов, у которых удалось установить спектр микроорганизмов методом ПЦР, оказалось значительно больше, чем пациентов, у которых этиология заболевания установлена культуральным методом. Это может быть связано с методологическими особенностями и сложностями. Нельзя исключить ложноположительные результаты ПЦР, когда возбудитель присутствует в кровотоке за счёт несанированных очагов хронической ин-

фекции, но на поверхности клапана не локализуется и не является этиологическим фактором ИЭ.

**Заключение.** Определён спектр микрофлоры периферической крови пациентов с ИЭ. Не обнаружено достоверных различий спектра возбудителей в зависимости от пола, наркозависимости, типа ИЭ, поражённого клапана. Результаты молекулярно-генетического исследования образцов периферической крови методом ПЦР и культурального исследования тканей поражённых клапанов, удалённых в ходе кардиохирургического вмешательства, значительно различаются. Полученные результаты обуславливают необходимость дальнейших углублённых исследований, включающих молекулярно-генетический анализ образцов периферической крови, смыслов с поражённых клапанов, гоменизированных образцов тканей клапана, что позволит получить более подробные данные и сделать вывод о возможности применения ПЦР образцов крови в качестве диагностического теста для раннего определения возбудителей ИЭ.

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

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2015-0011 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

ЛИТЕРАТУРА ( пп. 1-4, 6, 9, 10, 13, 14 ( пп. 1-4, 9, 10, 13, 14 см. REFERENCES )

- Белов Б.С., Тарасова Г.М. Инфекционный эндокардит: этиология, патогенез, клиническая картина (часть I). *Современная ревматология*. 2008; 2: 32-8.
- Понасенко А.В., Кутихин А.Г., Хуторная М.В., Южалин А.Е., Рутковская Н.В., Головкин А.С. Связь полиморфизма гена TREM-1 с инфекционным эндокардитом. *Инфекция и иммунитет*. 2015; 5: 331-8.
- Завырылина И.Н., Барбараш Н.А., Начева Л.В. Паразитарные поражения сердца. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2012; 2: 60-3.
- Ватутин Н.Т., Тарадин Г.Г., Чаус Е.А., Смирнова А.С. Инфекционный эндокардит у пожилых: от этиологических особенностей до лечения и профилактики. *Российский кардиологический журнал*. 2016; 1: 80-9.
- Белов Б.С., Тарасова Г.М. Инфекционный эндокардит: особенности течения, критерии диагноза, дифференциальная диагностика (часть II). *Современная ревматология*. 2008; 2: 22-8.

## REFERENCES

- Golovkin A.S., Ponasenko A.V., Yuzhalin A.E., Salakhov R.R., Khutornaya M.V., Kutikhin A.G., et al. An association between single nucleotide polymorphisms within TLR and TREM-1 genes and infective endocarditis. *Cytokine*. 2015; 71: 16-21.
- Baddour L.M., Wilson W.R., Bayer A.S., Fowler V.G.J., Tleyjeh I.M., Rybak M.J., et al. Infective endocarditis in adults: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: A scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 2015; 132: 1435-86.
- Ananthasubramaniam K., Beattie J.N., Rosman H.S., Jayam V., Borzak S. How safely and for how long can warfarin therapy be withheld in prosthetic heart valve patients hospitalized with a major hemorrhage? *Chest*. 2001; 119: 478-84.
- Snygg-Martin U., Gustafsson L., Rosengren L., Alsiö A., Ackerholm P., Andersson R., et al. Cerebrovascular complications in patients with left-sided infective endocarditis are common: a prospective study using magnetic resonance imaging and neurochemical brain damage markers. *Clin Infect Dis*. 2008; 47: 23-30.
- Belov B.S., Tarasova G.M. Infective endocarditis: etiology, pathogenesis, clinical picture (part I). *Sovremennaya revmatologiya*. 2008; 2: 32-38. (in Russian)
- Bai A.D., Agarwal A., Steinberg M., Showler A., Burry L., Tomlinson G.A. et al. Clinical predictors and clinical prediction rules to estimate initial patient risk for infective endocarditis in *Staphylococcus aureus* bacteremia: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2017; 23: 900-6.
- Ponasenko A.V., Kutihin A.G., Hutornaya M.V., YUzhalin A.E., Rutkovskaya N.V., Golovkin A.S. Association of TREM-1 gene polymorphism with infective endocarditis. *Infektsiya i immunitet*. 2015; 5: 331-8. (in Russian)
- Zavyrylina I.N., Barbarash N.A., Nacheva L.V. The parasitic heart lesions. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2012; 2: 60-63. (in Russian)
- Durack D.T., Lukes A.S., Bright D.K. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service. *Am. J. Med.* 1994; 96: 200-9.
- Li J.S., Sexton D.J., Mick N., Nettles R., Fowler V.G.J., Ryan T. et al. Proposed modification to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 30: 633-8.
- Vatutin N.T., Taradin G.G., CHaus E.A., Smirnova A.S. Infective endocarditis in elderly: from etiology to treatment and prevention. *Rossiiskiy kardiologicheskii zhurnal*. 2016; 1: 80-9. (in Russian)
- Belov B.S., Tarasova G.M. Infective endocarditis: the specific features of its course, the criteria for diagnosis, differential diagnosis (part II). *Sovremennaya revmatologiya*. 2008; 2: 22-8. (in Russian)
- Di Salvo G., Thuny F., Rosenberg V., Pergola V., Belliard O., Derumeaux G., et al. Endocarditis in the elderly: clinical, echocardiographic, and prognostic features. *Eur. Heart J.* 2003; 24: 1576-83.
- Hoen B., Selton-Suty C., Lacassin F., Etienne J., Briançon S., Lepout C., et al. Infective endocarditis in patients with negative blood cultures; analysis of 88 cases from a one-year nationwide survey in France. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 20: 501-6.

Поступила 03.10.18  
Принята к печати 15.10.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.24-002:577.21.083

Сперанская Е. В.<sup>1</sup>, Бруснигина Н. Ф.<sup>1</sup>, Ефимов Е. И.<sup>1</sup>, Самохина Л. П.<sup>2</sup>

## ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ВОЕННОСЛУЖАЩИХ

<sup>1</sup>ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора РФ, 603950, Нижний Новгород, Россия;

<sup>2</sup>ФГКУ «1586 Военный клинический госпиталь» МО РФ, 603105, Нижний Новгород, Россия

С целью выявления возбудителей внебольничной пневмонии (ВП) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) исследовали образцы мокроты, крови, бронхоальвеолярного лаважа, мазки из ротоглотки от 255 военнослужащих по призыву, находящихся на стационарном лечении с рентгенологически подтвержденным диагнозом внебольничная пневмония (ВП). В группу сравнения входили 270 здоровых новобранцев. Детекцию *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *Adenovirus*, *Herpes simplex I/II*, *Cytomegalovirus* проводили с использованием коммерческих тест-систем «АмплиСенс» (ЦНИИЭ) и GenPak DNA PCR test (ООО «Изоген», Москва). Пневмококки являлись доминирующими возбудителями ВП. Показан высокий уровень носительства *S. pneumoniae* (86,3%) у военнослужащих. Частота выявления *M. pneumoniae* составила 14,5±2,2%, *C. pneumoniae* - 13,7±2,2%. Наибольшие показатели частоты обнаружения *C. pneumoniae* и *M. pneumoniae* зарегистрированы у больных нетяжелой ВП - 16,2±2,6% и 16,7±2,7% соответственно, тогда как у больных тяжелой ВП частота их выявления оказалась ниже - 5,3±3,0% и 7,0±3,4% соответственно ( $p < 0,05$ ). Роль *L. pneumophila* и *C. psittaci* незначительна. Аденовирусы выявлены в 14,1±2,2% случаев, в частности у пациентов с тяжелой ВП - в 36,8±6,4% случаев. Установлена высокая частота бактериально-бактериальных и бактериально-вирусных ассоциаций. Показано, что в системе этиологической диагностики ВП у организованных взрослых ПЦР является высокоэффективным методом, незаменимым при постановке диагноза, особенно в периоды высокой заболеваемости. Высокий уровень носительства *S. pneumoniae* у военнослужащих и его доминирующая роль в этиологической структуре ВП свидетельствуют о необходимости специфической иммунопрофилактики новобранцев. Существенная доля *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* в этиологической структуре ВП свидетельствует о целесообразности включения данных возбудителей в алгоритм обследования пациентов с ВП. Высокая частота ассоциаций микроорганизмов указывает на необходимость учёта данного факта при назначении этиотропной терапии.

Ключевые слова: внебольничная пневмония; военнослужащие; *S. pneumoniae*; *M. pneumoniae*; *C. pneumoniae*; *L. pneumophila*; *C. psittaci*; *Adenovirus*; герпесвирусы; ПЦР.

Для цитирования: Сперанская Е. В., Бруснигина Н. Ф., Ефимов Е. И. Опыт применения метода ПЦР для выявления возбудителей внебольничной пневмонии у военнослужащих. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 641-645. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-641-645>

Speranskaya E. V.<sup>1</sup>, Brusnigina N. F.<sup>1</sup>, Efimov E. I.<sup>1</sup>, Samokhina L. P.<sup>2</sup>

### EXPERIENCE OF APPLICATION OF THE PCR FOR IDENTIFICATION OF THE CAUSATIVE AGENT OF COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA IN THE MILITARY

<sup>1</sup>Nizhny Novgorod scientific and research institute of epidemiology and microbiology name acad. I. N. Blokhina of the Rospotrebнадzor, 603950, Nizhniy Novgorod, Russian Federation; <sup>2</sup>«1586 Military Clinical Hospital» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 603105, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

Samples of sputum, blood, bronchoalveolar lavage, swabs from the oropharynx from 255 military personnel undergoing in-patient treatment with an x-ray confirmed diagnosis of community-acquired pneumonia (CAP) were examined by polymerase chain reaction (PCR). The comparison group was included 270 healthy recruits. The detection of *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *Adenovirus*, *Herpes simplex I/II*, *Cytomegalovirus* was carried out by PCR using AmpliSens commercial test systems (CRIE) and GenPak DNA PCR test (Isogen LLC, Moscow). The etiologic factor of CAP for military personnel is set in 94.1% of cases. *S. pneumoniae* was the dominant pathogen of CAP. A high level of *S. pneumoniae* carriage (86.3%) among military personnel was shown. The incidence of *M. pneumoniae* was 14.5±2.2%, and *C. pneumoniae* was 13.7±2.2%. The highest detection rates of *C. pneumoniae* and *M. pneumoniae* were obtained in patients with not severe CAP - 16.2±2.6% u 16.7±2.7% of cases, respectively. The frequency of detection of these pathogens in patients with severe CAP was significantly lower - 5.3±3.0% and 7.0±3.4%, respectively ( $p < 0.05$ ). The role of *L. pneumophila* and *C. psittaci* was negligible. The frequency of detection of adenoviruses was 14.1±2.2% of cases, in particular, in patients with severe CAP - in 36.8±6.4% of cases. A high frequency of bacterial-bacterial and bacterial-viral associations has been established. In etiologic CAP diagnostic in military personnel PCR is a highly effective method, especially during periods of high morbidity. The high level of *S. pneumoniae* carriage among military personnel and its dominant role in the etiologic structure of the CAP indicate the need for specific immunization of new recruits. The significant contribution of *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae* to the incidence of CAP confirm the advisability of their inclusion in the algorithm for the examination of patients with CAP. The high frequency of association of microorganisms indicates the need to take this fact into account when prescribing antibiotic therapy.

Key words: community-acquired pneumonia, military personnel, *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *C. psittaci*, *Adenovirus*, *Herpesviruses*, PCR.

**For citation:** Speranskaya E. V., Brusnigina N. F., Efimov E. I., Samokhina L. P. Experience of application of the PCR for identification of the causative agent of community acquired pneumonia in the military: *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (10): 641-645 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-641-645>

**For correspondence:** Speranskaya E. V., Candidate of Biological Sciences, Research Fellow of Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens, e-mail: [speranskaya.elena@bk.ru](mailto:speranskaya.elena@bk.ru)

**Information about authors:**

Speranskaya E. V. <http://orcid.org/0000-0002-4052-8286>

Brusnigina N. F. <http://orcid.org/0000-0003-4582-5623>

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

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

Received 25.05.2018  
Accepted 29.05.2018

**Введение.** Внебольничные пневмонии (ВП) являются актуальной проблемой современного здравоохранения как в индустриально развитых, так и развивающихся странах, т. к. остаются одной из ведущих причин заболеваемости, госпитализации, смертности [1-3]. По данным Европейского респираторного общества в странах Евросоюза общее число взрослых пациентов с ВП ежегодно превышает 3 млн человек. В США регистрируется 5-6 млн случаев ВП ежегодно, из которых более 1 млн. требуют госпитализации [1, 4, 5]. В 2016 г. согласно официальной статистике, в Российской Федерации отмечен рост заболеваемости ВП на 23,8% по сравнению с 2015 г., средний по стране показатель заболеваемости составил 418,3 на 100 тыс. населения. Очевидно, что эти цифры не отражают истинной заболеваемости пневмонией в России, которая согласно расчётам достигает 14-15%, а общее число больных ежегодно превышает 1,5 млн человек [1]. Особую проблему представляют ВП в воинских коллективах, где уровни заболеваемости превышают показатели среди гражданского населения в несколько раз. По данным медицинской службы МО РФ в 2009 и 2010 гг. заболеваемость пневмонией военнослужащих по призыву составляла 55,6 и 69,6% соответственно. В последующие годы регистрировалось последовательное снижение её уровня. Средний темп снижения заболеваемости составил 12,4% в год. К 2015 г. заболеваемость пневмонией снизилась до 29,9%, т. е. в 2,3 раза. Но и эти показатели по сравнению с заболеваемостью пневмонией офицерского состава и гражданского населения безусловно высоки [6].

ВП может быть вызвана различными видами бактерий и вирусов. Наряду с традиционными этиологическими агентами (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и т. д.) большую роль в этиологии ВП приобретают так называемые «атипичные», труднокультивируемые патогены, такие как *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* [1,7].

Цель работы - индикация возбудителей ВП у военнослужащих по призыву с использованием метода ПЦР.

**Материал и методы.** Обследовано 255 больных ВП военнослужащих по призыву, находящихся на стационарном лечении в пульмонологическом отделении военного госпиталя (г. Нижний Новгород) с рентгенологически подтверждённым диагнозом ВП. В исследование включались только лица мужского пола в возрасте 18-22 лет без сопутствующих хронических заболеваний, проживающие в условиях организованных коллективов. В группу сравнения входили 270 практически здоровых новобранцев учебного центра Сертолово, которые не имели клинических признаков воспалительных заболе-

ваний респираторного тракта на момент обследования и в течение предыдущего месяца. Все обследованные не были иммунизированы пневмококковой вакциной. Все пациенты и лица группы сравнения обследованы на инфицированность возбудителями инфекций респираторного тракта, как типичными (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*), так и «атипичными» (*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*), аденовирусами и герпесвирусами (*Herpes simplex I/II*, *Cytomegalovirus*).

Материалом для исследования у больных служили образцы мокроты, крови, мазки из ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ); у здоровых - мазки из ротоглотки. Пробы биологических субстратов отбирали у больных до начала антибактериальной терапии. ПЦР-детекцию патогенов проводили как в отдельных субстратах, так и в смеси субстратов от одного пациента (патент на изобретение № 2406088 от 10.12.2010 г. «Способ выявления редких и труднокультивируемых форм возбудителей воспалительных заболеваний органов дыхания (*Cytomegalovirus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*) с использованием метода ПЦР»). Субстраты, собранные от одного пациента, смешивали в равных количествах таким образом, чтобы объём смеси составил 100 мкл, что является рекомендуемым объёмом материала при выделении ДНК с использованием набора реагентов «ДНК-Сорб В» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

ПЦР детекцию *M. pneumoniae*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex I/II*, *Adenovirus* проводили с помощью наборов реагентов «АмплиСенс *Mycoplasma pneumoniae*-EPh», «АмплиСенс *CMV*-EPh», «АмплиСенс *HSV1, II*-EPh», «АмплиСенс *Adenovirus*-EPh» производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора согласно инструкциям по их применению.

ПЦР детекцию *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* проводили с помощью наборов реагентов GenPak DNA PCR test производства ООО «Изоген» (г. Москва) согласно инструкциям по их применению.

Достоверность различий определяли общепринятым методом расчёта ошибки среднего ( $m$ ) и показателя существенности и вероятности ( $t$ ) по Стьюденту. Обработку данных выполняли с использованием программ Microsoft office (Excel), пакета статистических программ Statz, Statistica 6,0.

**Результаты и обсуждение.** Анализ историй болезни 255 военнослужащих с ВП, взятых в исследование, показал, что у 57 больных (22,4%) диагностирована тяжёлая ВП, у 198 (77,6%) - ВП нетяжёлого течения. У 40,6%

Таблица 1

**Частота выявления инфекционных агентов у военнослужащих с ВП (M±m(%))**

Возбудитель	У больных ВП (n=255)		В группе сравнения (n=270)	
	абс.	M±m(%)	абс.	M±m(%)
<i>S. pneumoniae</i>	223	87,5±2,1	233	86,3±2,1
<i>H. influenzae</i>	110	43,1±3,1	133	49,3±3,0
<i>M. pneumoniae</i>	37	14,5±2,2	0	0
<i>C. pneumoniae</i>	35	13,7±2,2	0	0
<i>C. psittaci</i>	1	0,4±0,4	0	0
<i>L. pneumophila</i>	2	0,8±0,6	0	0
<i>Adenovirus</i>	37	14,5±2,2	0	0
<i>CMV</i>	15	5,9±1,5	6	2,2±0,9
<i>HSV I/II</i>	41	16,1±2,3	10	3,7±1,1
Не выявлено	15	5,9±1,5	22	8,1±1,7

Таблица 2

**Частота выявления возбудителей ВП у военнослужащих в зависимости от степени тяжести заболевания (M±m(%))**

Возбудитель	частота выявления (в %) при			
	нетяжелой ВП (n=198)		тяжелой ВП (n=57)	
	абс.	%	абс.	%
<i>S. pneumoniae</i>	169	85,4±2,5	54	94,7±3,0
<i>H. influenzae</i>	78	39,4±1,7	32	56,1±6,6
<i>M. pneumoniae</i>	33	16,7±2,7	4	7,0±3,4
<i>C. pneumoniae</i>	32	16,2±2,6	3	5,3±3,0
<i>C. psittaci</i>	1	0,5±0,5	0	0
<i>L. pneumophila</i>	0	0	2	3,5±2,4
<i>Adenovirus</i>	16	8,1±1,3	21	36,8±6,4
<i>CMV</i>	11	5,6±1,6	4	7,0±3,4
<i>HSV I/II</i>	27	13,6±2,4	14	24,6±5,7
не выявлено	13	6,6±1,8	2	3,5±2,4

больных с тяжелой ВП наблюдались осложнения в виде токсической нефропатии (18,8%), парапневмонического экссудативного плеврита (15,6%), инфекционно-токсического шока I степени (12,5%). Сроки от начала заболевания до поступления в госпиталь колебались в пределах от 1 до 13 дней. Длительность госпитализации определялась тяжестью течения, быстротой разрешения очага воспаления в легких, наличием осложнений заболевания. Длительность госпитализации пациентов с тяжелой ВП составила 23±5 дня, с нетяжелой ВП — 15±2 дня. Всем больным проводилось следующее лечение: антибактериальная терапия, муколитики, симптоматическая терапия, физиолечение, по показаниям бронходилататоры.

