

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

11 • 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

НОЯБРЬ

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 27.11.2018.

Подписано в печать 20.12.2018.

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

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. Клини. лаб. диагностика.  
2018. № 11. 665–728.

**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  
11 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

NOVEMBER

The Journal is founded in 1955.

**Mailing address:**  
**Izdatelstvo "MEDITSINA"**

115088, Moscow  
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:  
8-495-430-03-63,

E-mail: [clin.lab@yandex.ru](mailto:clin.lab@yandex.ru)

**Managing editor L.A. Shankina**

**ADVERTISING DEPARTMENT**

Phone: 8-495-678-64-84

**The responsibility for credibility of  
information contained in advertising materials  
is accounted for advertisers**

Art editor *E.M. Arkhipova*

Translator *V.S. Nechaev*

Proof-reader *V.S. Smirnova*

Layout editor *L.V. Zyukina*

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

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

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

**EDITOR BOARD:**

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

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

**EDITORIAL COUNCIL:**

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



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

**БИОХИМИЯ**

- Титов В.Н.* О биологической функции эндоэкологии (чистота межклеточной среды), которую реализуют две биологические реакции: реакция экскреции и реакция воспаления – утилизация *in vivo, in situ* катаболитов большой молекулярной массы ..... 668
- Бельская Л.В., Косенок В.К., Массард Ж.* Активность метаболитических ферментов слюны при нейроэндокринных опухолях легкого различной степени злокачественности. .... 677
- Сандаков Я.П.* Нарушения метаболизма при хронических нейрорецидивных заболеваниях и способы их коррекции в ходе диспансеризации. .... 683
- Рясенский Д.С., Гришкина Н.А.* Влияние гепатопротектора «Фосфоглив®» на спектр фосфолипидов мононуклеаров периферической крови у больных туберкулезом легких ..... 686
- Соснин Д.Ю., Ховаева Я.Б., Подъянова А.И., Сыромятнникова Т.Н., Ненашева О.Ю.* Эритропоэтин как показатель тяжести хронической обструктивной болезни лёгких ..... 691

**ИММУНОЛОГИЯ**

- Марданлы С.Г., Авдонина А.С.* Разработка набора реагентов для выявления антител класса G к отдельным антигенам вируса краснухи методом иммунного блоттинга в формате «Western Blot» ..... 696
- Лаврова Д.П., Заводовский Б.В., Ахвердян Ю.Р., Полякова Ю.В., Сивордова Л.Е., Зборовская И.А., Яковлев А.Т.* Ирисин как новый маркер ранней диагностики низкотравматических переломов при ревматоидном артрите ..... 702
- Харченко В.В., Агарков Н.М., Коровин Е.Н., Иванов В.А., Будник И.В., Макконен К.Ф., Жернакова Н.И.* Иммуноферментный и дискриминантный анализ в совершенствовании диагностики рака яичников в пожилом возрасте ..... 707

**МИКРОБИОЛОГИЯ**

- Мурзабаева Р.Т., Шарифуллина Л.Д., Мавзютов А.Р., Гильманов А.Ж., Валишин Д.А., Мавзютова Г.А.* Иксодовый клещевой боррелиоз: клинико-лабораторные особенности ..... 711
- Рудаков Н. В., Абрамова Н. В., Штрек С. В., Шаламова Е. В., Пеньевская Н. А., Рудакова С. А., Самойленко И. Е., Березкина Г. В., Зеликман С. Ю., Кумпан Л. В., Матущенко Е. В., Наумкина Е. В.* Клинико-лабораторная диагностика клещевых риккетсиозов на территориях низкого риска инфицирования *Rickettsia sibirica* ..... 717

**КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

- Коробкина Е.А., Князева М.С., Киль Ю.В., Титов С.Е., Малек А.В.* Сравнительный анализ методов детекции микроРНК с помощью метода обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) ..... 722

**НЕКРОЛОГ**

Памяти Василия Ивановича Нигуляну.....