Частота выявления традиционных возбудителей (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*) в различных биологических субстратах (мокрота, мазки из ротоглотки, БАЛ) у больных, и в мазках из ротоглотки практически здоровых новобранцев статистически не отличалась (табл. 1). *S. pneumoniae* обнаружен у 86,7±2,4% больных и 86,3±2,1% здоровых, *H. influenzae* - у 42,4±3,1% и 49,3±3,0% соответственно. Данные микроорганизмы являются условно-патогенными и часто колонизируют верхние дыхательные пути у людей в норме. Для определения их этиологической роли в развитии инфекции необходимо не только регистрировать наличие данных возбудителей, но и определять их количественное содержание в биологическом субстрате (культуральный метод, Real time PCR), проводить серологические исследования (определение сероконверсии антител классов IgG и IgM в парных сыворотках). Доказательством этиологической роли *S. pneumoniae* и *H. influenzae* является присутствие их в крови (бактериемия), обнаружение их в биологических субстратах (мокроте, БАЛ и др.) в клинически значимых концентрациях (10<sup>5</sup> КОЕ/мл и более), и/или сероконверсия специфических антител в парных сыворотках в 4 раза [7].

У пациентов в пробах мокроты, БАЛ, мазках из ротоглотки *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* выявлены в 14,5±2,2% и 13,7±2,2% случаев соответственно. В группе здоровых новобранцев данные инфекционные агенты не обнаружены. Полученные результаты свидетельствуют о существенном вкладе данных патогенов в этиологическую структуру ВП и подтверждают целесообразность их включения в алгоритм обследования пациентов с ВП.

*C. psittaci* обнаружена у одного военнослужащего с ВП, *L. pneumophila* - у двух пациентов. У лиц группы сравнения данные возбудители не выявлены.

Роль вирусов как этиологических агентов ВП дискутируется исследователями [1, 8-10]. Вирусные респираторные инфекции рассматриваются в качестве ведущего фактора риска развития ВП. Некоторые пневмотропные вирусы (аденовирусы, РС-вирусы, SARS-коронавирусы, метапневмовирусы) оказывают прямое цитопатическое действие, вызывая некроз альвеолоцитов и эпителии бронхов [1,9]. В нашем исследовании частота обнаружения аденовирусов составила 14,1±2,2%, тогда как у лиц группы сравнения аденовирусы не выявлены.

У больных ВП наблюдалась высокая (16,1±2,3%) частота выявления *HSV I/II* по сравнению с группой сравнения ( $p<0,01$ ). Показатель частоты обнаружения *CMV* у больных невысокий и составил 5,9±1,5%, однако он статистически превышал аналогичный показатель у здоровых ( $p<0,01$ ). Герпесвирусы вызывают заболевания ор-

ганов дыхания, как правило, у лиц с иммунодефицитами [11]. В группу особого риска входят лица, перенесшие пересадку органов, ВИЧ-инфицированные, онкологические больные, беременные женщины вследствие развития у них физиологической иммуносупрессии, недоношенные и маловесные дети. Поскольку обследованные нами военнослужащие не относились к выше перечисленным контингентам, можно предположить, что репликация герпесвирусов, уже имеющихся в организме и пребывающих в латентной фазе, начинается на фоне ослабления иммунной системы в результате ВП.

Данные о частоте обнаружения возбудителей ВП у военнослужащих в зависимости от степени тяжести заболевания приведены в табл. 2. Традиционные бактериальные возбудители ВП (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*) достоверно чаще выявлялись у больных тяжелой ВП - в 94,7±3,0 и 39,4±1,7% случаев соответственно, тогда как в группе больных нетяжелой ВП аналогичные показатели составили 85,4±2,5% и 39,4±1,7% ( $p<0,05$ ).

Частота выявления *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* в пробах мокроты, мазках из ротоглотки, БАЛ максимальна в группе больных нетяжелой ВП и составляет 16,7±2,7 и 16,2±2,6% соответственно, достоверно превышая данные показатели у пациентов с тяжелой ВП, которые составили 7,0±3,4 и 5,3±3,0% соответственно ( $p<0,05$ ).

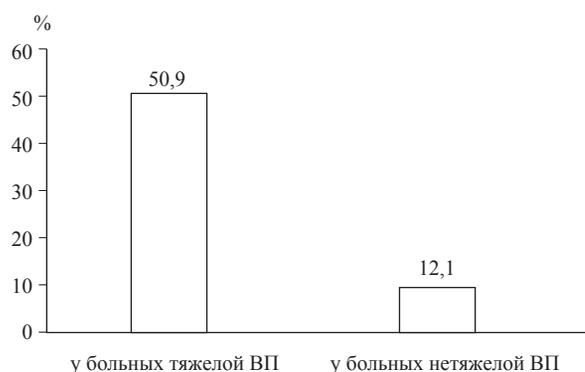


Рис. 1. Частота выявления *S. pneumoniae* в образцах крови больных ВП в зависимости от степени тяжести ВП (в %) (различия между группами больных ВП достоверны при  $p < 0,001$ ).

*L. pneumophila* обнаружена у  $3,5 \pm 2,4\%$  больных тяжелой ВП. В группе больных нетяжелой ВП данный возбудитель не обнаружен. *C. psittaci* выявлена у одного больного нетяжелой ВП.

Высока частота обнаружения аденовирусов в группе пациентов с тяжелой ВП -  $36,8 \pm 6,4\%$  случаев, тогда как в группе больных нетяжелой ВП аденовирус выявлялся значительно реже - в  $8,1 \pm 1,3\%$  случаев ( $p < 0,001$ ).

Частота выявления вирусов простого герпеса оказалась наибольшей у больных тяжелой ВП и составила  $24,6 \pm 5,7\%$ . Аналогичный показатель у больных нетяжелой ВП ниже -  $13,6 \pm 2,4\%$ , однако статистически не отличался от такового в группе больных с тяжелой ВП ( $p > 0,05$ ). Показатели частоты обнаружения цитомегаловируса в обеих группах больных существенно не отличались и варьировали от  $5,6 \pm 1,6\%$  у больных нетяжелой ВП до  $7,0 \pm 3,4\%$  у больных тяжелой ВП. Полученные данные свидетельствуют, что присутствие в организме больного герпесвирусов не оказывает влияния на тяжесть течения ВП, являясь косвенным признаком иммуносупрессии.

Наличие в крови того или иного инфекционного агента, особенно условно-патогенных бактерий, к которым относятся традиционные возбудители ВП, служит доказательством этиологической роли данного возбудителя. В нашем исследовании установлено, что частота обнаружения *S. pneumoniae* в крови составила  $18,6 \pm 2,6\%$ . *H. influenzae* в пробах крови не обнаружена. Частота выявления ДНК *S. pneumoniae* в пробах крови у больных тяжелой ВП составила  $50,9 \pm 6,6\%$ , тогда как в группе больных нетяжелой ВП данный показатель не превышал  $12,1 \pm 2,3\%$  ( $p < 0,001$ ) (рис. 1), что согласуется с данными литературы о том, что пневмония, вызванная *S. pneumoniae*, как правило, протекает тяжело, сопровождается лихорадкой и осложнениями [12,13].

«Атипичные» возбудители (*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *L. pneumophila*) в крови не обнаружены. Находки вирусов в крови больных ВП были единичными. *HSV I/II* и *CMV* обнаружены в двух пробах крови больных ВП

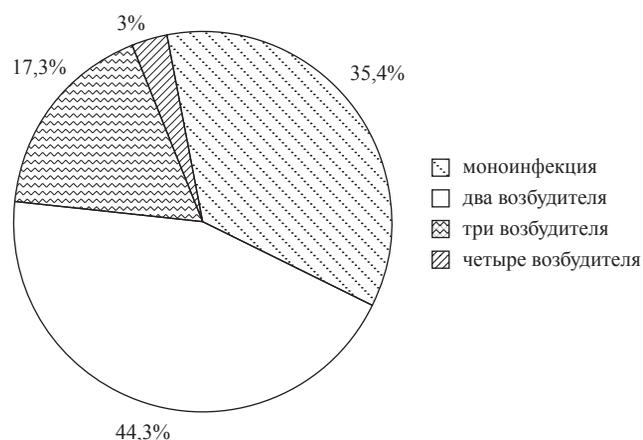


Рис. 2. Структура смешанного инфицирования больных ВП военнослужащих ( $n=237$ ).

легкой степени тяжести, *Adenovirus* - у одного больного тяжелой ВП.

Следует отметить высокую частоту смешанного инфицирования у больных ВП. Микст-инфицирование выявлено у 153 больных из 237 этиологически расшифрованных случаев, что составило  $64,6\%$ . Моноинфицирование выявлено у  $35,4\%$  больных (табл. 3 и рис. 2).

Таблица 3

Частота моно- и смешанного инфицирования военнослужащих, больных ВП ( $n=237$ )

	Число случаев	%
Моноинфекция		
<i>S. pneumoniae</i>	73	30,8
<i>H. influenzae</i>	3	1,3
<i>C. pneumoniae</i>	1	0,4
<i>M. pneumoniae</i>	6	2,5
<i>Adenovirus</i>	1	0,4
Микст-инфекция, вызванная двумя возбудителями		
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i>	64	27,0
<i>S. pneumoniae</i> + <i>C. pneumoniae</i>	16	6,8
<i>S. pneumoniae</i> + <i>M. pneumoniae</i>	11	4,6
<i>S. pneumoniae</i> + <i>Adenovirus</i>	10	4,2
<i>M. pneumoniae</i> + <i>Adenovirus</i>	2	0,8
<i>H. influenzae</i> + <i>C. pneumoniae</i>	1	0,4
<i>S. pneumoniae</i> + <i>C. psittaci</i>	1	0,4
Микст-инфекция, вызванная тремя возбудителями		
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> + <i>C. pneumoniae</i>	12	5,1
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> + <i>M. pneumoniae</i>	10	4,2
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> + <i>Adenovirus</i>	12	5,1
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> + <i>L. pneumophila</i>	1	0,4
<i>S. pneumoniae</i> + <i>C. pneumoniae</i> + <i>Adenovirus</i>	2	0,8
<i>S. pneumoniae</i> + <i>M. pneumoniae</i> + <i>Adenovirus</i>	4	1,7
Микст-инфекция, вызванная четырьмя возбудителями		
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> + <i>M. pneumoniae</i> + <i>C. pneumoniae</i>	1	0,4
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> + <i>M. pneumoniae</i> + <i>Adenovirus</i>	3	1,3
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> + <i>C. pneumoniae</i> + <i>Adenovirus</i>	2	0,8
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i> + <i>L. pneumophila</i> + <i>Adenovirus</i>	1	0,4

Микст-инфекция, вызванная двумя возбудителями, зафиксирована у 44,3% больных, тремя возбудителями – у 17,3%, четырьмя – у 3%.

Моноинфекция, вызванная *S. pneumoniae*, у больных ВП наблюдалась в 30,8% случаев. Другие случаи моноинфекции, вызванные *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *Adenovirus*, встречались редко: от 0,4% до 2,5% случаев. Моноинфицирование «атипичными» возбудителями (*M. pneumoniae*, *S. pneumoniae*) наблюдалось только в группе больных нетяжелой ВП.

Микст-инфекция *S. pneumoniae*+*H. influenzae* выявлена у 27,0% больных ВП. Варианты ассоциаций традиционных (*S. pneumoniae* или *S. pneumoniae*+*H. influenzae*) и «атипичных» возбудителей – *M. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *C. psittaci* встречались с частотой от 0,4% до 6,8%. Бактериально-вирусные ассоциации, представленные сочетанием традиционных и «атипичных» бактерий с аденовирусом, встречались с частотой от 0,8% до 5,1%.

**Заключение.** Применение метода ПЦР для ранней этиологической диагностики ВП у организованных взрослых, является высокоэффективным методом, незаменимым при этиологической расшифровке ВП особенно в период эпидемического подъема заболеваемости. Пневмококки являются доминирующими микроорганизмами, вызывающими ВП. Частота выявления *S. pneumoniae* варьирует от 85,4±2,5% у больных нетяжелой ВП до 94,7±3,0% у больных тяжелой ВП. Установлена роль «атипичных» патогенов, таких как *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* в этиологической структуре ВП у военнослужащих. Наибольшие показатели частоты обнаружения *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae* получены в группе больных нетяжелой ВП (16,7±2,7 и 16,2±2,6% соответственно). Роль *L. pneumophila* в этиологической структуре ВП у военнослужащих незначительная. Частота выявления аденовирусов составляет 14,1±2,2% случаев среди всех обследованных и 36,8±6,4% у пациентов с тяжелой ВП, у лиц группы сравнения аденовирусы не обнаружены. Характерной особенностью этиологической структуры ВП у военнослужащих, является высокая частота смешанного инфицирования. Высокий уровень носительства *S. pneumoniae* (86,3%) у военнослужащих и его доминирующая роль в этиологической структуре ВП свидетельствуют о необходимости специфической иммунопрофилактики новобранцев.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–5, 8, 13 см. REFERENCES)

1. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Авдеев С.Н., Тюрин И.Е., Руднов В.А., Рачина С.А., Фесенко О.В. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015; 17(2):84-126.
6. Жоголев С.Д., Огарков П.И., Жоголев К.Д., Иванников Ю.Г., Шипицын К.С., Колесников В.В., Жарков Д.А. Эпидемиология и профилактика внебольничных пневмоний у военнослужащих. *Военно-медицинский журнал*. 2013; 334 (11): 55-60.

7. Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний. Методические указания: МУК 4.2.3115-13. Издание официальное. М.; 2013.
9. Зайцев А.А., Щеголев А.В. Диагностика и лечение тяжелых поражений легких при гриппе А(H1N1/09): практические рекомендации *Военно-медицинский журнал*. 2016; 337 (3): 39-46.
10. Круглякова Л.В., Нарышкина С.В. Тяжелая внебольничная пневмония: диагностика и лечение (Обзор литературы) *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2016; 59: 98-108.
11. Шахгильдян В.И. Клиническое значение, подходы к диагностике и лечению активной цитомегаловирусной инфекции у беременных и новорожденных. *Медицинский совет*. 2016; 12: 62-72.
12. Шубин И.В. Актуальность вакцинопрофилактики пневмококковой инфекции в организованных коллективах военнослужащих. *Вестник современной клинической медицины*. 2017; 10(1): 36-42.

#### REFERENCES

1. Chuchalin A.G., Sinopalnikov A.I., Kozlov R.S., Avdeev S.N., Tyurin I.E., Rudnov V.A., Ratchina S.A., Fesenko O.V. Clinical Guidelines on Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Severe Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Klinicheskaya microbiologiya i antimicrobnaya khimioterapiya*. 2015; 17 (2): 84-126. (in Russian)
2. Arnold F.W., Wiemken T.L., Peyrani P., Ramirez J.A., Brock G.N. Mortality differences among hospitalized patients with community-acquired pneumonia in three world regions: results from the Community-Acquired Pneumonia Organization (CAPO) International Cohort Study. *Respir. Med.* 2013, 107 (7): 1101-11.
3. Singanayagam A., Chalmers J.D., Welte T. Epidemiology of CAP in Europe. *Eur. Respir. Monogr.* 2014; 63: 1-12.
4. Nair G.B., Niederman M.S. Community-acquired pneumonia: an unfinished battle. *Med. Clin. North Am.* 2011; 95 (6): 1143-61.
5. Welte T., Torres A., Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax*. 2012; 67:71-9.
6. Zhogolev S.D., Ogarkov P.I., Zhogolev K.D., Ivannikov Yu.G., Shipitsin K.S., Kolesnikov V.V., Zharkov D.A. Epidemiology and prophylaxis of community-acquired pneumonia in servicemen. *Voенно-медицинский журнал*. 2013; 334 (11): 55-60. (in Russian)
7. Laboratornaya diagnostika vnebol'nichnykh pnevmoniy. Metodicheskie ukazaniya: MUK 4.2.3115-13 [Laboratory diagnostics of community-acquired pneumonias *Methodical recommendations 4.2.3115-13*]. Moscow; 2013. (in Russian)
8. Aliberti S., Kaye K.S. The changing microbiologic epidemiology of community-acquired pneumonia. *Postgrad. Med.* 2013; 125 (6): 31-42.
9. Zaitsev A.A., Shchegolev V.A. Diagnostics and treatment of severe lung injuries in influenza A(H1N1)/09: recommendations *Voенно-медицинский журнал*. 2016; 337 (3): 39-46. (in Russian)
10. Kruglyakova L.V., Naryshkina S.V. Severe community acquired pneumonia: diagnostics and treatment (Review) *Byulleten' Fiziologii i Patologii Dykhaniya* 2016; 59: 98-108. (in Russian)
11. Shakhgildyan V.I. Clinical value, approaches to diagnostics and therapy of active cytomegalovirus infection in pregnant women and newborns *Meditsinsky sovet (Medical Council)*. 2016; 12: 62-72. (in Russian)
12. Shubin I. The relevance of preventative vaccination against pneumococcal infection in organized groups of military personnel. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2017; 10(1): 36-42. (in Russian)
13. Rozenbaum M.H., Pechlivanoglou P., van der Werf T.S. The role of *Streptococcus pneumoniae* in community-acquired pneumonia among adults *Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.* 2013: 305-16.

Поступила 25.05.18

Принята к печати 29.05.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.252.55.83.1

Шамина О. В.<sup>1</sup>, Крыжановская О. А.<sup>1</sup>, Лазарева А. В.<sup>1</sup>, Поликарпова С. В.<sup>2</sup>, Карасёва О. В.<sup>3</sup>, Чеботарь И. В.<sup>1</sup>,  
Маянский Н. А.<sup>1</sup>

## СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К КОЛИСТИНУ У КАРБАПЕНЕМРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

<sup>1</sup>ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава РФ, 119991, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ГБУЗ «Городская клиническая больница № 15 им. О. М. Филатова» Департамента здравоохранения города Москвы, 111539, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ГБУЗ «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» Департамента здравоохранения города Москвы, 119180 Москва, Россия

*В последние годы из-за широкого распространения карбапенемаз среди штаммов *Klebsiella pneumoniae* всё чаще назначается антибиотик группы резерва - колистин. Определение чувствительности к данному противомикробному препарату в повседневной практике имеет ряд сложностей в связи с катионными свойствами молекулы и плохой диффузией в агар. В связи с этим рекомендуется использовать эталонный метод микроразведений (ММР) в бульоне для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) колистина.*

*Целью исследования являлось определение чувствительности к колистину выборки карбапенемрезистентных (карба-Р) штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от пациентов трёх стационаров г. Москвы 2012-2016 г. г., методом микроразведений (ММР) и сравнение полученных данных с эпилотметрическим методом (Е-тест) и баканализатором VITEK 2 Compact. Доля резистентных изолятов (МПК > 2 мг/л) составила 52%, 39%, 35% для указанных методов соответственно. Оба коммерческих метода продемонстрировали высокие уровни очень существенной ошибки (Very major error, VME): 26% для метода Е-тестов и 34% для VITEK 2 Compact. Значения категорического и полного согласия (Categorical agreement, CA; Essential agreement, EA) не превысили 90%. Единичная существенная ошибка (Major error, ME) выявлена для VITEK 2 Compact.*

*Результаты обоих коммерческих тестов для определения МПК колистина показали различия с результатами эталонного ММР. Клиническим лабораториям необходимо иметь в виду данные несоответствия и с осторожностью использовать Е-тесты и баканализатор VITEK 2 Compact при определении чувствительности к колистину.*

**Ключевые слова:** колистин; метод микроразведений в бульоне; Е-тест; Vitek 2; *Klebsiella pneumoniae*.

**Для цитирования:** Шамина О. В., Крыжановская О. А., Лазарева А. В., Поликарпова С. В., Карасёва О. В., Чеботарь И. В., Маянский Н. А. Сравнение методов определения устойчивости к колистину у карбапенемрезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63 (10): 646-650. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-646-650>

Shamina O. V.<sup>1</sup>, Kryzhanovskaya O. A.<sup>1</sup>, Lazareva A. V.<sup>1</sup>, Polikarpova S. V.<sup>2</sup>, Karaseva O. V.<sup>3</sup>, Chebotar I. V.<sup>1</sup>, Mayanskiy N. A.<sup>1</sup>

## THE COMPARISON OF METHODS FOR DETERMINATION OF COLISTIN SUSCEPTIBILITY IN CARBAPENEM-RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

<sup>1</sup>Federal state autonomous institution «National Medical Research Center for Children's Health» of the Russian Federation Ministry of Health, 119991, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>State Budgetary Healthcare Institution «Municipal Clinical Hospital № 15 named O.M. Filatov» Department of Health of Moscow, 111539, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>State Budgetary Healthcare Institution «Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology» Department of Health of Moscow, 119180, Moscow, Russia

*In recent years, because of carbapenemase spreading in *Klebsiella pneumoniae* strains, the antibiotic of reserve group, colistin, is increasingly prescribed. In vitro testing of colistin susceptibility in everyday practice has a number of difficulties due to the cationic properties of molecule and weak diffusion into agar. Therefore it is recommended to use the reference Broth Microdilution Method (BMD) for determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for colistin.*

*The purpose of the study was to determine susceptibility to colistin in 119 carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CRKp) which were isolated from the patients at three hospitals in Moscow in 2012-2016 by the broth microdilution method (BMD) and to compare these data with the ones obtained by epsilometer test (E-test) and VITEK 2 Compact. The proportion of resistant isolates (MIC > 2 mg/L) was 52%, 39%, 35% respectively. Both commercial methods demonstrated a high level of the very major error (VME) that was 26% for the E-test method and 34% for the VITEK 2 Compact. The values of categorical agreement and essential agreement (CA, EA) were less than 90%. A single major error (ME) was detected for the VITEK 2 Compact.*

*In conclusion, results of both commercial tests for determination of MIC for colistin showed differences with the results of the reference BMD. It is necessary for clinical laboratories to be aware about this discrepancy and to use E-tests and VITEK 2 Compact with caution to determine colistin susceptibility.*

**Key words:** colistin; broth microdilution method; E-test; Vitek 2; *Klebsiella pneumoniae*.

**For citation:** Shamina O.V., Kryzhanovskaya O.A., Lazareva A.V., Polikarpova S.V., Karaseva O.V., Chebotar I.V., Mayanskiy N.A. The comparison of methods for determination of colistin susceptibility in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018;63 (10): 646-650 (in Russ.)

DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-646-650>

**For correspondence:** *Shamina O.V.*, Junior Researcher of the Laboratory department; e-mail: [olga.shamina@inbox.ru](mailto:olga.shamina@inbox.ru)

**Information about authors:**

Shamina O.V., <https://orcid.org/0000-0003-4260-1229>

Lazareva A.V., <https://orcid.org/0000-0001-7149-5387>

Chebotaev I.V., <https://orcid.org/0000-0002-6691-2171>

Polikarpova S.V., <https://orcid.org/0000-0003-3201-0804>

Kryzhanovskaya O.A., <https://orcid.org/0000-0001-7242-3019>

Karaseva O.V., <https://orcid.org/0000-0001-9418-4418>

Mayanskiy N.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-5313>

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

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

Received 20.07.2018  
Accepted 30.07.2018

*Klebsiella pneumoniae* является наиболее клинически значимым микроорганизмом рода *Klebsiella*. Она чаще всего колонизирует желудочно-кишечный тракт, кожные покровы, носоглотку, может вызывать такие тяжёлые инфекционные процессы, как некротизирующая пневмония и гнойные абсцессы печени [1].

Частота выделения *K. pneumoniae* среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* из года в год сохраняет лидирующие позиции и составляет более 50% по данным многоцентровых исследований МАРАФОН [2; 3]. Результаты многоцентрового исследования «ЭРГИНИ» показали доминирование грамотрицательных микроорганизмов (57,6%) среди возбудителей нозокомиальных инфекций, выделенных у детей, из которых 12,1% приходилось на *K. pneumoniae* [4].

Американское десятилетнее исследование SMART, в котором с 2002 по 2011 г. изучалось распространение резистентности микроорганизмов к антибиотикам [5], и Сингапурское исследование 2013 г. Molton с соавт. [6], направленное на изучение распространённости микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), показали, что от 20 до 80% изолятов *K. pneumoniae* устойчивы к антибиотикам первой линии, включая цефалоспорины, фторхинолоны, аминогликозиды, что приводит к трудностям в выборе этиотропной терапии.

Серьёзной проблемой в лечении инфекционных заболеваний является распространение среди грамотрицательных микроорганизмов штаммов, продуцирующих карбапенемазы, смертность от которых достигает от 23% до 75% [4; 7]. В сообщении «Противомикробная резистентность: глобальный отчёт по эпиднадзору 2014» сделан вывод о том, что устойчивость *K. pneumoniae* к карбапенемам распространилась практически по всем регионам мира, а в некоторых странах данная группа антибиотиков не работает уже в более чем половине случаев нозокомиальных инфекций [8].

Группа полимиксинов, а именно колистин, вызывает значительный интерес в лечении заболеваний, вызванных карбапенемрезистентными (карба-Р) грамотрицательными бактериями, поскольку сохраняет активность в отношении данных возбудителей [9]. В связи с этим изучение чувствительности патогенов к данной группе антибиотиков имеет важное значение для рациональной терапии инфекционных заболеваний, особенно для госпитализированных пациентов [10; 11].

Важность корректного определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) колистина обусловлена необходимостью расчёта его дозировки. Это особенно важно для лечения пациентов с почечной недостаточностью, так как колистин обладает нефротоксичностью [12]. В зарубежных исследованиях сообщается, что не-

правильное назначение низких концентраций колистина может индуцировать переход чувствительных субпопуляций бактерий в категорию резистентных. По этой причине разработка надёжных методов определения чувствительности является одной из приоритетных задач [13; 14].

Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST) и Институт клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) рекомендуют метод микроразведений (ММР) в бульоне для определения МПК колистина [15; 16]. Из-за трудоёмкости метода во многих клинических лабораториях в повседневной практике для определения чувствительности к колистину используются другие методы: диско-диффузионный, автоматизированный (баканализаторы) и эпсилотрический (Е-тесты). Молекула полимиксинов обладает катионными свойствами и поэтому плохо диффундирует в агар, что может приводить к методологическим ошибкам в определении чувствительности и, как следствие, к назначению неадекватной антимикробной терапии [12].

Цель работы – определить чувствительность к колистину с помощью ММР и сравнить полученные данные с рутинными методами определения резистентности: Е-тестами и автоматическим баканализатором VITEK 2 Compact.

**Материал и методы.** В период с 2012 по 2016 г. была собрана коллекция карба-Р штаммов *K. pneumoniae* из двух детских и одного взрослого учреждений г. Москвы. Видовую идентификацию полученных микроорганизмов проводили на масс-спектрометре MALDI-ToF-MS Biotyper MicroFlex (Bruker, Германия) и баканализаторе VITEK 2 Compact (BioMérieux, Франция). Выделенные штаммы хранили при температуре -80° С.

Определение чувствительности к аминогликозидам (гентамицин, нетилмицин, амикацин), ципрофлоксацину, фосфомицину проводили на автоматизированном баканализаторе VITEK 2 Compact (BioMérieux). Для определения МПК к меропенему, имипенему использовали метод Е-тестов (BioMérieux) на среде Мюллера-Хинтона (Bio Rad, Франция). Результаты интерпретировали, руководствуясь оценочными критериями EUCAST [16].

МПК к колистину определяли методом Е-тестов (BioMérieux) на среде Мюллера-Хинтона (Bio Rad), в баканализаторе VITEK 2 Compact (BioMérieux) и с помощью ММР в бульоне в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации (ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010) в круглодонных 96-луночных планшетах. Согласно критериям EUCAST [16], пограничные значения МПК колистина для *K. pneumoniae* составляют: чувствительные  $\leq 2$  мг/л, резистентные  $> 2$  мг/л.

Для определения МПК с помощью ММР использовали

Формулы расчёта коэффициентов эффективности [17]

Коэффициент эффективности, %	Числитель	Знаменатель
Полное согласие (Essential agreement, EA)	Число изолятов с МПК, находящейся в пределах одного двукратного разведения от ММР	Всего изолятов
Категорийное согласие (Categorical agreement, CA)	Число изолятов с совпадающей интерпретацией результатов (совпадение резистентный с резистентным и чувствительный с чувствительным)	Всего изолятов
Существенная ошибка (Major error, ME)	Число изолятов, оцененных как резистентные тестируемым методом, но как чувствительные при помощи ММР	Число чувствительных штаммов, полученных с помощью ММР
Очень существенная ошибка (Very major error, VME)	Число изолятов, оцененных как чувствительные тестируемым методом, но как резистентные при помощи ММР	Число резистентных штаммов, полученных с помощью ММР

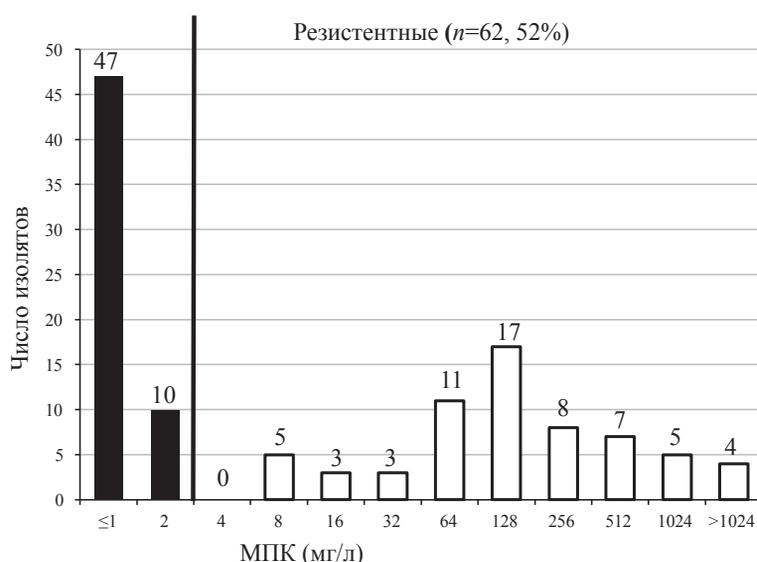


Рис. 1. Распределение МПК колистина карбапенем-резистентных штаммов *K. pneumoniae*, определенных методом микроразведений (ММР).

По оси абсцисс – минимальная подавляющая концентрация колистина (МПК), мг/л. По оси ординат – число изолятов *K. pneumoniae*.

субстанцию колистина в форме порошка (Sigma Aldrich, Германия). Для приготовления стокового раствора колистин растворяли в воде для инъекций до концентрации 25 мг/мл, полученные аликвоты хранили при -20° С. Основные растворы с концентрациями колистина 2048, 128, 8 мг/л готовили непосредственно перед тестированием путём добавления стокового раствора колистина (25 мг/мл) в бульон. Основные растворы доводили до рабочих концентраций 2-2048 мг/л путём добавления бульона и помещали в лунки планшета. Последние лунки в ряду использовали как положительный контроль роста для каждого проверяемого штамма, куда помещали бульон без антибиотика.

Инокулом с оптической плотностью 0,5 по стандарту McFarland готовили в бульоне с использованием суточной культуры *K. pneumoniae*, выращенной при 37° С на неселективной среде с добавлением 5% крови. Полученный инокулом разводили бульоном в соотношении 1:100 до концентрации 1x10<sup>6</sup> КОЕ/мл и вносили по 50 мкл в лунки планшета, содержащего 50 мкл рабочего раствора колистина. Окончательная концентрация бактерий составила 5x10<sup>5</sup> КОЕ/мл, рабочие концентрации антибиотика находились в диапазоне от 1 до 1024 мг/л.

Планшеты инкубировали при 37° С в течение 18±2 ч. Результаты учитывали при наличии достаточного роста микроорганизма в положительном контроле (явное пятно на дне лунки и помутнение бульона), используя камеру для визуального считывания результатов Sensititre Manual Viewer. Размер роста в каждой лунке сравнивали с размером роста в положительном контроле и наиболее низкую концентрацию антибиотика, которая полностью подавляла видимый рост, регистрировали как МПК. Для контроля использовали штамм *Escherichia coli* ATCC 25922. Значения МПК, полученные с помощью ММР, считали референсными.

Для сравнения ММР и методов Е-тестов и Vitek 2 Compact рассчитывали процент полного согласия (Essential agreement, EA), категорийного согласия (Categorical agreement, CA), очень существенной ошибки (Very major error, VME) и существенной ошибки (Major error, ME) при определении МПК колистина согласно [17]. Формулы расчёта данных коэффициентов представлены в табл. 1. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel.

**Результаты.** В исследование вошло 119 карба-Р штаммов *K. pneumoniae*. Для всех изолятов выполнено определение чувствительности к колистину методом Е-тестов, на баканализаторе VITEK 2 Compact и с помощью ММР в бульоне. Диапазон значений МПК, определённых с помощью ММР в бульоне представлен на рис. 1. Доля колистинрезистентных (колистин-Р) изолятов с МПК>2 мг/л составила 52% (n=62). Доля резистентных изолятов, полученная методом Е-тестов и Vitek 2 Compact, составила 39% (n=46) и 35% (n=42) соответственно (табл. 2).

Для определения эффективности тестируемых методов определения МПК к колистину по сравнению с референсным ММР рассчитаны значения EA, CA, ME, VME; результаты представлены в табл. 2. Значение EA и CA не превысили 90% для обоих тестируемых методов. Частота очень существенной ошибки (VME) высока как для Е-тестов (26%), так и для VITEK 2 Compact (34%). Единичная существенная ошибка (ME) была выявлена для VITEK 2 Compact (2%).

По сравнению с референсным ММР частота ошибок при определении МПК к колистину методом Е-тестов и с помощью Vitek 2 Compact оказалась выше приемлемой (допустимые значения: EA>89,9%, CA>89,9%, VME<1,5% [при значении EA<95%] или VME<7,5% [при значении EA>95%], ME < 3%) [17].

При оценке результатов определения МПК колистина

**Коэффициенты эффективности использования методов тестирования чувствительности к колистину по сравнению с референсным методом микроразведений (ММР)**

Метод	Число чувствительных изолятов, n (%)	Число резистентных изолятов, n (%)	EA <sup>1</sup> , n (%)	CA <sup>2</sup> , n (%)	ME <sup>3</sup> , n (%)	VME <sup>4</sup> , n (%)
ММР	57 (48%)	62 (52%)				
Е-тесты	73 (61%)	46 (39%)	86 (72%)	103 (87%)	0	16 (26%)
VITEK 2 Compact	77 (65%)	42 (35%)	95 (80%)	97 (82%)	1 (2%)	21 (34%)

Примечание. 1 – EA (Essential agreement) - полное согласие; 2 – CA (Categorical agreement) - категорийное согласие; 3 – ME (Major error) - существенная ошибка; 4 – VME (Very major error) - очень существенная ошибка.

с помощью ММР у некоторых штаммов наблюдался прерывистый рост: лунки с достаточным ростом (помутнение бульона и явное пятно на дне лунки) чередовались с лунками без роста (прозрачный бульон, нет пятна на дне лунки) (рис. 2, ряды В, С, D). Штаммам с одной пропущенной лункой присваивалось значение МПК по наименьшей концентрации антибиотика, которая тормозила видимый рост, как и для штаммов с ростом без пропуска. Восемь штаммов с двумя и более пропущенными лунка-

ми повторно исследовались с помощью ММР, получены идентичные результаты с прерывистым ростом. Для исключения вероятности контаминации из лунок с максимальной МПК (рис. 2, лунки В8, С5) произведен посев и идентификация микроорганизма. Во всех восьми случаях рост дала *K. pneumoniae*. При определении МПК к колистину с помощью ММР все эти высевные культуры *K. pneumoniae* дали непрерывный рост в диапазоне высоких МПК от 32 до 512 мг/л. Данным штаммам присвоено значение МПК, определенное при повторном тестировании.

Данные о спектре чувствительности исследованных 119 карба-Р изолятов *K. pneumoniae* к антибиотикам представлены в табл. 3. Все исследованные штаммы проявили 100% резистентность к цефалоспорином III и IV поколений. Доля штаммов, нечувствительных к ципрофлоксацину, составила 94%, к фосфомицину - 95%, к тигециклину – 28%. В группе аминогликозидов устойчивость варьировала от 56% для амикацина до 91% для гентамицина.