**BIOCHEMISTRY**

- Titov V.N.* Biological function of endoecology (cleanliness of intercellular environment) realize two biological reactions: excretion reaction and inflammation reaction - utilization *in vivo, in situ* catabolites of the large molecular mass
- Bel'skaya L.V., Kosenok V.K., Massard Zh.* Activity of metabolic enzymes of saliva with neuroendocrine tumors of the lung of various degrees of malignancy
- Sandakov Ya.P.* During metabolic disorders in chronic non-communicable diseases and ways of their correction the medical examination of the population
- Riasenskii D.S., Grishkina N.A.* Influence of Phosphogliv® hepatoprotector on phospholipid spectrum of peripheral blood mononuclears in patients with tuberculosis of lungs
- Sosnin D.Yu., Khovaeva Ya.B., Podyanova A.I., Syromyatnikova T.N., Nenasheva O.Yu.* Eritropoetin as laboratory index of the degree of respiratory insufficiency in chronic obstructive pulmonary diseases

**IMMUNOLOGY**

- Mardanly S.G., Avdonina A.S.* Development of a test kit for the detection of IgG-antibodies to individual antigens of rubella virus by immunoblotting (Western Blot)
- Lavrova D.P., Zavadovsky B.V., Akhverdyan Yu.R., Polyakova Yu.V., Sivordova L.E., Zborovskaya I.A., Yakovlev A.T.* Irisin as a new marker of early diagnostics of low-traumatic fractures in rheumatoid arthritis
- Kharchenko V.V., Agarkov N.M., Korovin E.N., Ivanov V.A.I., Budnik I.V., Makkonen K.F., Zhernakova N.I.* Immunoassay and discriminant analysis to improve the diagnosis of ovarian cancer in the elderly

**MICROBIOLOGY**

- Murzabayeva R.T., Sharifullina L.D., Mavzyutov A.R., Gilmanov A.Zh., Valishin D.A., Mavzyutova G.A.* Ixodic tick-borne borreliosis: clinical and laboratory features
- Rudakov N. V., Abramova N. V., Shtrek S. V., Shalamova E. V., Penyevskaya N. A., Rudakova S. A., Samoilenko I. E., Berезкина G. V., Zelikman S. Y., Kumpan L. V., Matushenko E. V., Naumkina E. V.* Clinical and laboratory diagnosis of tick-borne rickettsioses in areas of low risk of infection *Rickettsia sibirica*

**CLINICAL MOLECULAR STUDIES**

- Korobkina E.A., Knyazeva M.S., Kil Yu.V., Titov S.E., Malek A.V.* Comparative analysis of RT-qPCR based methodologies for microRNA detection

**OBITARY**

In memory of Vasily Ivanovich Nigulyanu

## БИОХИМИЯ

© В.Н. ТИТОВ, 2018

УДК 612.014.1:577.1

### О БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ ЭНДОЭКОЛОГИИ (ЧИСТОТА МЕЖКЛЕТОЧНОЙ СРЕДЫ), КОТОРУЮ РЕАЛИЗУЮТ ДВЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ: РЕАКЦИЯ ЭКСКРЕЦИИ И РЕАКЦИЯ ВОСПАЛЕНИЯ – УТИЛИЗАЦИЯ *IN VIVO*, *IN SITU* КАТАБОЛИТОВ БОЛЬШОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