**Обсуждение.** В исследовании проанализирована коллекция из 119 карба-Р изолятов *K. pneumoniae* из двух детских и одного взрослого учреждений г. Москвы, собранная в течение 2012-2016 гг. Доля резистентных к колистину штаммов составила 52%. В многоцентровом исследовании МАРАФОН тестировали смешанную группу карбапенем-чувствительных и карбапенем-нечувствительных изолятов *K. pneumoniae*. Частота резистентных к колистину штаммов составила 7,9% [3]. По данным исследований К.Сheu [18] и L.Rojas [19] доля резистентных к колистину карба-Р изолятов *K. pneumoniae* составила 13 и 33% соответственно.

Мы сравнили методы Е-тестов и VITEK 2 Compact с эталонным ММР для определения МПК к колистину у карба-Р изолятов *K. pneumoniae*. Оба тестируемых метода существенно занижают истинную долю колистин-Р изолятов. Для метода Е-тестов рассчитан процент очень существенной ошибки (VME) равный 26%, при котором 16 штаммов оценены как чувствительные данным методом и как резистентные с помощью ММР: коэффициенты полного согласия (EA) и категорийного согласия (CA) составили 72 и 87% соответственно. Другие исследования также показали разногласие между референсным ММР и другими методами определения МПК к колистину. VME для Е-тестов составила 41,5% по данным К. Daforoulou 2015 г. [20], коэффициенты EA и CA составили 48,8 и 56,1% соответственно. Похожие результаты получены в исследовании L.Rojas [19] - значение VME составило 35%. Отличные от рекомендаций [17] значения коэффициентов эффективности получены при определении МПК к колистину с помощью анализатора VITEK 2 Compact. Недостаточные значения показателей полного согласия (EA) и категорийного согласия (CA) (80% и 82%), высокая частота очень существенной ошибки (VME) (34%)

Таблица 3

**Профиль чувствительности карбапенем-резистентных изолятов *K. pneumoniae***

Антибиотик	n	Критерий EUCAST (мг/л)		Доля резистентных изолятов, n (%)
		Ч ≤	Р >	
Тигециклин	79	1	2	20 (26%)
Гентамицин	119	2	4	108 (91%)
Нетилмицин	119	2	4	83 (70%)
Амикацин	119	8	16	66 (55%)
Ципрофлоксацин	118	0.5	1	110 (93%)
Фосфомицин	113	32	32	107 (95%)
Колистин (ММР)	119	2	2	62 (52%)

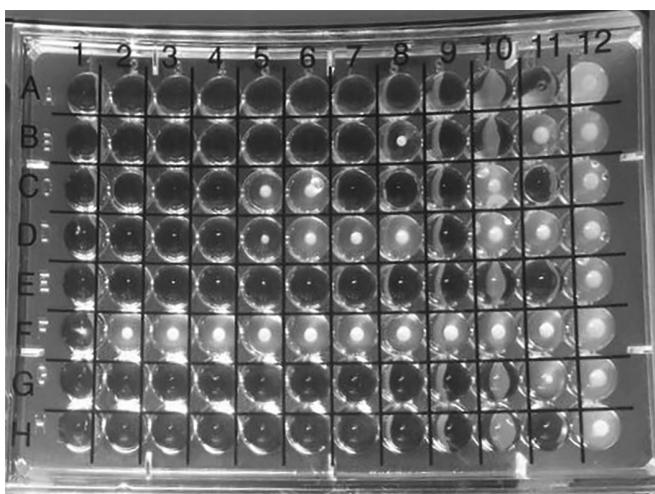


Рис. 2. Прерывистый и обычный рост карбапенем-резистентных штаммов *K. pneumoniae* при определении МПК к колистину методом микроразведений (ММР).

В каждом ряду лунки с 1 по 11 содержали двукратное разведение колистина в диапазоне от 1024 мг/л до 1 мг/л. Лунки 12 содержали бульон Мюллера-Хинтона без добавления антибиотика и использовались как положительный контроль роста для каждого штамма.

показали ненадежность данного метода для определения чувствительности к колистину. В зарубежной литературе этот метод не рекомендуют использовать для определения значений МПК к колистину [18, 21].

Определение чувствительности к колистину с помощью ММР в оптимальных условиях потребовало повторного тестирования у восьми штаммов *K. pneumoniae*. Трудности в определении МПК к колистину, а именно прерывистый рост культуры, описаны ранее [19, 22, 23]. Вероятно, это может быть связано с наличием гетерорезистентности к колистину у *K. pneumoniae* - феномена, описывающего вариабельность чувствительности к определенному антибиотику во внешне изогенной бактериальной популяции [12].

**Заключение.** В последние годы наблюдается рост устойчивости к колистину среди карба-Р штаммов *K. pneumoniae*, что ещё раз подчеркивает необходимость выбора правильного метода определения МПК. Наши результаты и приведённые данные литературы свидетельствуют о том, что ММР в бульоне является надежным методом для определения чувствительности к колистину, а значения МПК – наиболее достоверными.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 5—7, 9, 12—14, 18-23 см. REFERENCES)

2. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Дехнич А.В., и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» в 2011–2012 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014; 16(4): 254-65.
3. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Микотина А.В., Дехнич А.В., и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013–2014. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19(1): 49-56.
4. Суворова М.П., Белобородов В.Б., Яковлев С.В., Гаврилов М.М., Гришина Н.А., Дмитриева И.Б., и др. Нозокомиальные инфекции в педиатрических стационарах (исследование «ЭРГИНИ»). *Вопросы практической педиатрии*. 2016; 6: 8-16.
8. Данные с сайта Всемирной Организации Здравоохранения. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1) (дата обращения: июнь 2018 г.)
10. Агеев В.А., Партин И.В., Лисицына Е.С. Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп. *Антибиотики и химиотерапия*. 2013; 3-4: 10–3.
11. Крыжановская О.А., Лазарева А.В., Алябьева Н.М., Тепаев Р.Ф., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. и др. Устойчивость к антибиотикам и молекулярные механизмы резистентности у карбапенем-нечувствительных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в педиатрических ОРПТ г. Москвы. *Антибиотики и химиотерапия*. 2016; 61: 7-8.
15. Данные с сайта Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам. Available at: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/Recommendations\\_for\\_MIC\\_determination\\_of\\_colistin\\_March\\_2016.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf) (дата обращения: июнь 2018 г.)
16. Данные с сайта Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам. Available at: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints) (дата обращения: июнь 2018 г.)
17. Данные с сайта управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов. Available at: <https://www.fda.gov/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm080564.htm> (дата обращения: июнь 2018 г.)

#### REFERENCES

1. Pitout J., Nordmann P., Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59: 5873–84.

2. Suhorukova M.V., Ehjdelshstejn M.V., Skleenova E.YU., Ivanchik N.V., Timohova A.V., Dekhnic A.V. et al. Antibiotic resistance of nosocomial strains of Enterobacteriaceae in Russian hospitals: results of a multicentre epidemiological study “MARATHON” in 2011-2012. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2014; 16(4): 254-65. (in Russian)
3. Suhorukova M.V., Ehjdelshstejn M.V., Skleenova E.YU., Ivanchik N.V., Mikotina A.V., Dekhnic A.V. et al. Antibiotic resistance of nosocomial strains Enterobacteriaceae in Russian hospitals: results of a multicentre epidemiological study “MARATHON” 2013-2014. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2017; 19(1): 49-56. (in Russian)
4. Suvorova M.P., Beloborodov V.B., Yakovlev S.V., Gavrilov M.M., Grishina N.A., Dmitrieva I.B. et al. Nosocomial infections in pediatric hospitals (“ERGINI” study). *Voprosy prakticheskoy pediatrii*. 2016; 6: 8-16. (in Russian)
5. Morrissey I., Hackel M., Badal R., Bouchillon S., Hawser S., Biedenbach D. A Review of Ten Years of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) from 2002 to 2011. *Pharmaceuticals*. 2013; 6: 1335-46.
6. Molton J.S., Tambyah P.A., Brenda S.P. Ang., Ling M.L., Fisher D.A. The Global Spread of Healthcare-Associated Multidrug-Resistant Bacteria: A Perspective From Asia. *Clinical Infect Diseases*. 2013; 56: 1310-8.
7. Karaiskos I., Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother*. 2014; 15(10): 1351-70.
8. World Health Organization. Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance. Geneva, Switzerland. 2014. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1) (Reference date: June 2018)
9. Tumbarello M., Trearichi E.M., Giuseppe De Rosa F., Giannella M. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2015; 70: 2133–43.
10. Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S. Sensitivity of gram-negative bacteria, producers of carbapenemases, to antibiotics of various groups. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2013; 3-4: 10–3. (in Russian)
11. Kryzhanovskaya O.A., Lazareva A.V., Alyab'eva N.M., Tepaev R.F., CHEbotar' I.V., Mayanskiy N.A. et al. Resistance to antibiotics and molecular mechanisms of resistance in carbapenem-nonsusceptible isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated in the pediatric ICU of Moscow. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2016; 61: 7-8. (in Russian)
12. Poirel L., Jayol A., Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev*. 2017; 30: 557–96.
13. Poudyal A., Howden B.P., Bell J.M., Gao W., Owen R.J., Turnidge J.D. et al. In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62: 1311–8.
14. Meletis G., Tzampaz E., Sianou E., Tzavaras I., Sofianou D. Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66: 946–7.
15. Data from the website of the European Committee for Testing for Sensitivity to Antibiotics. Available at: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/Recommendations\\_for\\_MIC\\_determination\\_of\\_colistin\\_March\\_2016.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf) (Reference date: June 2018)
16. Data from the website of the European Committee for Testing for Sensitivity to Antibiotics. Available at: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints) (Reference date: June 2018)
17. Data from the website of the Food and Drug Administration. Document issued on: August 28, 2009. Available at: <https://www.fda.gov/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm080564.htm> (Reference date: June 2018)
18. Chew K.L., La M-V., Lin R.T.P., Teo J.W.P. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr positive *Enterobacteriaceae*: comparison of Sensiitre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *J. Clin. Microbiol*. 2017; 55: 2609–16.
19. Rojas L.J., Salim M., Cober E. et al. Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: laboratory detection and impact on mortality. *Clin Infect Dis*. 2017; 64: 711–8.
20. Dafopoulou K., Zarkotou O., Dimitroulia E., Hadjichristodoulou C., Gennimata V., Pournaras S. et al. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015. 59: 4625–30.
21. Vourli S., Dafopoulou K., Vrioni G., Tsakris A., Pournaras S. 2017. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother*. 2017; 72: 2528–30.
22. Hindler J.A., Humphries R.M. Colistin MIC Variability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *J. Clin. Microbiol*. 2013; 51: 1678-84.
23. Landman D., Salamera J., Quale J. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J. Clin. Microbiol*. 2013; 51: 4106–11.

Поступила 20.07.18

Принята к печати 30.07.18

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.841.11:579.25].083.3

Леденева М.Л., Ткаченко Г.А., Батурин А.А., Шпак И.М., Плеханова Н.Г.

### РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МЕЛИОИДОЗА И САПА НА ОСНОВЕ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АМПЛИФИКАЦИИ (NASBA) В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 400131, Волгоград, Россия

*Полиморфизм клинических проявлений мелиоидоза и сапа наряду с тяжёлым течением и высокой летальностью обуславливают необходимость совершенствования диагностических средств для обнаружения возбудителей данных заболеваний. Перспективность разработки диагностических наборов на основе реакции транскрипционной амплификации NASBA в режиме реального времени определяется высокой аналитической чувствительностью и возможностью осуществлять верификацию результатов других методов выявления патогенных буркхольдерий. Для разработки набора реагентов на основе технологии NASBA в реальном времени в качестве мишени амплификации выбран фрагмент гена 23S рРНК. Высокая специфичность сконструированных олигонуклеотидов экспериментально подтверждена при анализе широкого набора штаммов гетерологичных видов микроорганизмов и секвенированием нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов гена 23S рРНК. Аналитическая чувствительность разработанного набора реагентов позволила выявить *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei* в концентрации  $1 \times 10^1$  м.к./мл в анализируемой пробе. Показаны высокие функциональные характеристики разработанной системы при исследовании проб биологического материала и возможность её использования для решения вопросов, связанных с получением дискордантных результатов при обнаружении патогенных буркхольдерий.*

Ключевые слова: мелиоидоз; сап; диагностика; NASBA; детекция в реальном времени.

**Для цитирования:** Леденева М.Л., Ткаченко Г.А., Батурин А.А., Шпак И.М., Плеханова Н.Г. Разработка и применение набора реагентов для выявления РНК возбудителей мелиоидоза и сапа на основе транскрипционной амплификации (NASBA) в режиме реального времени. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 651-657. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-651-657>

Ledenyova M. L., Tkachenko G. A., Baturin A. A., Shpak I. M., Plekhanova N. G.

THE DEVELOPMENT AND APPLICATION OF REAGENTS KIT FOR DETECTION RNA OF THE CAUSATIVE AGENTS OF MELIOIDOSIS AND GLANDERS BY TRANSCRIPTION-BASED AMPLIFICATION (NASBA) IN REAL-TIME

Volgograd Anti-Plague Institute of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 40013, Volgograd, Russia

*The polymorphism of clinical manifestations of melioidosis and glanders and their high mortality require improvement of diagnostics for detection of this agents. The perspectivity of development of transcription-based amplification real-time NASBA diagnostic kits is determined by high analytical sensitivity and the opportunity to perform the verification of the results of other methods for pathogenic Burkholderia species detection. The fragment of 23S rRNA gene was selected as the target for development of real-time NASBA kit. The high specificity of the constructed oligonucleotides was confirmed during the analysis of wide range of heterologous strains of microorganisms and sequencing of amplified fragments of 23S rRNA gene. The analytical sensitivity of the developed kit allowed to detect Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei in concentration of  $1 \times 10^1$  microbial cells per ml. The high functional characteristics of developed kit as well as the possibility to use it in case of appearance of discordant result during the detection of pathogenic Burkholderia species were demonstrated while studying biological samples.*

Key words: melioidosis; glanders; diagnosis; NASBA; real-time detection.

**For citation:** Ledenyova M.L., Tkachenko G.A., Baturin A.A., Shpak I.M., Plekhanova N.G. The development and application of reagents kit for detection RNA of the causative agents of melioidosis and glanders by transcription-based amplification (NASBA) in real-time. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63 (10): 651-657 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-651-657>

**For correspondence:** Ledenyova M.L., researcher of the department of genodiagnostics; e-mail: [volresin@yandex.ru](mailto:volresin@yandex.ru)

**Information about authors:**

Ledenyova M. L., <https://orcid.org/0000-0001-5923-4774>

Tkachenko G. A., <http://orcid.org/0000-0003-0199-3342>

Baturin A. A., <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>

Shpak I. M., <http://orcid.org/0000-0001-6446-0274>

Plekhanova N. G. <http://orcid.org/0000-0002-2471-8776>

Для корреспонденции: Леденева Маргарита Леонтьевна, науч. сотрудник лаб. генодиагностики; e-mail: [volresin@yandex.ru](mailto:volresin@yandex.ru)

**Acknowledgment.** *This work was supported by the Foundation for the promotion of innovations under the «UMNIK» program (№2542ГУ1/2014 and №6763ГУ2/2015) and by the scientific research «The application of isothermal amplification technologies to improve methods for pathogenic Burkholderia species detection» (cipher 089-2-17).*

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

Received 24.07.2018  
Accepted 20.09.2018

**Введение.** Патогенные буркхольдерии – возбудители мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) и сапа (*Burkholderia mallei*) – занимают особое место в клинической микробиологии, что связано с их способностью вызывать опасные тяжело протекающие инфекции человека и широкого круга видов животных [1–3]. *B. pseudomallei* и *B. mallei* относят ко второй группе патогенных для человека микроорганизмов и считают потенциальными агентами биотерроризма [4, 5].

Разнообразие симптомов мелиоидоза и сапа исключает возможность на основании клинических проявлений установить правильный диагноз, в связи с чем ведущая роль при определении этиологии этих заболеваний отводится лабораторной диагностике. Идентификация патогенных буркхольдерий остаётся трудной задачей [6–9].

С развитием методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) появились новые возможности для выявления возбудителей мелиоидоза и сапа. В последние годы в лабораторной диагностике различных инфекций помимо полимеразной цепной реакции (ПЦР) всё большее распространение получают методы детекции РНК, к которым относится основанная на транскрипции амплификация нуклеиновых кислот NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) [10–12]. NASBA протекает при фиксированной температуре (41°C) в течение 90–120 мин и основана на обнаружении фрагмента нуклеиновой кислоты с помощью 2 специфичных праймеров и совместной ферментативной активности трёх ферментов – AMV-ревертазы, РНКазы H *Escherichia coli*, РНК-полимеразы фага T7. При этом происходит экспоненциальная амплификация нуклеиновых кислот, главным образом одноцепочечной РНК, которая является удобной мишенью для гибридизационных методов детекции. Технология флуоресцентно-меченых зондов позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации непосредственно в процессе реакции в режиме реального времени, что существенно сокращает время анализа, снижает риск контаминации, увеличивает специфичность метода [13].

Транскрипционная амплификация NASBA с детекцией результатов в режиме реального времени – real-time NASBA (RT-NASBA) – является одним из наиболее чувствительных тестов, применяемых для диагностики различных инфекций, поскольку мишенью для исследования являются молекулы матричной РНК (мРНК) или рибосомальной РНК (рРНК) микроорганизмов, количество которых может достигать нескольких десятков тысяч на одну бактериальную клетку. Используемые в качестве мишени амплификации при проведении ПЦР даже многокопийные участки ДНК не превышают двух десятков на одну клетку. В связи с этим метод NASBA позволяет детектировать возбудителей в тех случаях, когда их количество очень мало и недостаточно для выявления методом ПЦР, обеспечивая даже при минимальной концентрации бактериальных клеток в пробе достаточно высокую концентрацию мишеней для амплификации. Это особенно актуаль-

но в случае латентной формы мелиоидоза, протекающей на фоне отсутствия клинических признаков заболевания [14].

Другим важным преимуществом реакции NASBA по сравнению с ПЦР является уникальная способность метода транскрипционной амплификации избирательно синтезировать специфическую последовательность РНК в присутствии идентичной последовательности ДНК, что позволяет оценивать наличие жизнеспособных микроорганизмов в образце в процессе и после терапии. Патогенные буркхольдерии в ходе лечения быстро приобретают резистентность к различным антибактериальным препаратам, нередко резистентность носит множественный характер [15, 16]. Разработка генодиагностической тест-системы на основе реакции транскрипционной амплификации NASBA позволит добиться высокой чувствительности при обнаружении *B. pseudomallei* и *B. mallei* и будет являться инструментом контроля эффективности проведённой терапии.

Цель работы – разработка набора реагентов на основе транскрипционной амплификации NASBA в режиме реального времени и оценка возможности его использования для обнаружения РНК возбудителей мелиоидоза и сапа при исследовании проб биологического материала.

**Материал и методы. Программы и базы данных.** Для выбора мишени амплификации использованы нуклеотидные последовательности, полученные из международной базы данных GenBank Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Множественное выравнивание и сравнительный анализ фрагментов генов осуществляли с помощью модуля MUSCLE программы Unipro UGENE 1.30. Дизайн олигонуклеотидов проводили с использованием программного обеспечения Primer3Plus и OLIGO 6.0. Вторичную структуру и термодинамические параметры разработанного зонда оценивали в онлайн-режиме с помощью сервера Mfold Web Server (<http://mfold.rna.albany.edu>). Специфичность выбранных олигонуклеотидов проверяли в режиме online с использованием поисковой системы BLAST Национального центра биотехнологической информации (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Штаммы микроорганизмов.** В работе использованы 20 штаммов *B. pseudomallei*, 14 штаммов *B. mallei* и 24 штамма гетерологичных микроорганизмов, включающих 12 штаммов *Burkholderia cepacia*, 5 штаммов *Burkholderia thailandensis*, по 1 штамму *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*. Набор штаммов получен из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Все исследуемые штаммы имели типичные культуральные, морфологические и биохимические свойства. Работу с культурами возбудителей проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп

патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

**Питательные среды и условия культивирования.** Штаммы *B. pseudomallei* и *B. mallei* выращивали на агаре Хоттингера с добавлением 5% глицерина при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 24–48 ч. Культивирование гетерологичных видов микроорганизмов проводили с использованием общепринятых требований в соответствии с видом [17].

**Экспериментальное заражение лабораторных животных.** Экспериментальное заражение выполняли на половозрелых золотистых хомячках массой 80–100 г, полученных из питомника ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Все манипуляции с животными, включая эвтаназию, выполняли в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, и требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР от 12.08.1977 № 755). Для моделирования мелиоидозной и сапной инфекций использовали штаммы *B. pseudomallei* С-141 и *B. mallei* 10230 соответственно. Заражение осуществляли подкожно суспензиями суточных агаровых культур в объёме 0,5 мл 0,15М NaCl в концентрации  $1 \times 10^3$  м.к./мл. В ходе эксперимента заражено по 4 золотистых хомячка каждым возбудителем. Биологический материал забирали на 4-е сутки от момента заражения. От каждого экспериментально заражённого животного получены кусочки внутренних органов (лимфатический узел, печень, селезёнка, лёгкое), кровь.

**Выделение нуклеиновых кислот.** Экстракцию нуклеиновых кислот проводили с использованием коммерческих наборов «АмплиПрайм РИБО-преп» (ООО «НекстБио», Москва) и «РИБО-золь-С» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкциями производителя.

**Определение концентрации РНК.** Измерение концентрации РНК проводили при помощи коммерческого набора Qubit<sup>TM</sup> RNA HS Assay Kit («Thermo Fisher Scientific Inc.»., Invitrogen, США) и флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США).

**Проведение real-time NASBA.** Для постановки транскрипционной амплификации NASBA в режиме реального времени отдельно готовили раствор ферментов и реакционную смесь. Раствор ферментов объёмом 2,7 мкл включал AMV-ревертазу («Promega», США), РНКазу *H. coli* («Thermo Scientific», США), РНК-полимеразу фага T7 («Thermo Scientific», США), бычий сывороточный альбумин («Fermentas», США). Реакционная смесь объёмом 12,3 мкл содержала все остальные компоненты реакции: Tris-HCl (pH 8,5), dNTP («Fermentas», США), NTP («Fermentas», США), MgCl<sub>2</sub> («Dialat Ltd», Россия), KCl («Sigma-Aldrich», Германия), DTT («Fermentas», США), ДМСО («AppliChem», Германия), праймеры и зонд (синтез ЗАО «Синтол», Россия).

В микроцентрифужные пробирки объёмом 0,2 мл вносили 12,3 мкл приготовленной реакционной смеси и 5 мкл экстракта РНК анализируемых образцов, после чего термостатировали в следующем режиме:  $65^\circ\text{C} - 5$  мин,  $41^\circ\text{C} - 5$  мин. По окончании инкубации добавляли раствор ферментов и устанавливали пробирки в амплификатор. В качестве отрицательного контрольного образца в реакционную смесь добавляли РНК-буфер. Изотермическую амплификацию проводили на приборе Rotor-Gene Q («QIAGEN GmbH», Германия) в следующем режиме:  $41^\circ\text{C} - 5$

мин, затем 95 циклов ( $41^\circ\text{C} - 60$  с) с детекцией интенсивности флуоресцентного сигнала по каналу Green.

В рамках апробации разработанного набора реагентов проводили сравнение с зарегистрированным набором реагентов на основе ПЦР-РВ «Амплиген Burk» (РЗН 2013/1227, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Проведение молекулярно-генетических исследований осуществляли в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

**Секвенирование продуктов амплификации.** Для подтверждения специфичности подобранных олигонуклеотидов полученные продукты амплификации секвенированы с использованием набора реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США) и автоматического генетического анализатора ABI 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

**Статистическая обработка результатов исследования.** Для сравнительного анализа эффективности разработанного набора реагентов на основе RT-NASBA с ПЦР-РВ и культуральным методом использован непараметрический критерий МакНемара с поправкой Йейтса. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$  [18].

**Результаты.** На основе изучения *in silico* структуры рибосомального кластера генов (*16S pPHK*, *23S pPHK*, *5S pPHK*) в составе секвенированных нуклеотидных последовательностей широкого спектра микроорганизмов, представленных в базе данных GenBank, для конструирования праймеров и флуоресцентно-меченого зонда с целью детекции патогенных буркхольдерий выбран ген *23S pPHK* (GenID: 3112968 (BPSLR08)). При выборе олигонуклеотидов руководствовались принципами высокой специфичности по отношению к гену-мишени, отсутствием неспецифических сайтов связывания, минимальными меж-, внутрипраймерными, самокомплементарными взаимодействиями и правилами, приведёнными в работе В. Deiman и соавт. [19].

Выбрана пара праймеров *Burk23SrRNA-T7-P1* и *Burk23SrRNA-P2*, длина нуклеотидной последовательности которых составила соответственно 53 и 19 нуклеотидов. При конструировании праймера *Burk23SrRNA-T7-P1* для формирования функционального промотора T7 РНК-полимеразы к 5'-концевому участку добавлена последовательность длиной 25 нуклеотидов. Между промоторной зоной праймера *Burk23SrRNA-T7-P1* и его участком, гибридизующимся с мишенью, дополнительно включены три пуриновых нуклеотида с целью улучшения амплификации. Расчётный размер фрагмента гена *23S pPHK*, фланкируемого предлагаемыми праймерами, составил 159 п.н. (табл. 1).

Для детекции продуктов реакции RT-NASBA сконструирован флуоресцентно-меченый зонд *Burk23SrRNA-MM* в формате «молекулярный маяк», потенциально способный гибридизоваться с амплифицированными мишенями 23S рРНК возбудителей мелиоидоза и сапа с образованием стабильных гибридов при температуре  $41^\circ\text{C}$ . В качестве флуоресцентной метки на 5'-конце зонд содержал флуорофор FAM (поглощение  $\lambda$  490 нм; флуоресценция  $\lambda$  520 нм), на 3'-конце – гаситель флуоресценции RTQ-1 с диапазоном гашения 470–570 нм (см. табл. 1).

Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды для RT-NASBA

Наименование праймеров/зонда	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Длина РНК-ампликона
Burk23SrRNA-T7-P1	5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACG GCT AAC AAT ACA AAT AAA GAG TA-3'	159 п.н.
Burk23SrRNA-P2	5'-CCT TTT GGG TCA TCC TAG A-3'	
Burk23SrRNA-MM	5'(FAM)-CCA CAC ATA GGT CTA GTG AGG CGT GTG G-(RTQ-1)3'	

Таблица 2

Состав рабочей смеси для проведения реакции NASBA в режиме реального времени

Компонент смеси*	Конечная концентрация компонента в смеси
Tris-HCl, pH 8,5 (1 М)	40 мМ
Раствор dNTP (25 мМ)	1 мМ
Раствор NTP (25 мМ)	2 мМ
Раствор MgCl <sub>2</sub> (100 мМ)	12 мМ
Раствор KCl (1 М)	87 мМ
Раствор DTT (100 мМ)	0,5 мМ
ДМСО (100%)	15% (v/v)
Праймер <i>Burk23SrRNA-T7-P1</i> (10 пмоль/мкл)	0,125 мкМ
Праймер <i>Burk23SrRNA-P2</i> (10 пмоль/мкл)	0,125 мкМ
Зонд <i>Burk23SrRNA-MM</i> (5 пмоль/мкл)	0,0625 мкМ
Бычий сывороточный альбумин (20 мг/мл)	2,1 мкг
Обратная транскриптаза вируса миелобластома птиц (10 ед. акт./мкл)	6,4 ед. акт.
РНКаза <i>H. coli</i> (0,2 ед. акт./мкл)	0,08 ед. акт.
РНК-полимераза фага T7 (20 ед. акт./мкл)	32 ед. акт.
Исследуемый образец РНК	5 мкл

Примечание. \* – в скобках указана концентрация исходного раствора реагента; ед. акт. – единицы активности.

Изотермичность реакции транскрипционной амплификации NASBA устраняет необходимость термочиклирования и экспериментального подбора оптимальной температуры для отжига праймеров. Изотер-

мичность процесса предъявляет высокие требования к составу реакционной смеси, обеспечивающей стабильность многокомпонентной ферментативной системы и предотвращающей образование нежелательных вторичных структур в РНК. Ключевым компонентом в составе реакционной смеси, определяющим специфичность взаимодействия разработанных олигонуклеотидов с РНК-мишенью, является концентрация хлорида калия. Экспериментально апробированы различные концентрации KCl в диапазоне 70–90 мМ, праймеров – 0,1–0,25 мкМ, зонда – 0,04–0,2 мкМ. Оптимизированный состав рабочей смеси объемом 20 мкл для проведения транскрипционной амплификации RT-NASBA приведен в табл. 2.

Для определения аналитической чувствительности разработанного набора реагентов исследованы серии 10-кратных разведений культур *B. pseudomallei* и *B. mallei* в концентрации от  $1 \times 10^0$  до  $1 \times 10^6$  м.к./мл (см. рисунок). Значение минимальной аналитической чувствительности реакции составило 0,4 фг/мкл тотальной РНК в образце, что соответствовало  $1 \times 10^1$  м.к./мл. При экспериментальном определении аналитической специфичности разработанного набора олигонуклеотидов использована панель, содержащая геномную РНК человека, лошади, золотистого хомячка, 24 штаммов гетерологичных микроорганизмов. Отрицательные результаты RT-NASBA с каждым из вышеперечисленных образцов позволили оценить специфичность набора по использованной выборке образцов как 100%. Выявлена специфическая амплификация разработанного набора реагентов со всеми исследованными штаммами *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

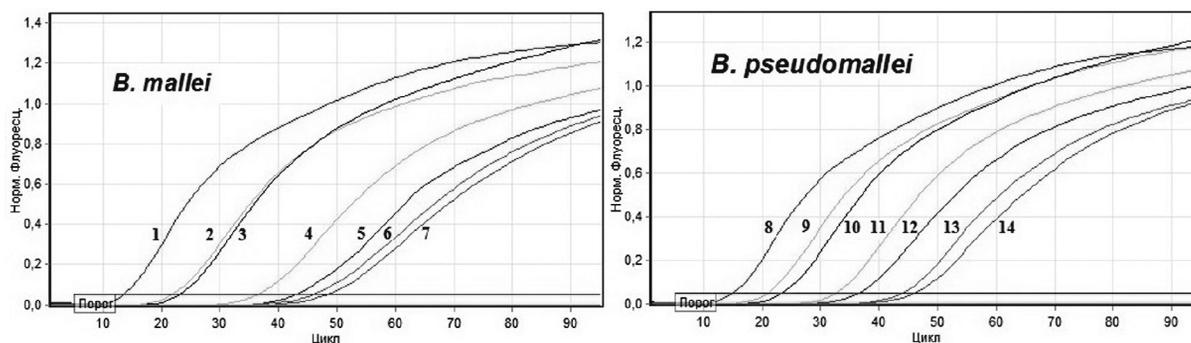


График нарастания кривых флуоресценции при амплификации РНК *B. mallei* и *B. pseudomallei*, полученных при определении чувствительности разработанного набора реагентов на основе реакции NASBA в режиме реального времени:

1 – *B. mallei* 10230 в концентрации  $1 \times 10^6$  м.к./мл, пороговый цикл Ct 13,51; 2 – *B. mallei* 10230 в концентрации  $1 \times 10^5$  м.к./мл, пороговый цикл Ct 21,81; 3 – *B. mallei* 10230 в концентрации  $1 \times 10^4$  м.к./мл, пороговый цикл Ct 23,14; 4 – *B. mallei* 10230 в концентрации  $1 \times 10^3$  м.к./мл, пороговый цикл Ct 36,48; 5 – *B. mallei* 10230 в концентрации  $1 \times 10^2$  м.к./мл, пороговый цикл Ct 42,78; 6 – *B. mallei* 10230 в концентрации  $0,5 \times 10^2$  м.к./мл, пороговый цикл Ct 45,84; 7 – *B. mallei* 10230 в концентрации  $1 \times 10^1$  м.к./мл, пороговый цикл Ct 48,14; 8 – *B. pseudomallei* C-141 в концентрации  $1 \times 10^6$  м.к./мл, пороговый цикл Ct 15,07; 9 – *B. pseudomallei* C-141 в концентрации  $1 \times 10^5$  м.к./мл, пороговый цикл Ct 20,92; 10 – *B. pseudomallei* C-141 в концентрации  $1 \times 10^4$  м.к./мл, пороговый цикл Ct 23,52; 11 – *B. pseudomallei* C-141 в концентрации  $1 \times 10^3$  м.к./мл, пороговый цикл Ct 32,63; 12 – *B. pseudomallei* C-141 в концентрации  $1 \times 10^2$  м.к./мл, пороговый цикл Ct 36,54; 13 – *B. pseudomallei* C-141 в концентрации  $0,5 \times 10^2$  м.к./мл, пороговый цикл Ct 43,93; 14 – *B. pseudomallei* C-141 в концентрации  $1 \times 10^1$  м.к./мл, пороговый цикл Ct 46,05

Таблица 3

**Сравнение трёх методов обнаружения *B. pseudomallei* и *B. mallei* у животных с острой формой инфекционного процесса**

Вид материала	Номер животного	<i>B. pseudomallei</i>			<i>B. mallei</i>		
		Бак. посев	ПЦР-РВ	RT-NASBA	Бак. посев	ПЦР-РВ	RT-NASBA
Лимфатический узел	1	+	+	+	-	-	+
	2	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+
	4	-	-	-	+	+	+
Печень	1	+	+	+	-	+	+
	2	+	+	+	+	+	+
	3	-	+	+	-	+	+
	4	+	+	+	+	+	+
Селезёнка	1	-	+	+	-	+	+
	2	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	-	+	+
	4	+	+	+	+	+	+
Лёгкое	1	+	+	+	-	+	+
	2	+	+	+	+	+	+
	3	-	+	+	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	+
Кровь	1	-	-	+	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	+
	3	-	-	+	-	-	-
	4	-	-	+	-	-	-

В дальнейшем для проверки специфичности продуктов, полученных в результате амплификации с разработанным набором реагентов, проведено их секвенирование. При последующем сравнении с последовательностями, представленными в генетической базе данных GenBank, установлена 100% гомология секвенированных продуктов амплификации с соответствующими участками геномов различных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

С целью оценки возможности применения разработанного набора реагентов для анализа клинических образцов исследован биологический материал, взятый от золотистых хомячков при экспериментальной инфекции. Параллельно материал исследован культуральным методом и ПЦР-РВ. Исследовано 32 пробы внутренних органов и 8 проб крови от экспериментально заражённых животных (табл. 3).

Совпадение положительных результатов всех трёх методов исследования – культурального, ПЦР-РВ и RT-NASBA – при анализе биологического материала от животных, достоверно свидетельствующее о наличии возбудителя в образце, выявлено в 13 пробах из 20 (65%) и 7 пробах из 20 (35%) при обнаружении *B. pseudomallei* и *B. mallei* соответственно. При совместном применении культурального метода и ПЦР-РВ дискордантные результаты при обнаружении возбудителей мелиоидоза и сапа составили 15% (1 проба печени, 1 проба селезёнки, 1 проба лёгкого) и 25% (2 пробы печени, 2 пробы селезёнки, 1 проба лёгкого) соответственно. Несовпадающие результаты при использовании этих методов исследования обусловлены положительными результатами ПЦР-РВ без выделения культуры патогенов. С помощью RT-NASBA анализ образцов, дискордантных по результатам культурального метода и ПЦР-РВ, позволил обнаружить РНК патогенных буркхольдерий во всех случаях несовпадаю-

щих результатов. Исследование проб биологического материала, в которых получены отрицательные результаты при проведении бактериологического посева и ПЦР-РВ, с использованием разработанного набора реагентов на основе RT-NASBA позволило выявить *B. pseudomallei* в 3 пробах крови и *B. mallei* в 3 пробах (1 проба лимфатического узла, 1 проба лёгкого и 1 проба крови).

При анализе материала от контрольной группы животных с помощью разработанного набора реагентов на основе технологии транскрипционной амплификации RT-NASBA, культурального метода и ПЦР-РВ результаты исследования всех проб были отрицательными.

При статистическом анализе выявлено, что ПЦР-РВ и RT-NASBA одинаково эффективны для выявления возбудителей мелиоидоза и сапа ( $\chi^2 = 2,083$ ;  $p = 0,149$ ). При сравнении результатов культурального метода и RT-NASBA большая эффективность обнаружения *B. pseudomallei* и *B. mallei* показана при использовании разработанного набора реагентов ( $\chi^2 = 5,042$  при  $p = 0,025$  и  $\chi^2 = 7,031$  при  $p = 0,009$  соответственно).