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

Третье место за биологическими функциями трофологии (питания) и гомеостаза, мы полагаем, занимает функция эндоэкологии: в едином пуле межклеточной среды *in vivo* должно быть «чисто». Биологическую функцию эндоэкологии реализуют две биологические реакции: реакция экскреции и реакция воспаления. Биологическая реакция экскреции – фильтрация флогогенов малой молекулярной (мол.) массы через базальную мембрану клубочков нефрона и выведение с окончательной мочой. Флогогены большой мол. массы (более 70 кДа), катаболиты биологических реакций апоптоза, аутофагии приходится утилизировать *in situ*, на месте. На ступенях филогенеза клетки сформировали структуры сбора и утилизации флогогенов большой мол. массы и экзогенных патогенов в тканях. Последовательность биохимических реакций, биологических приёмов сбора *in vivo* и утилизации *in situ* флогогенов большой мол. массы и реализует биологическая функция эндоэкологии, биологическая реакция воспаления. Она функционирует постоянно, ежесекундно, как и биологическая реакция экскреции. Воспаление – реакция поддержания «чистоты» «кусочка» океана, который приватизировала каждая особь, перед началом жизни на суше. Реакция воспаления включает врождённый, приобретённый иммунитет, системы гуморальных медиаторов, цитокины и эйкозаноиды. При формировании замкнутой системы кровообращения пул сбора и утилизации *in situ* биологических катаболитов из кровотока расположился в поздней в филогенезе интима артерий эластического (мышечно-эластического) типа. Злоупотребление травоядного вида *Homo sapiens* плотоядной (мясной) пищей, блокада поглощения клетками полиеновых жирных кислот – эфиров спирта холестерина у моноцитов → макрофагов является причиной формирования атероматоза интимы артерий эластического типа. Атеросклероз – патология биологической функции трофологии, атероматоз интимы – патология биологической функции эндоэкологии. Назначение пациентам статинов в целях первичной профилактики атеросклероза, атероматоза и ишемической болезни сердца, мы окончательно «проехали».

Ключевые слова: экскреция; воспаление; атеросклероз; атероматоз; интима; функция эндоэкологии.

Для цитирования: Титов В.Н. О биологической функции эндоэкологии (чистота межклеточной среды), которую реализуют две биологические реакции: реакция экскреции и реакция воспаления - утилизация *in vivo*, *in situ* катаболитов большой молекулярной массы. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (11): 668-676. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-668-676>

Titov V.N.

BIOLOGICAL FUNCTION OF ENDOECOLOGY (CLEANLINESS OF INTERCELLULAR ENVIRONMENT) REALIZE TWO BIOLOGICAL REACTIONS: EXCRETION REACTION AND INFLAMMATION REACTION - UTILIZATION *IN VIVO*, *IN SITU* CATABOLITES OF THE LARGE MOLECULAR MASS

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

For the biological functions of trophology (nutrition) and homeostasis, we believe that the third place is occupied by the function of endoecology: in a single pool of intercellular environment *in vivo* it must be "pure". The biological function of endoecology, realizes two biological reactions: the reaction of excretion and the reaction of inflammation. The biological reaction of excretion is the filtration of phlogogens of a small mol. mass through the basement membrane of the glomerulus of the nephron and excretion with the final urine. Flogogens are a great mol. mass (more than 70 kDa), catabolites of biological reactions of apoptosis, autophagy must be disposed of *in situ*, on site. At the stages of phylogenesis, the cells formed structures for the collection and utilization of phlogogens of large mol. mass and exogenous pathogens in tissues. The sequence of biochemical reactions, biological methods of *in vivo* collection and *in situ* utilization of phlogogens of large mol. mass and realizes the biological function of endoecology, the biological reaction of inflammation. It functions constantly, every minute, like the biological reaction of excretion. Inflammation is the reaction of maintaining the "cleanliness" of the "piece" of the ocean that every individual has privatized, before beginning to live on land. The inflammation reaction includes congenital, acquired immunity, humoral mediator systems, cytokines and eicosanoids. In the formation of a closed circulatory system, the pool for collecting and utilizing *in situ* biological catabolites from the bloodstream is located in the late phylogeny of the intima of the arteries of the elastic (muscular-elastic) type. Abuse of herbivorous species *Homo sapiens* carnivorous (meat) food; blockade of cellular absorption by polyene fatty acids in low density lipoproteins and the absence of acidic hydrolase expression of polyene fatty acids - cholesterol alcohol ethers in monocytes and macrophages - is the cause of the formation of atheroma of intima of the arteries of the elastic type. Atherosclerosis - the pathology of the biological function of trophology, atheromatosis - pathology of the biological function of endoecology. The appointment of patients statins for primary prevention of atherosclerosis, atheromatosis and coronary heart disease, we finally "passed".