**Обсуждение.** В прокариотических клетках содержится порядка 20 тыс. молекул рРНК. Высокая представленность рРНК в клетке послужила основным критерием при выборе мишени амплификации для разработки набора реагентов на основе транскрипционной амплификации NASBA. Несмотря на высокую степень гомологии данного гена у представителей рода *Burkholderia*, вариабельность отдельных нуклеотидов в пределах гена 23S рРНК позволила сконструировать специфичные праймеры и флуоресцентно-меченый зонд для детекции продуктов амплификации в режиме реального времени. Разработанный набор реагентов показал высокую аналитическую чувствительность – до  $1 \times 10^1$  м.к./мл и 100% специфичность при исследовании чистых культур гетерологичных микроорганизмов. Специфичность выявления генетического материала возбудителей мелиоидоза и сапа подтверждена определением нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов гена 23S рРНК патогенных буркхольдерий.

Лабораторная диагностика мелиоидоза и сапа, направленная на выделение чистой культуры возбудителя с последующей её идентификацией, является достаточно сложной процедурой и позволяет получить положительный ответ лишь через 36–48 ч. Использование полуавтоматических систем при анализе чистых культур порой не позволяет правильно идентифицировать *B. pseudomallei* и *B. mallei* [20, 21]. Серологический метод даёт более быстрые результаты, но обладает относительно низкой чувствительностью и недостаточной специфичностью из-за возможных перекрёстных реакций с гетерологичными видами микроорганизмов и антигенной вариабельностью штаммов [22]. Диагностическая ценность серологического метода ограничена при выявлении патогенных буркхольдерий на ранних стадиях инфекционного процесса. Можно констатировать, что молекулярно-генетические технологии внесли значительный вклад в совершенствование средств диагностики мелиоидоза и сапа и упрочили значение ПЦР в качестве эффективного метода для экспресс-диагностики [23–25].

На российском рынке доступны наборы реагентов

для выявления патогенных буркхольдерий методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией («Амплиген Burk», РУ РЗН 2013/1227), электрофоретическим учётом результатов («Burk 23S-Eph», РУ № ФСР 2012/13066) и набор, предназначенный для выявления и дифференциации возбудителей бруцеллёза, сапа и мелиоидоза – ОМ-Скрин-Бру/Сап/Мелиоидоз-РВ (РУ № РЗН 2015/2697). Чувствительность указанных тест-систем согласно инструкциям производителей составляет не менее  $1 \times 10^3$  копий/мл. В рамках разработки и апробации установлено, что с помощью сконструированного набора реагентов на основе транскрипционной амплификации RT-NASBA можно обнаружить возбудитель в концентрации как минимум в 10 раз меньшей, чем существующие тест-системы на основе ПЦР.

Ни один из перечисленных методов диагностики не обладает абсолютной специфичностью и чувствительностью в диапазоне заявленных значений, что связано с возможностью возникновения ошибок на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах клинического лабораторного исследования. Даже в случае применения ПЦР унифицированные методы пробоподготовки и детектирования продуктов амплификации при полной автоматизации процесса не исключают возможности получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов, поскольку определение аналитических и диагностических характеристик проводится на ограниченном наборе штаммов микроорганизмов и проб биологического материала.

Выходом из сложившейся ситуации является комбинация методов, что, безусловно, повышает надёжность получаемого результата. Согласно рекомендациям Центра по контролю и профилактике заболеваемости (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, США), в связи с высокой аналитической чувствительностью амплификационных методов верификацию их результатов следует проводить на основе альтернативных МАНК-тестов. Предложены требования, которым должен соответствовать дополнительный метод для решения вопросов, связанных с дискордантными результатами: аналитическая чувствительность дополнительного метода должна быть сопоставима с исследуемым, должны использоваться другая мишень и принцип амплификации [26]. Одним из методов, соответствующих предложенным требованиям, является метод транскрипционной амплификации RT-NASBA.

Для определения функциональных характеристик и оценки возможности использования разработанного набора реагентов для решения вопросов, связанных с получением дискордантных результатов, исследованы пробы биологического материала от экспериментально заражённых животных. При совместном учёте результатов культурального метода и ПЦР-РВ патогенные буркхольдерии обнаружены в 20 пробах из 40 (50%), дискордантные результаты получены в 8 пробах из 40 (20%), отрицательные результаты обоих методов – в 12 пробах из 40 (30%). Дискордантность результатов во всех случаях связана с получением отрицательных результатов при проведении культурального метода исследования, что свидетельствует о большей эффективности ПЦР-РВ на ранних сроках инфекционного процесса. Дальнейший анализ с помощью RT-NASBA подтвердил наличие возбудителя во всех случаях выявленных дискордантных результатов. Большая чувствительность разработанного набора реагентов на основе транскрип-

ционной амплификации RT-NASBA позволила не только подтвердить наличие *B. pseudomallei* и *B. mallei* во всех случаях положительных и дискордантных результатов, но и обнаружить патогенные буркхольдерии в 6 пробах с отрицательными результатами бактериологического исследования и ПЦР-РВ. Выявляемость патогенных буркхольдерий с применением разработанного набора реагентов на основе RT-NASBA составила 85%. Сравнительный анализ обнаружения возбудителей мелиоидоза и сапа на ранних сроках инфекционного процесса при исследовании проб биологического материала от заражённых животных продемонстрировал, что реакция транскрипционной амплификации NASBA более эффективна, чем культуральный метод.

**Заключение.** Впервые в лабораторной практике для выявления РНК *B. pseudomallei* и *B. mallei* разработан набор реагентов на основе технологии транскрипционной амплификации RT-NASBA. Апробация разработанного набора реагентов продемонстрировала высокую чувствительность (до  $1 \times 10^1$  м.к./мл) и специфичность (100%) при исследовании культур микроорганизмов и проб биологического материала. Разработанный набор реагентов на основе реакции RT-NASBA как независимый высокочувствительный молекулярно-биологический метод может выступать в роли референсного теста и использоваться в лабораторной практике в спорных случаях, когда результаты других методов выявления патогенных буркхольдерий не совпадают.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» (№2542ГУ1/2014 и №6763ГУ2/2015) и в рамках НИИР «Применение технологий изотермической амплификации для совершенствования методов выявления патогенных буркхольдерий» (шифр 089-2-17).

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–3, 5–16, 19, 20, 22–26 см. REFERENCES)

4. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. *Вестник Российской академии наук*. 2003; 73 (3): 195–204.
17. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство*. 2-е изд., переработанное и дополненное. М.: ЗАО «Шико»; 2013.
18. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. М.: Медиа Сфера; 2003.
21. Лопастейская Я.А., Молчанова Е.В., Шаров Т.Н., Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Викторов Д.В. и др. Применение времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (8): 502–7.

## REFERENCES

1. Perumal Samy R., Stiles B.G., Sethi G., Lim L.H.K. Melioidosis: Clinical impact and public health threat in the tropics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11 (5): e0004738.
2. Princess I., Ebenezer R., Ramakrishnan N., Daniel A.K., Nandini S., Thirunarayan M.A. Melioidosis: An Emerging Infection with Fatal Outcomes. *Indian J. Crit. Care Med.* 2017; 21 (6): 397–400.
3. Van Zandt K.E., Greer M.T., Gelhaus H.C. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet J. of Rare Dis.* 2013; 8: 131–7.
4. Onishchenko G.G., Sandakhchiev L.S., Netesov S.V., Martynyuk R.A. Bioterrorism: a national and global threat. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk*. 2003; 73 (3): 195–204. (in Russian)

5. Cheng A.C., Dance D.A., Currie B.J. Bioterrorism, Glanders and melioidosis. *Euro Surveill.* 2005; 10 (3): E1–2.
6. Howard K., Inglis T.J.J. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin Microbiol.* 2003; 41 (7): 3312–6.
7. Glass M.B., Beesley C.A., Wilkins P.P., Hoffmaster A.R. Comparison of four selective media for the isolation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 80 (6): 1023–8.
8. Gilmore G., Barnes J., Ketheesan N., Norton R. Comparison of the use of *Burkholderia thailandensis*, *B. cepacia* and *B. pseudomallei* antigens in indirect haemagglutination assay for melioidosis. In: Abstracts of the 5th World Melioidosis Congress (21–23 november 2007), Thailand. 2007.
9. Sorenson A.E., Williams N.L., Morris J.L., Ketheesan N., Norton R.E., Schaeffer P.M. Improved diagnosis of melioidosis using a 2-dimensional immunoarray. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 77 (3): 209–15.
10. Fykse E.M., Skogan G., Davies W., Olsen J.S., Blatny J.M. Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73 (5): 1457–66.
11. Sidoti F., Bergallo M., Costa C., Cavallo R. Alternative molecular tests for virological diagnosis. *Mol. Biotechnol.* 2013; 53 (3): 352–62.
12. Maffert P., Reverchon S., Nasser W., Rozand C., Abaibou H. New nucleic acid testing devices to diagnose infectious diseases in resource-limited settings. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2017; 36 (10): 1717–31.
13. Fakruddin M., Mazumdar R.M., Chowdhury A., Mannan K.S.B. Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) – prospects and applications. *Int. J. Life Sci. Pharma. Res.* 2012; 2: 106–21.
14. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18 (2): 383–416.
15. Smith M.D., Wuthiekanun V., Walsh A.L., White N.J. In-vitro activity of carbapenem antibiotics against beta-lactam susceptible and resistant strains of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1996; 37 (3): 611–5.
16. Dance D. Treatment and prophylaxis of melioidosis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2014; 43 (4): 310–18.
17. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., eds. *Laboratory diagnosis of dangerous infectious diseases. Practical Guidance. [Laboratornaya diagnostika opasnykh infeksionnykh bolezney: Prakticheskoe rukovodstvo]*. 2nd ed. processed and added. Moscow: Shiko; 2013. (in Russian)
18. Rebrova O.Yu. Statistical analysis of medical data. *[Statisticheskii analiz meditsinskikh dannyykh]*. Moscow: Media Sphera; 2003. (in Russian)
19. Deiman B., van Aarle P., Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence based amplification (NASBA). *Mol. Biotech.* 2002; 20 (2): 163–79.
20. Karger A., Stock R., Ziller M., Elschner M.C., Bettin B., Melzer F et al. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing. *BMC Microbiol.* 2012; 12: 229.
21. Lopasteyskaya Ya.A., Molchanova E.V., Sharov T.N., Kuzyutina Yu.A., Zakharova I.B., Viktorov D.V. et al. The application of time-of-flight mass spectrometry with matrix activated laser desorption-ionization (MALDI-ToF) for identifying agents of glanders and melioidosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2016; 61 (8): 502–7. (in Russian)
22. Limmathurotsakul D., Peacock S.J. Melioidosis: a clinical overview. *Br. Med. Bull.* 2011; 99: 125-39.
23. Tomaso H., Pitt T.L., Landt O., Al Dahouk S., Scholz H.C., Reisinger E.C. et al. Rapid presumptive identification of *Burkholderia pseudomallei* with real-time PCR assays using fluorescent hybridization probes. *Mol. Cell Probes.* 2005; 19 (1): 9-20.
24. Meumann E.M., Novak R.T., Gal D., Kaestli M.E., Mayo M., Hanson J.P. et al. Clinical evaluation of a type III secretion system real-time PCR assay for diagnosing melioidosis. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44 (8): 3028-30.
25. Lowe C.W., Satterfield B.A., Nelson D.B., Thiriot J.D., Heder M.J., March J.K. et al. Quadruplex Real-Time PCR Assay for the Rapid Detection and Differentiation of the Most Relevant Members of the *B. pseudomallei* Complex: *B. mallei*, *B. pseudomallei*, and *B. thailandensis*. *PLoS ONE.* 2016; 11 (10): e0164006.
26. McAdam A.J. Discrepant analysis: how can we test a test? *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 (6): 2027-9.

Поступила 24.07.18

Принята к печати 20.09.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.23/.24-007.17-053.32:577.21.088

Межинский С.С.<sup>1</sup>, Шилова Н.А.<sup>1</sup>, Чаша Т.В.<sup>1</sup>, Фетисова И.Н.<sup>2,1</sup>, Харламова Н.В.<sup>1</sup>, Ратникова С.Ю.<sup>1</sup>, Фетисов Н.С.<sup>1,2</sup>

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ДЕТОКСИКАЦИИ У ГЛУБОКОНЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ С БРОНХОЛЁГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИЕЙ

<sup>1</sup>ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава РФ, 153045, Иваново;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, 153045, Иваново

*Статья посвящена сравнительному анализу полиморфизма генов системы детоксикации и риску формирования бронхолегочной дисплазии (БЛД) у недоношенных новорожденных с массой тела при рождении менее 1500 г и сроком гестации менее 32 нед, что формирует бронхолегочную дисплазию (БЛД). В нашем исследовании было 50 детей с БЛД и 47 детей без признаков БЛД. Установлена положительная ассоциация между присутствием в генотипе делеционных вариантов генов системы детоксикации - семейства глутатион-S-трансфераз M1 и T1 и риском формирования БЛД у недоношенных новорожденных.*

**Ключевые слова:** бронхолегочная дисплазия; генетический полиморфизм; недоношенные новорожденные.

**Для цитирования:** Межинский С.С., Шилова Н.А., Чаша Т.В., Фетисова И.Н., Харламова Н.В., Ратникова С.Ю., Фетисов Н.С. Полиморфизм генов системы детоксикации у глубоконедоношенных новорожденных с бронхолегочной дисплазией. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 658-660. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-658-660>.

*Mezhinskij S.S.<sup>1</sup>, Shilova N.A.<sup>1</sup>, Chasha T.V.<sup>1</sup>, Fetisova I.N.<sup>1,2</sup>, Kharlamova N.V.<sup>1</sup>, Ratnikova S.Yu.<sup>1</sup>, Fetisov N.S.<sup>1,2</sup>*

### THE POLYMORPHISM OF DETOXIFICATION SYSTEM GENES IN VERY PRETERM INFANTS WITH BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA

<sup>1</sup>Federal state budget institution "Ivanovo research Institute of maternity and childhood named after V. N. Gorodkov" of the Ministry of health of the Russian Federation. Russia, 153000, Ivanovo ;

<sup>2</sup>FGBOU VO "Ivanovo State Medical Academy" Ministry of Health of Russia, 153045, Ivanovo

*This article is devoted to the comparative analysis of polymorphism of genes of the detoxification system in premature newborns with birth weight less than 1500 g and gestational age less than 32 weeks, formed bronchopulmonary dysplasia (BPD) (n=50), and without signs of BPD (n=47). A positive association between the presence in the genotype of deletion variants of glutathione-S-transferases (GSTT1 and GSTM1) and risk of developing BPD in preterm infants.*

**Key words:** bronchopulmonary dysplasia; gene polymorphism; premature infants.

**For citation:** Mezhinskij S.S., Shilova N.A., Chasha T.V., Fetisova I.N., Kharlamova N.V., Ratnikova S.Yu., Fetisov N.S. The polymorphism of detoxification genes system genes in very preterm infants. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (10): 658-660. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-658-660>.

**For correspondence:** Mezhinskij S.S., anesthesiologist-resuscitator of neonatal intensive care; e-mail: semen.mezhinsky@yandex.ru

#### Information about authors:

Mezhinskij S.S., <https://orcid.org/0000-0003-4205-5547>

Chasha T.V., <http://orcid.org/0000-0002-3074-2094>

Kharlamova N. V., <http://orcid.org/0000-0003-2867-1693>

Ratnikova S. Y., <http://orcid.org/0000-0002-2398-7835>

Shilova N.A., <http://orcid.org/0000-0001-9623-2575>

Fetisova I. N., <http://orcid.org/0000-0002-5769-1645>

Fetisov N.S., <http://orcid.org/0000-0002-6455-477X>

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

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

Received 16.09.2018  
Accepted 28.10.2018

**Введение.** Бронхолегочная дисплазия (БЛД) (код в МКБ-Х Р27.0) является полиэтиологическим хроническим заболеванием морфологически незрелых лёгких, которое развивается у новорождённых, главным образом глубоконедоношенных детей в результате интенсивной терапии респираторного дистресс-синдрома (РДС) и/или пневмонии. Протекает с преимущественным поражением бронхиол и паренхимы лёгких, развитием эмфиземы, фиброза и/или нарушением репликации альвеол; проявляется зависимостью от кислоро-

да в возрасте 28 сут. жизни и старше, бронхообструктивным синдромом и симптомами дыхательной недостаточности; характеризуется специфическими рентгенографическими изменениями в первые месяцы жизни и регрессом клинических проявлений по мере роста ребёнка [1].

БЛД является типичным мультифакториальным заболеванием, развитие которого определено сложным взаимодействием множества генов и факторов внешней среды. В литературе широко обсуждают причастность полиморфизма генов системы детоксикации к повышенному риску развития разных заболеваний [2–5], в том числе бронхолегочной системы (хронический обструктивный бронхит, бронхоэктатическая болезнь, эмфизема лёгких, муковисцидоз). В организме человека процесс детоксикации включает две последователь-

**Для корреспонденции:** Межинский Семён Сергеевич, врач анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии новорождённых; e-mail: semen.mezhinsky@yandex.ru

ные фазы, 2-я из которых с помощью ферментов семейства глутатионтрансфераз (GST), превращает метаболиты ксенобиотиков в водорастворимые нетоксичные продукты и выводит их из организма. Глутатион-опосредованная детоксикация играет ключевую роль в обеспечении резистентности клеток к перекисному окислению липидов, свободным радикалам, алкилированию белков и предотвращению поломок ДНК. GST присутствуют в самых разных тканях, отмечаются выраженные межтканевые различия в отношении их разных классов. Особенно высока их концентрация в печени, плаценте, лёгких, мозге, кишечнике, почках [6]. Экспрессия GST начинается в эмбриональном периоде развития [7]. Наличие функционально неполноценных аллелей генов системы детоксикации (GST) приводит к повышенной чувствительности человека к действию повреждающих факторов и развитию разных заболеваний. Таким образом, определение особенностей полиморфизма генов системы детоксикации у недоношенных новорождённых представляет научно-практический интерес и способствует индивидуальному подходу к выбору тактики терапии дыхательных нарушений.

Цель исследования – определить особенности полиморфизма генов системы детоксикации (GSTT1 и GSTM1) у глубоконедоношенных новорожденных, сформировавших в исходе респираторной патологии БЛД.

**Материал и методы.** Проведено проспективное и ретроспективное комплексное клинико-лабораторное и инструментальное обследование 97 недоношенных новорождённых, у которых масса тела при рождении была менее 1500г. Все пациенты находились на лечении в ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России. Из обследованных детей 55 младенцев были с экстремально низкой массой тела при рождении (менее 1000 г), 42 - с очень низкой массой тела при рождении (менее 1500 г). Основную группу (группу наблюдения) составили дети с БЛД ( $n = 50$ ) – 1-я группа. Группа сравнения была сформирована из недоношенных младенцев аналогичного гестационного возраста и массы тела при рождении, но без формирования БЛД ( $n = 47$ ) – 2-я группа. Критерии включения: новорождённые дети со сроком гестации менее 32 нед, массой тела при рождении менее 1500 г, требующие проведения респираторной терапии. Критерии исключения: гестационный возраст более 32 нед, масса тела при рождении более 1500 г, отсутствие потребности в проведении респираторной терапии, врождённые пороки развития.

Молекулярно-генетическое исследование проведено на базе лаборатории клинической биохимии и генетики ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России. Выделение ДНК из лейкоцитов венозной крови выполняли с помощью набора реактивов DLAAtom DNA Prep100. Амплификацию всех исследуемых фрагментов ДНК проводили методом ПЦР на программируемом термоциклере MC2 фирмы «ДНК-технология» (Россия) в реакционной смеси объёмом 25 мкл. Для оценки результатов амплификации генов *GSTM1*, *GSTT1* использовали полимерный гель.

Статистическую обработку результатов провели с помощью пакета программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США) и OpenEpi 2.3 (Dean A., Sullivan K., Soe M., США). Анализ количественных показателей провели с учётом ненормального распределения признака: определялись медиана (Me) и интерквартильные размеры – UQ-LQ [25 – 75% процентиля]. Использовали непараметрические методы (критерии Манна-Уитни). Для оценки влияния отдельных факторов на риски развития заболевания провели расчёт отношения шансов (OR), скорректированного методом условной оценки максимального подобия, с 95% доверительным интервалом. Стати-

стическую достоверность определяли на основании двустороннего критерия Фишера.

**Результаты.** Анализ анамнеза матерей показал, что у большинства глубоконедоношенных новорожденных обеих групп матери имели отягощенный соматический, акушерско-гинекологический анамнез и отнесены нами к группе высокого риска по осложнённой течению беременности, развитию преждевременных родов и формированию перинатальной патологии плода. Все роды были преждевременными, до 32 нед гестации; третья часть родов осложнилась преждевременным разрывом плодных оболочек и длительным безводным промежутком. Большинство детей были рождены путём операции кесарева сечения. Различий по частоте экстрагенитальной, гинекологической патологии, осложнений беременности и родов в изучаемых группах не было. В группе детей с БЛД большинство женщин были старше 30 лет, а в группе выздоровевших пациентов возраст матерей значимо чаще был менее 30 лет ( $p = 0,013$ ). Антенатальная профилактика РДС кортикостероидами в полном объёме была проведена у большинства матерей новорождённых обеих групп. Неполный курс антенатальной профилактики или её отсутствие зарегистрированы у 32% матерей новорождённых 1-й группы и 46% – 2-й ( $p > 0,05$ ).

Оценка состояния детей при рождении показала, что все дети родились в тяжёлом состоянии, которое было обусловлено дыхательной недостаточностью, неврологической симптоматикой, степени перенесённой гипоксии и выраженной «незрелостью». Гестационный возраст (Me) у детей 1-й группы составил 28 [27–29] нед, а у детей 2-й группы – 30 [28–31] нед ( $p = 0,0000$ ). Масса тела при рождении (Me) у детей 1-й группы составила 959,5 [830,0 – 1100,0] г, у детей 2-й группы – 1278 [984,0 – 1400,0] г ( $p = 0,0000$ ). По половому признаку достоверных различий между группами не было.

Все новорождённые, включённые в исследование, имели дыхательные нарушения, представленные изолированным РДС (56,7%) и врождённой пневмонией (43,3%). Диагноз устанавливали на основании клинической картины, данных рентгенологического исследования органов грудной клетки и лабораторных данных соответственно клиническим рекомендациям [8]. В настоящем исследовании проведён анализ разных способов респираторной поддержки, их комбинаций и терапии кислородом, а также средней длительности респираторной терапии, осуществляемой в отделении реанимации и интенсивной терапии новорождённых. Установлено, что более чем в половине случаев у новорождённых с БЛД применяли комбинацию традиционной эндотрахеальной ИВЛ с управляемым давлением с другими видами респираторной поддержки, в то время как у пациентов без признаков БЛД эндотрахеальная вентиляция применялась достоверно реже (56,0 и 25,5%,  $p = 0,0021$ ). Средняя длительность респираторной поддержки в 1-й группе оказалась выше более чем в 4 раза и составила 210,0 [118,0–398,0] ч, а во 2-й группе – 53,0 [34,0–142,0] ч ( $p = 0,0000$ ).

Диагноз бронхолёгочной дисплазии, её формы и характер течения установлены согласно новой отечественной рабочей классификации клинических форм бронхолёгочных заболеваний у детей [9]. В качестве диагностических критериев использованы клинические и рентгенологические признаки. Основными клиническими критериями БЛД явились: а) потребность в эндотрахеальной вентиляции и/или неинвазивной респираторной поддержке (постоянное и переменное положительное давление в дыхательных путях) на первой неделе жизни; б) зависимость от кислорода в возрасте 28 дней и старше для поддержания уровня  $SpO_2 > 90\%$ ; в) синдром дыхательной недостаточности и г) бронхообструктивный синдром в возрасте 28 дней и старше. Рентгенологические критерии БЛД включали признаки интерстициального отё-

ка, чередующиеся с участками повышенной прозрачности лёгочной ткани, лентообразные уплотнения и фиброзные изменения. Среди пациентов с БЛД у 15 новорождённых сформировалась классическая форма заболевания, а у 35 – новая форма, у 18 пациентов диагностировано тяжёлое, а у 32 – среднетяжелое течение БЛД.

Анализ частот низкофункциональных аллелей в генах *GSTM1* и *GSTT1*, проведённый в изучаемых группах, позволяет говорить о возможной причастности вышеуказанных полиморфизмов к риску формирования хронической патологии респираторной системы у новорождённых. У детей с БЛД «нулевой» вариант гена *GSTM1* по сравнению с пациентами без БЛД отмечен чаще с высокой степенью достоверности (42,0 и 21,3 % соответственно,  $p = 0,032$ ,  $OR = 2,603$  (1,105–6,134)). Кроме того, анализ частоты встречаемости «нулевого» варианта гена *GSTT1* показал, что у детей 1-й группы встречаемость делеции в гене *GSTT1* по сравнению с детьми 2-й группы также достоверно выше и составляет 34,0 и 12,8% соответственно ( $p = 0,017$ ,  $OR = 3,335$  (1,276–8,717)). Учитывая, что одновременное наличие неблагоприятных полиморфных вариантов в нескольких генах, возможно, суммирует их негативное действие, мы оценили сочетанное распределение аллелей с низкой функцией в двух генах семейства глутатион-S-трансфераз. Гомозиготный генотип *GSTM1* 0/0; *GSTT1* 0/0 в 1-й группе выявили у 14,0 % детей, в то время как у новорождённых без признаков БЛД данный генотип зафиксирован не был ( $p = 0,013$ ,  $OR = 16,379$  (2,092–128,239)).

**Обсуждение.** В литературе есть единичные упоминания о причастности нулевых генотипов генов *GSTM1* и *GSTT1* к развитию БЛД. Так, X. Wang et al. (2014) указывают, что делеционный вариант гена *GSTM1*, а также сочетанное присутствие в генотипе *GSTM1* 0/0 и *GSTT1* 0/0 у новорождённых в китайской популяции увеличивает риск трансформации дыхательных нарушений, характерных для неонатального периода в БЛД [10], что согласуется с полученными нами данными у глубоко недоношенных новорождённых в ЦФО РФ. Кроме того, при исследовании других классов GST, M. Manar et al. (2004) доказали причастность *GSTP1* к формированию хронического повреждения бронхолёгочной системы у недоношенных новорождённых [11]. Исследований генов системы детоксикации в европейской популяции у глубоко недоношенных новорождённых с хронической патологией бронхолёгочной системы, в частности у представителей русской нации, найдено не было.

Низкая функциональная активность ферментов системы детоксикации обусловлена присутствием в генотипе новорожденного делеционных аллелей соответствующих локусов и, как следствие, неспособностью организма адекватно обезвреживать токсические вещества. Способствует этому морфологическая и функциональная «незрелость» легких, дефицит сурфактанта, дисбаланс в системе протеолиз-антипротеолиз, наличие оксидативного стресса и зачастую инфекционно-воспалительного процесса. Всё это может способствовать повреждению лёгочной ткани у глубоко недоношенных новорождённых и формированию БЛД. Суммируя полученные данные, можно говорить о возможном участии генов системы детоксикации в формировании неблагоприятного генетического фона, предрасполагающего к развитию БЛД у глубоко недоношенных новорождённых.

**Выводы.** 1. Особенности полиморфизма генов системы детоксикации у глубоко недоношенных новорождённых с бронхолёгочной дисплазией являются наличие в генотипе низкофункциональных вариантов генов *GSTM1* и *GSTT1* и сочетанное присутствие *GSTM1* 0/0 и *GSTT1* 0/0. 2. Исследование полиморфизма генов системы детоксикации у глубоко недоношенных новорождённых с дыхательными нару-

шениями будет способствовать индивидуальному подходу к выбору тактики терапии данной патологии.

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

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

## ЛИТЕРАТУРА (пп. 10-11 см. REFERENCES)

1. Беляшова М.А., Овсянников Д.Ю., Огородова Л.М. Молекулярно-генетические механизмы развития бронхолегочной дисплазии. *Неонатология: новости, мнения, обучения*. 2015; 3: 50-9.
2. *Генетический паспорт - основа индивидуальной и предиктивной медицины*. СПб: Издательство Н-Л; 2009.
3. *Наследственные факторы при различных формах нарушения репродуктивной функции супружеской пары*. Иваново: ОАО «Издательство Иваново»; 2009.
4. Фетисова И.Н., Межинский С.С., Ратникова С.Ю., Фетисов Н.С., Чаша Т.В., Шилова Н.А. Полиморфизм генов системы детоксикации. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2014; 19(4): 50-8.
5. Коротина Г.Ф., Ямбаева Д.Г., Викторова Т.В. Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз M1 и P1 у больных с муковисцидозом и хроническими заболеваниями дыхательной системы. *Генетика*. 2004; 40(3): 401-8.
6. Лябыгина А.В., Ступко Е.Е., Вяткина И.С., Сутурина Л.В., Колесникова Л.И. Особенности метаболизма и полиморфизм генов второй фазы детоксикации ксенобиотиков у женщин с бесплодием. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2013; 7(14): 70-4.
7. Полтанова А.А., Агаркова Л.А., Бухарина И.Ю. Функциональные различия генетически детерминированных вариантов системы детоксикации ксенобиотиков в формировании осложнений гестационного процесса. *Современные проблемы науки и образования*. 2013; 6: 9.
8. *Ведение новорожденных с респираторным дистресс-синдромом. Клинические рекомендации*. Володин Н.Н., ред. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.raspm.ru/files/0236-rds-br2.pdf> 26.05.2016.
9. Современная классификация клинических форм бронхолегочных заболеваний у детей. Российское респираторное общество. Чучалин А.Г., ред. *Педиатрия*. 2010; 89(4): 6-15.

## REFERENCES

1. Belyashova M.A., Ovsyannikov D.Yu., Ogorodova L.M. Molecular genetic mechanisms of bronchopulmonary dysplasia development. *Neonatology: news, opinions, education*. 2015; 3: 50-9. (in Russian)
2. *Genetic passport - the basis of individual and predictive medicine*. St.Peterburg: Izdatel'stvo N-L; 2009. (in Russian)
3. *Hereditary factors in various forms of reproductive dysfunction of the couple*. Ivanovo: OAO Izdatel'stvo Ivanovo; 2009. (in Russian)
4. Fetisova I.N., Mezinskij S.S., Ratnikova S.YU., Fetisov N.S., Chasha T.V., Shilova N.A. The gene polymorphism of detoxification system. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 2014; 19(4): 50-8. (in Russian)
5. Korytina G.F., Yanbaeva D.G., Viktorova T.V. Glutathione-S-transferase M1 and P1 gene polymorphism in patients with cystic fibrosis and chronic respiratory diseases. *Genetika*. 2004; 40(3): 401-8. (in Russian)
6. Labygina A.V., Stupko E.E., Vyatkina I.S., Suturina L.V., Kolesnikova L.I. Features of metabolism and polymorphism of genes of the second phase of xenobiotic detoxification in women with infertility. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skiy zhurnal*. 2013; 7(14): 70-4. (in Russian)
7. Poltanova A.A., Agarkova L.A., Buharina I.Yu. Functional differences of genetically determined variants of xenobiotic detoxification system in the formation of complications of gestational process. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013; 6: 9. (in Russian)
8. *Management of newborns with respiratory distress syndrome. Clinical guidelines*. Volodin N.N., ed. Available at: <http://www.raspm.ru/files/0236-rds-br2.pdf> 26.05.2016. (in Russian)
9. Modern classification of clinical forms of bronchopulmonary diseases in children. The Russian respiratory society [Sovremennaya klassifikatsiya klinicheskikh form bronkholegochnykh zabolevaniy u detey]. Chuchalin A.G., ed. *Pediatriya*. 2010; 89(4): 6-15. (in Russian)
10. Wang X., Li W., Liu W., Cai B., Cheng T., Gao C. et al. *GSTM1* and *GSTT1* gene polymorphisms as major risk factors for bronchopulmonary dysplasia in a Chinese Han population. *Gene*. 2014; 533(1): 48-51.
11. Manar M.H., Brown M.R., Gauthier T.W., Brown L.A. Association of glutathione-S-transferase-P1 (GST-P1) polymorphisms with bronchopulmonary dysplasia. *J. Perinatol.* 2004; 24 (12): 800.

Поступила 16.09.18

Принята к печати 28.10.18

## ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ

### ЕКАТЕРИНА АНДРЕЕВНА КОСТ (К 130-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)

8 июля 2018 г. исполнилось 130 лет со дня рождения профессора, заслуженного врача РСФСР Екатерины Андреевны Кост, выдающегося организатора лабораторной службы в СССР, крупного учёного в области гематологии и клинической лабораторной диагностики.

В 1898 г. Екатерина Андреевна поступила во 2-ю Мариинскую гимназию, которую окончила в 1905 г. В тот же год она поступила на естественный факультет Московских высших женских курсов, с 4-го курса перешла там же на 2-й курс медицинского факультета. После окончания в 1913 г. медицинского факультета свою врачебную деятельность Е.А. Кост начала в психиатрической клинике, а с 1915 г. перешла сначала экстерном, затем интерном и ординатором в госпитальную терапевтическую клинику 2-го Московского университета, которой руководил проф. В.Ф. Предтеченский, затем М.П. Кончаловский (рис.1).

На базе этих курсов позже был организован медицинский факультет 2-го Московского университета, а затем 2-й Московский медицинский институт. Во время работы в институте была секретарём научного медицинского общества, председателем которого был проф. М.П. Кончаловский. Первыми учителями Е.А. Кост были Василий Ефимович Предтеченский и после его смерти – Максим Петрович Кончаловский. В процессе работы в клинике под руководством М.П. Кончаловского она увлеклась клинической гематологией и эти два терапевтических направления оставались любимыми в течение всего долгого её трудового пути. В 1917 г. была призвана на военную службу, заведовала лабораторией 6-го венерического госпиталя. В 1920–1921 гг. работала в клинике и заведовала лабораторией при больнице им. Н.А.Семашко. Екатерина Андреевна в 1922 г. организовала клиническую лабораторию туберкулёзного отделения при Медведниковской больнице и стала заведовать ею. Сочетание таланта клинициста и лабораторного исследователя во многом определило её судьбу.

В 30-е годы. Е.А.Кост в составе комиссии Народного комиссариата здравоохранения участвовала в проведении мероприятий, направленных на борьбу с септической ангиной, или, как её раньше называли, токсической геморрагической алейкией. Весной 1933-1934 гг. в отдельных районах Советского Союза наблюдались массовые заболевания септической ангиной сельского населения, употреблявшего в пищу перезимовавшие злаки. Впоследствии заболевание снова вспыхнуло весной 1942, 1943, 1944 гг. и затем повторилось в 1945-1946 гг. Предполагали, что септическая ангина - это инфекционное заболевание и для выяснения этиологии и патогенеза были созданы научные экспедиции, в работе которых принимала участие Екатерина Андреевна. Было установлено, что перезимовавшие злаки содержат токсин, который вызывает аплазию костного мозга и гибель людей.

С 1925 г. деятельность Е.А Кост неразрывно связана с Горьковской клинической больницей им. С.П. Боткина, где, занимаясь лечебной работой, заведовала клиническими лабораториями, объединив их в 1955 г. в одну структуру. По её инициативе был создан доцентский курс усовершенствования врачей-лаборантов при Мосгорздравотделе, который в 1936 г. преобразован в кафедру клинической лабораторной диагностики Центрального института усовершенствования вра-



Рис. 1. Портрет Е.А. Кост.

чей (ЦИУВ). Будучи руководителем одной из первых кафедр страны, Екатерина Андреевна уделяла большое внимание подготовке квалифицированных врачебных кадров. Первый цикл усовершенствования врачей-лаборантов проводился на кафедре 2 января 1937 г., на который приехали 26 человек из разных регионов страны. Екатерина Андреевна, пройдя превосходную клиническую школу проф. М.П. Кончаловского, в своих лекциях связывала изменения лабораторных показателей с клинической картиной заболеваний. На кафедре впервые были разработаны программы и методы подготовки и совершенствования врачей-лаборантов.

Во время Великой Отечественной войны в команде Н.Н.Бурденко, выезжая на фронт, Екатерина Андреевна курировала лаборатории эвакогоспиталей. Она написала и опубликовала краткое пособие по лабораторной технике, широко использовавшееся в этот период врачами-лаборантами госпиталей.