**Key words:** *excretion; inflammation; atherosclerosis; atheromatosis; intima; endoecology function.*

**For correspondence:** *Titov V.N., doctor of medical sciences, professor; e-mail: vn\_titov@mail.ru*

**For citation:** *Titov V.N. Biological function of endoecology (cleanliness of intercellular environment) realize two biological reactions: excretion reaction and inflammation reaction - utilization in vivo, in situ catabolites of the large molecular mass. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (11): 668-676. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-668-676>*

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

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

Received 01.10.2018

Accepted 15.10.2018

В последнее время мы провели анализ около ста работ, которые представлены в Pub Med, и название которых начинается со слова «воспаление». Второе и третье слова в названии статей включают чуть ли ни весь перечень нозологических форм заболеваний, охватывающая все разделы клинической медицины, в том числе и кардиологию. Названия статей включают многие афизиологичные процессы, такие как атеросклероз и атероматоз, ишемическая болезнь сердца и метаболический синдром, синдром резистентности к инсулину, аритмии сердца, новообразования разной локализации, последствия травм, инфекционные, нейродегенеративные процессы и т. д. [1, 2].

При столь широком охвате этиологических и патогенетических факторов биологической реакции воспаления мы хотели видеть определение, которое приводят авторы, определяя суть биологической реакции воспаления. Что это – физиологичный или афизиологичный процесс, который реализован при столь многих заболеваниях. Ответа на вопрос мы не нашли; определение биологической реакции «воспаление», как правило, авторы не приводят. Не понят и тот факт, почему при нарушении биологической функции трофологии, питания, при формировании синдрома атеросклероза атероматоз поражает только интиму и только в артериях эластического, смешанного типов; интимы и атероматоза нет в артериолах мышечного типа. Мы полагаем, что суть биологической реакции воспаления следует изложить на основании обобщения информации, которая получена исследователями на протяжении длительного времени на ступенях филогенезе, однако основы определения должны быть новыми.

*Филогенетическая теория общей патологии.* Мы полагаем, что наиболее полным обобщением всего, что физическая химия, биохимия, физиология и медицина наработали на протяжении времени, будет детальный анализ филогенеза, единого анамнеза всего живого на протяжении около четырех миллиардов лет. В то же время онтогенез – это анамнез особи; при этом каждая особь в онтогенезе своём повторяет все основные этапы филогенеза (постулат Э. Геккеля).

Через 160 лет после формирования клеточной теории Р. Вирхова мы предложили дополнить теорию общей патологии [3]. Согласно филогенетической теории общей патологии, на ступенях филогенеза в течение четырех миллиардов лет, мы полагаем, далеко не одновременно, с интервалом в миллион лет, возможно в иной последовательности, произошло становление *in vivo* биологических функций. Мир, как известно, семеричен; биологических функций мы насчитали тоже семь:

1. Биологическая функция трофологии (питания).
2. Биологическая функция гомеостаза.
3. Биологическая функция эндоэкологии («чистота» межклеточной среды).
4. Биологическая функция адаптации.
5. Биологическая функция продолжения вида (размножения).
6. Биологическая функция локомоции.
7. Когнитивная биологическая функция.

Проявлением когнитивной функции в апогее её является интеллект. Когнитивная биологическая функция – это позиционирование особи в логичном, облигатном единении: а) с реакциями метаболизма и физиологичными функциями *in vivo*; б) воздействия мипозитивных и неблагоприятных факторов внешней среды; в) это – позиционирование особи в стае, в рамках общественных отношений, в социуме и в обществе себе подобных специалистов.

Подавляющее число особей в мире животных, начиная с самых ранних на ступенях филогенеза одноклеточных архей, были (остались) гетеротрофами. Всё, что необходимо им для жизни, они потребляют из внешней среды. Для гетеротрофов функция питания – функция номер один; мы поставили её на первое место. Реализуют биологическую функцию трофологии две биологические реакции: биологическая реакция экзотрофии (внешнее питание) и биологическая реакция эндотрофии (внутреннее) питание. Нарушение биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии задействовано в патогенезе всех метаболических пандемий. Метаболических пандемий («болезней цивилизации») мы насчитали тоже семь:

1. Атеросклероз и атероматоз.
2. Метаболическая (эссенциальная) артериальная гипертензия.
3. Метаболический синдром.
4. Синдром резистентности к инсулину.
5. Ожирение.
6. Неалкогольная жировая болезнь печени.
7. Эндогенная гиперурикемия.

Второй, мы полагаем, явилась биологическая функция гомеостаза. Она означает, что для каждой из клеток многие физико-химические параметры единого пула межклеточной среды должны быть стабильными, как и концентрация всех биохимических аналитов. Для каждой из клеток в межклеточной среде всего и всегда должно быть достаточно. Биологическая функция гомеостаза в равной мере важна для реализации биологической функции трофологии. Это равнозначно как для биологической реакции экзотрофии, так и для биологи-

ческой реакции эндотрофии, несмотря на разные условия их реализации и регуляции [4].

Биологическую функцию гомеостаза реализуют многие сотни физико-химических и биохимических реакций, которые в первую очередь призваны поддерживать стабильность единого пула межклеточной среды *in vivo*. Это «кусочек» третьего океана, который, оказавшись не по своей воле на суше, облигатно «приватизировала» каждая особь, сформировав из него единый пул межклеточной среды. И если, в силу неблагоприятных воздействий внешней среды, животные вынуждены жить на суше, все клетки их, как и миллионами лет ранее, продолжают жить в водах третьего океана. Для большинства клеток *in vivo* на протяжении четырех миллиардов лет, даже при вынужденном выходе на сушу, ничего существенного не произошло.

В этом и состоит предназначение биологической функции гомеостаза. Можно полагать, первый океан на планете Земля был магниевый, второй – калиевый и третий океан был (есть) натриевый. В силу этого среди многочисленных аналитов, содержание которых можно определить в едином пуле межклеточной среды, биологическая функция гомеостаза в наиболее узких пределах поддерживает концентрацию ионов натрия ( $\text{Na}^+$ ) и pH, логарифм концентрации ионов водорода ( $\text{H}^+$ ). И несмотря на то что на ступенях филогенеза *in vivo* многие млекопитающие сформировали локальные пулы межклеточной среды с иным содержанием аналитов, концентрация ионов Na и величина pH во всех пулах, в том числе и в локальном пуле внутрисосудистой среды, меняются лишь в узких пределах. Все параметры третьего океана *in vivo*, на суше, равно как и у животных в океане, осуществляет и контролирует биологическая функция гомеостаза [5].

На третье место среди всех биологических функций, мы поставили биологическую функцию эндэкологии: в едином пуле межклеточной среды *in vivo* всегда должно быть «чисто». «Чистота» межклеточной среды означает наличие лишь оптимального количества биологических катаболитов - флогогенов малой и большой мол. массы. Биологическую функцию эндэкологии, мы полагаем, реализуют две биологические реакции: биологическая реакция экскреции и биологическая реакция воспаления. Биологическая реакция экскреции - фильтрация флогогенов малой мол. массы через базальную мембрану клубочков нефрона в почках и выведение их из организма с окончательной мочой.

И если флогогены малой мол. массы (менее 70 кДа, меньше мол. массы альбумина) можно просто вывести из организма, то с флогогенами мол. массы более 70 кДа сделать подобное не так просто. Флогогены большой мол. массы (более 70 кДа) вывести из организма невозможно; утилизировать катаболиты биологических реакций апоптоза и аутофагии приходится *in situ*, на месте. В силу этого за миллионы лет на ступенях филогенеза клетки *in vivo* сформировали специфичные структуры сбора и утилизации флогогенов большой мол. массы, как и экзогенных патогенов [6]. Последовательность биохимических реакций и биологических приёмов сбора *in vivo* и утилизации *in situ* флогогенов большой мол. массы и осуществляет биологическая функция эндэкологии, биологическая реакция воспаления.