Свою научную деятельность Е.А.Кост начала ассистентом в клинике проф. М.П. Кончаловского. Её первой фундаментальной работой была монография «Геморрагические диатезы» (Госиздат. М-Л., 1928 г.), которая оказалась первым трудом в отечественной литературе. Кандидатская диссертация была посвящена этой теме и в 1932 году ей была присуждена степень кандидата медицинских наук. В монографии дана патогенетическая классификация геморрагических диатезов (в свете возможностей 20-х годов). Подробно приведены сведения о механизме свертывания крови и лабораторной диагностики геморрагических диатезов. Подводя итог своей работы, Е.А. Кост в качестве эпиграфа книги приводит цитату французского философа Монтеня: « Я собрал в этот букет много различных цветов, моя же собственная здесь – только лента, удерживающая их вместе». Интерес к

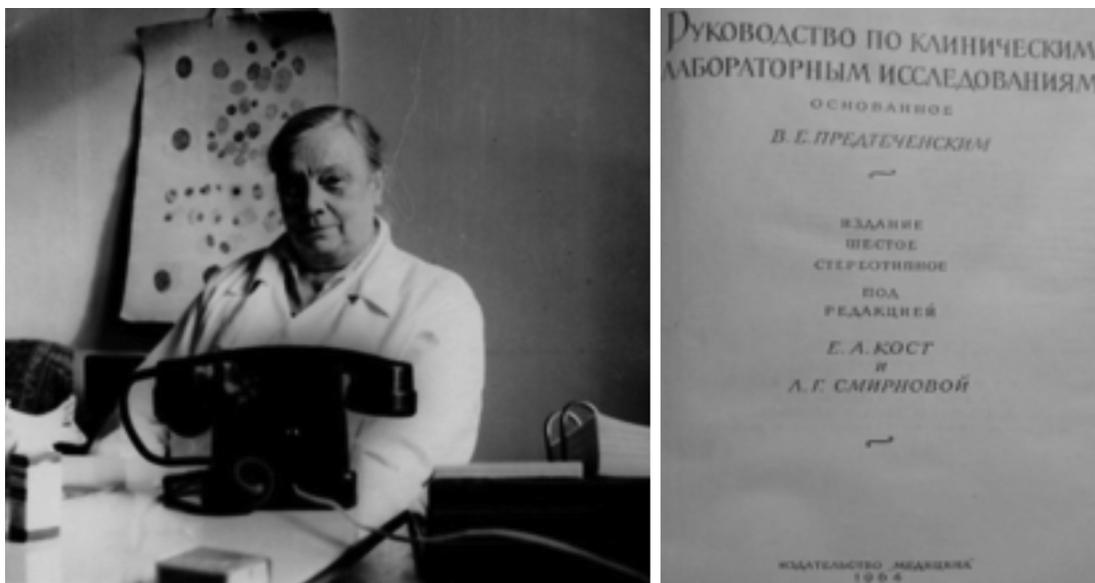


Рис 2. Екатерина Андреевна Кост.

геморрагическим диатезам остался на всю жизнь, и эта тема впоследствии была продолжена её учениками. В 1932 г. Екатерина Андреевна получила звание доцента ЦИУВ, а в 1942 г. окончательно утверждена заведующей кафедрой лабораторной диагностики.

Е.А. Кост опубликовала около 100 научных работ, в том числе 5 монографий. В научно-исследовательской её деятельности можно выделить три основных направления: геморрагические диатезы, гипо- и гиперпластические процессы и научные разработки организации лабораторной службы.

Большим вкладом в науку явилась её докторская диссертация «Гипо- и гиперпластические процессы кроветворного аппарата», которую она защитила в 1952 г., а звание и должность профессора получила в 1953 г. В этой работе был поднят широкий круг вопросов, касающихся кроветворения в норме и при патологии, которыми Е.А. Кост занималась всю жизнь. При выполнении работы ею одновременно использовались гистологический и цитологический методы, т.е. параллельное изучение структуры тканей и клетки, что в настоящее время широко применяется в диагностике опухолей системы кроветворения. Приводя анатомическое описание костного мозга, она пишет: «В гистологическом отношении особо важное значение имеет взаимосвязь между костномозговой ретикулярной тканью, к которой также причисляют эндост и жировую ткань, и паренхимой костного мозга, с одной стороны, и между паренхимой, сосудистой, нервной системами, с другой.... Ретикулярная ткань представляет собой стromу костного мозга и распространяется между сосудами, со стенками которых она соединяется, и костными балками, покрытыми эндостом». В начале 60-х годов Екатерина Андреевна выступала против термина «ретикулёз» в применении к некоторым заболеваниям (лимфогранулематоз, миелома, лимфосаркома, ретикулосаркома и др.). Она считала, что «под термином ретикулёз некоторые авторы ошибочно обобщают ряд заболеваний, сопровождающихся реактивной гиперплазией ретикулярной ткани». Е.А. Кост придерживалась опухолевой теории лейкозов и писала: «Изучение так называемых опухолеподобных форм ещё более подтверждает правильность взгляда на лейкоз как на бластоматозный процесс...». Этой проблеме был посвящён её доклад совместно с Морозовой Викторией Тазаретовной на 5-й Всесоюзной конференции врачей-лаборантов в Ленинграде (1961 г.).

Формирование Е.А. Кост как учёного относится к перио-

ду развития медицины, когда появились работы А.И. Абрикосова и М.А. Скворцова об аллергии. Она одна из первых оценила перспективность этого учения и применила его при изучении патогенеза апластических процессов и геморрагических диатезов. Этим вопросам посвящены её работы «Об агранулоцитозах и геморрагической алейкии» (1935 г.) и «Гематологическая картина при алиментарной алейкии» (1935 г.). В работе «Медикаментозный агранулоцитоз» (1952 г.) особо подчёркивается роль сенсибилизации организма медикаментозным фактором в этиологии и патогенезе апластических анемий. Ею была предложена десенсибилизирующая терапия при агранулоцитозах. Под редакцией Е.А. Кост и Л.Г. Смирновой в 1964 г. была переиздана книга её учителя проф. В.Е.Предтченского «Руководство по клиническим лабораторным исследованиям» (рис.2).

Е.А. Кост активно участвовала в создании «Справочника по клиническим лабораторным методам исследования» (1975 г.), который был настольной книгой не только врачей-лаборантов, но и студентов, ординаторов медицинских институтов и врачей широкого профиля.

В развитии лабораторного дела в нашей стране немаловажную роль сыграл журнал «Лабораторная практика», в создании которого Екатерина Андреевна Кост принимала участие в качестве заместителя редактора. Совместно с проф. Л.Г. Смирновой в 1955 г. был создан журнал «Лабораторное дело», ответственным редактором которого она оставалась до 1969 г. В 1947 году по инициативе Екатерины Андреевны было создано Всесоюзное научное общество врачей-лаборантов и около 100 его филиалов. В течение 20 лет она была бессменным его председателем. За это время было проведено 6 всесоюзных научно-практических конференций, решения которых легли в основу мероприятий по дальнейшему развитию лабораторного дела и нашли отражение в ряде приказов Минздрава СССР, направленных на развитие службы. Она также являлась почётным членом Научного общества врачей-лаборантов Болгарии, редактором редакционного отдела «Внутренние болезни» 2-го издания Большой медицинской энциклопедии. В общественной деятельности активное участие принимали также Татьяна Николаевна Фельдман (зав. КДЛ больницы им. А.А.Остроумова), Елизавета Андреевна Хрущёва (зав. КДЛ Института им. А.В.Вишневского), Татьяна Владимировна Хитрово-Горева (зав. КДЛ Института травматологии и ортопедии), Дервиз Георгий Валерьевич



Рис.3. Преподаватели и курсанты цикла «Клиническая лабораторная диагностика», 1964 г. В центре Е.А. Кост, справа от неё Г.Г. Газенко, В.Т. Морозова, слева Р.Л. Марцишевская, Н.И. Бокуняева.

(зав. биохимической лабораторией ЦОЛИПК), Газенко Георгий Григорьевич.

Являясь длительное время консультантом по лабораторной службе Минздрава СССР, Екатерина Андреевна проводила большую работу по развитию лабораторной службы в стране, в частности по организации и оснащению КДЛ в сельских местностях, выработке нормативных документов. В течение 30 лет Е.А. Кост была бессменным председателем лабораторной комиссии комитета по внедрению новой медицинской техники Минздрава СССР. Она была членом нескольких учёных советов, участником многих международных конгрессов и всесоюзных съездов.

Екатерина Андреевна не ограничивалась своим интересом в области лабораторной диагностики, она оставалась опытным клиницистом и консультантом не только в гематологическом отделении больницы им. С.П.Боткина, но и привлекалась к работе ряда научно-практических и лечебных отделений. Е.А. Кост одна из первых отказалась от госпитализации больных хроническими лейкозами в ранней стадии заболевания, применив динамическое их наблюдение в условиях поликлиники в больнице им. С.П.Боткина, что было продолжено в дальнейшем её коллегами. Исследования, проведённые по диспансеризации больных лейкозами и анемиями, были обобщены в двух диссертационных работах. В это же время она отказалась от переливания цельной крови при наличии у больных анемии и сохранном объёме плазмы, заменив их на эритромассу.

Андрей Иванович Воробьёв вспоминал о заседании гематологической секции Московского научного общества терапевтов в 1956 г., где в президиуме были Иосиф Абрамович Кассирский, Екатерина Андреевна Кост, Марк Соломонович Дульцин - заведующий гематологическим отделением Центрального института гематологии и переливания крови, заведующие кафедрами терапии, лабораторной диагностики ЦИУврачей. «Обсуждался патогенез, диагностика и лечение болезней крови. По-видимому, встреча врача-лаборанта и терапевтов за одним столом, обсуждающих на равных собственные наблюдения виденного под микроскопом и боль-

ных, - факт не совсем обычный. Но Екатерина Андреевна вела систематический приём больных, а Иосифа Абрамовича нельзя было представить без микроскопа. Они воспринимали и расшифровывали болезнь только при полном охвате всех её сторон: рассказ больного, увиденное и нащупанное, микроскопический анализ крови, костного мозга, пунктатов и отпечатков лимфоузлов, гистологическая картина трепаната костного мозга».

На кафедре клинической лабораторной диагностики ЦОЛИУв под руководством Е.А. Кост выполнены диссертации по изучению патогенеза анемий и лейкозов, а также негематологического профиля - «Цитологическое исследование раневого секрета», «Цитологическое исследование секрета предстательной железы», «Миоглобинурии и методы их лабораторной диагностики», «Исследование качественных форм гемоглобинов эритроцитов при различных патологических состояниях организма» и др. Этот неполный перечень работ свидетельствует о широком кругозоре и многогранности Е.А. Кост как учёного. С 1951 г. на кафедре была открыта клиническая ординатура, с 1960 г. - аспирантура, в 1955 г. Е.А. Кост объединила разрозненные лаборатории больницы им. С.П.Боткина в единую клинко-диагностическую лабораторию.

Екатерина Андреевна воспитала целую плеяду учеников, самостоятельных научных исследователей в области лабораторной гематологии, биохимии и цитологии. Это М.И. Стенко, И.С. Цыпкин, Н.И. Бокуняева, Р.П. Золотницкая, Л.Э. Ярустовская, В.М. Шитова, А.М. Шапиро, В.Т. Морозова, Н.Г. Шевченко, Р.Л. Марцишевская, В.И. Гольдберг и многие другие (рис.3). Её ученики всегда с большим теплом вспоминали своего учителя.

За свою лечебную и научную деятельность Екатерине Андреевне в 1947 г. было присвоено звание заслуженного врача РСФСР. За время врачебной деятельности она была награждена орденами Ленина (двумя), орденом «Знак Почета» (двумя), медалями «За победу над Германией», «За оборону Москвы», «За доблестный труд в Великой Отечественной войне», значком «Отличнику здравоохранения». Но самой

ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ

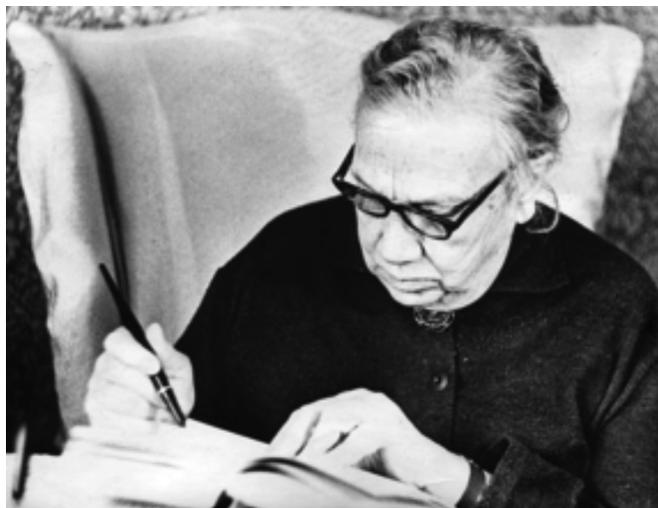


Рис. 4. Е.А. Кост.

большой наградой для Екатерины Андреевны всегда были любовь и уважение сотрудников лаборатории и других отделений больницы им. С.П.Боткина, уважение и почитание её пациентов и друзей.

Екатерина Андреевна и её муж, академик АМН СССР Михаил Александрович Скворцов, за всю свою непростую жизнь никогда не поступались своими жизненными принципами и всегда были окружены любящими и преданными друзьями, а широта их интересов и эрудиция определили их

очень разнообразный круг – ученые, лингвисты, географы, актёры драматических и оперных театров, солисты балета, музыканты и просто хорошие люди. Екатерина Андреевна и Михаил Александрович были постоянными посетителями Большого, Малого и Художественного театров, концертов в консерватории, выставок. Их близкими друзьями были В.Н. Пашенная, Д.Ф. Ойстрах, С.Н. Кнушевицкий, Н.Д. Шпиллер, Д.Н. Журавлев, И.А. Витвер, а также коллеги по специальности – М.С. Вовси, Б.Е. Вотчал, И.В. Давыдовский, П.Д. Соловой, К.М. Винцентини и многие другие.

В небольшом сквере во дворе бывшего дома А.С. Талызина на Никитском бульваре находится памятник русскому писателю Н.В. Гоголю, созданный скульптором Николаем Андреевичем Андреевым. На пьедестале разместились бронзовые барельефы с изображением персонажей из наиболее известных произведений автора. Примечателен тот факт, что для образа Оксаны из «Ночи перед Рождеством» ему позировала Е.А. Кост.

Екатерина Андреевна умерла 26 февраля 1975 г. и была похоронена на Новодевичьем кладбище.

Крупный учёный, врач-гуманист, известный общественный деятель, скромный человек с самобытными качествами, исключительно внимательный к больным и коллегам – такой осталась в нашей памяти Екатерина Андреевна Кост. Её жизненный путь – замечательный образец беззаветного служения своему народу и избранной профессии.

Проф. В.Т. Морозова, С.А. Луговская

*Кафедра клинической лабораторной диагностики Российской медицинской академии непрерывного последипломного образования Минздрава Российской Федерации*

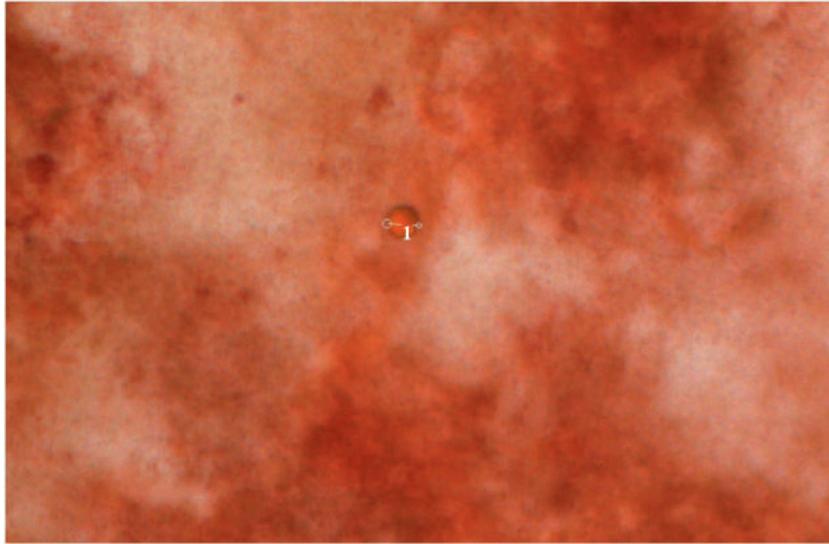


Рис. 1. Препарат плазмы крови контрольной серии исследования. Окрашивание суданом IV. Об. 5, видеонасадка – ХТ0028.  
1 – жировая глобула.

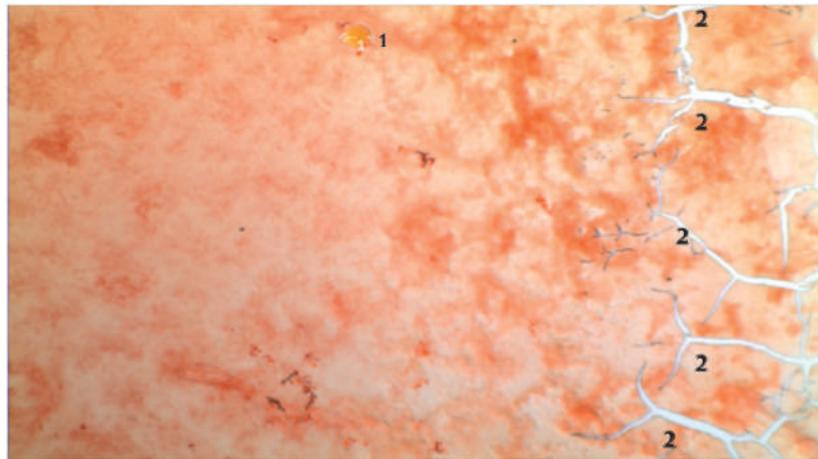


Рис. 2. Препарат плазмы крови контрольной серии.  
Окрашивание суданом IV. Об. 5, видеонасадка – ХТ0028. Примечание: 1 – жировая глобула размером 64 мкм; 2 – участки разрушения препарата.

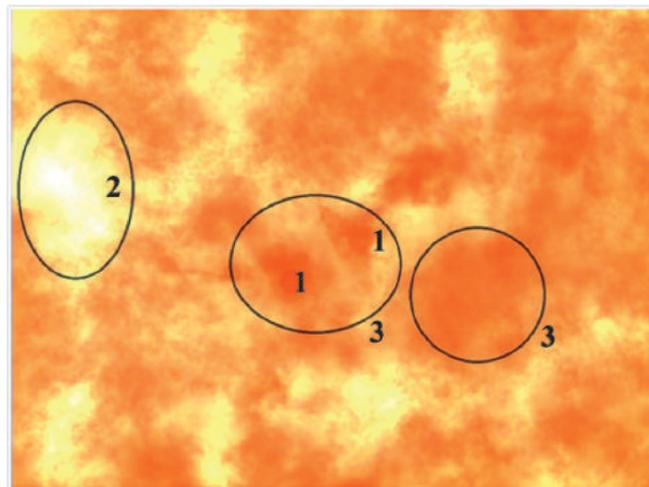


Рис. 3. Препарат плазмы крови контрольной серии исследования.  
Окрашивание суданом IV. Об. 5, видеонасадка – ХТ0028. Примечание: 1 – крупная жировая глобула с нечеткими контурами в зоне избыточного окрашивания; 2 – зона недостаточного окрашивания; 3 – зона избыточного окрашивания.