*Гибель клеток in vivo, реакция резорбции (воспаления) и реакция репарации (регенерация, фиброз и гипертрофия).* Ещё до новой эры римский философ и врач Цельс охарак-

теризовал локальные проявления биологической реакции воспаления словами: *rubor, tumor, calor, dolor and function leasa*. Последние два слова много позже добавил уже Гален. Это покраснение, припухлость, локальное повышение температуры, болезненность и нарушение функции. И.И. Мечников полагал, что воспаление - реакция адаптации, отработанная на ступенях филогенеза. Самое важное проявление её - фагоцитоз макрофагами и моноцитами → макрофагами патогенных агентов. В настоящее время полагают, что воспаление — защитная реакция организма в ответ на внедрение инфекционного агента, поступление антигенов или эндогенного повреждения клеток [7].

Со студенческих лет, на уровне «подкорковых образований» формируется реальное, физиологичное, но явно заузненное, представление о воспалении как биологической реакции, которая инициирована *in vivo* в ответ на действие экзогенных патогенов. Постепенно это приводит к причинно-следственным ассоциациям инфекция ↔ воспаление. Порой можно услышать, что нахождение бактерий в массе атероматозных липидов в интима артерий даёт основание говорить о бактериальном формировании атеросклероза и атероматоза [8]. Биологическая реакция воспаления функционирует *in vivo* постоянно, ежеминутно, как и биологическая реакция экскреции; вместе они реализуют биологическую реакцию эндэкологии – «чистоту» межклеточной среды многоклеточного организма.

Экзогенные токсины, бактерии и вирусы, как и эндогенные комплексы антиген – антитело, макромолекулы цитоплазмы, тельца апоптоза и продукты биологической реакции аутофагии, являются ординарными патогенами и флогогенами, составляя разнообразие катаболитов многочисленных *in vivo* биологических реакций [9]. В реализации биологической функции эндэкологии, биологической реакции воспаления все катаболиты призваны утилизировать *in situ*, в первую очередь оседлые макрофаги, используя для этого сквенджер-рецепторы (рецепторы – «мусорщики»). Все оседлые макрофаги *in vivo*, непрерывно реализуя биологическую реакцию фагоцитоза, осуществляют полную утилизацию в первую очередь всех эндогенных флогогенов (инициаторов воспаления) и всех экзогенных, инфекционных патогенов. Утилизация их оседлыми (резидентными) макрофагами является специфичной, методически разной, но на всех ступенях филогенеза эффективной [10].

Воспаление - биологическая реакция поддержания «чистоты» того фрагмента мирового океана, который «приватизировала» каждая особь, которая стала жить на суше. Биологические функции трофологии, гомеостаза и эндэкологии являются, мы полагаем, тремя функциями, становление которых на ступенях филогенеза произошло наиболее рано. Биологическая функция эндэкологии, биологическая реакция воспаления включает многочисленные биологические реакции врождённого, приобретённого иммунитета, многие системы гуморальных медиаторов, цитокины, эйкозаноиды. Они включают гормональную регуляцию, обеспечение клеток энергией, протеины клеточных взаимодействий, белки теплового шока. Функционируют они *in vivo* на трёх уровнях относительного «биологического совершенства»:

- на первом аутокринном (клеточном) уровне;
- на уровне паракринно регулируемых сообществ (ПС) клеток – структурных и функциональных единиц каждого из органов, систем органов
- и на третьем уровне - уровне организма.

Гибель клеток *in vivo* наиболее часто происходит:

а) путём запрограммированной в геноме биологической, физиологической реакции апоптоза;

б) при активации биологической, физиологической реакции аутофагии в условиях, в частности, стресса эндоплазматического ретикулаума;

в) путем цитолиза, травмы, некроза (нарушение целостности плазматической мембраны клеток), истечения протеинов цитоплазмы в межклеточную среду, в локальный пул внутрисосудистой среды при действии бактерий, токсинов и вирусов.

Независимо от этиологии физиологического и афизиологического изменений формирование биологического процесса восстановления тканей, функции клеток и органов происходит в большинстве случаев по физиологическому пути: гибель клеток → резорбция всего погибшего → репарация (восстановление) функции клеток.

Окончательный процесс репарации *in vivo* может быть реализован по типу:

а) регенерации, образования функционально активных клеток взамен погибших;

б) замещения погибших клеток фибробластами (процесс рубцевания);

в) биологической реакции компенсаторной гипертрофии, если речь идёт о парных органах. Биологическая функция эндозеологии, биологическая реакция воспаления реализует в этой последовательности биологический процесс резорбции. Воспаление – активный процесс удаления (резорбции) повреждённых, функционально замещаемых клеток и формирование облигатных условий для реализации биологического процесса репарации, всегда желательного путём регенерации. И если процессы репарации *in vivo* начнутся ранее окончания резорбции (воспаления), возникают реальные условия для формирования хронического деструктивного, воспалительного процесса, заболеваний разной этиологии, патогенеза и локализации.

*Формирование в филогенезе структур сбора и утилизации эндогенных флогогенов, инфекционных патогенов in situ.* По достижении первого уровня относительного «биологического совершенства», когда возможности дальнейшего развития одноклеточных были в основном исчерпаны, клетки спонтанно, физиологично начали формировать ранние ПС клеток. Далее на ступенях филогенеза сформированные ПС стали структурными и функциональными единицами всех органов и систем органов. Классическим примером ПС, с позиций структуры и функции, является ПС нефрона и сформированные из тысяч нефронов парные органы экскреции – почки [11]. Каждое из первичных ПС формировали одновременно три разных типа клеток:

1. специализированные клетки, которые определяют функцию ПС;

2. клетки эндотелия и гладкомышечные клетки, которые сформировали систему перфузии – локальные перистальтические насосы; далее они заложили основы лимфо-, гемолимфообращения и позже системы кровообращения;

3. клетки рыхлой соединительной ткани (РСТ) заложили основы реализации на ступенях филогенеза трёх биологических функций: функции трофологии; биологической функции гомеостаза и функции эндозеологии с биологическими реакциями экскреции и воспаления.

Эти же клетки РСТ в ПС стали: а) запасать субстраты для выработки митохондриями энергии (синтез ма-

кроэргического АТФ) и б) формировать прогениторные клетки – стволовые клетки, специализированные в направлении дифференцировки в определённые типы клеток [12]. Эти клетки РСТ, в отличие от плюрипотентных клеток, уже имеют биомаркёры, которые отличают их от клеток иных типов. Происходило это путём депонирования жирных кислот (ЖК) в форме неполярных липидов – триглицеридов (ТГ) в «каплях» липидов в цитоплазме клеток РСТ.

Так на ступенях филогенеза в каждом из ПС, в каждой ткани, в органе и системе органов повсеместно сформировались кластеры клеток РСТ. Среди функционального разнообразия клеток наиболее ранними в филогенезе явились полифункциональные оседлые, резидентные макрофаги. Будучи в филогенезе наиболее ранними, макрофаги, утратили способность пролиферировать [13]. Они стали реализовать сбор и утилизировать *in situ* эндогенные флогогены большой мол. массы и экзогенные, инфекционные патогены. В сборе флогогенов и патогенов в рамках каждой из структур задействована система первично лимфо-обращения и далее гемолимфообращения.

Лимфатические сосуды на ступенях филогенеза сформировали клетки в ПС эритроцитов параллельно со становлением системы кровообращения для переноса неполярных ТГ. Происходило это с целью: а) реализации биологических функций трофологии, биологической функции гомеостаза, функции эндозеологии и б) формирования анатомических структур поздней в филогенезе системы врождённого и приобретённого иммунитета. Раннюю систему кровообращения на уровне ПС реализовали локальные перистальтические насосы (артериолы мышечного типа). Сердца – центрального насоса системы кровообращения, миллионы лет ещё не было, и система кровообращения в его отсутствие ещё миллионы лет оставалась незамкнутой.

*Интимы артерий эластического типа – место сбора и утилизации in situ биологического «мусора» из внутрисосудистой среды.* В процессе формирования одноклеточными ПС клеток, органов и систем органов клетки не изменили тех «привычек», которые они использовали ранее. Все клетки воспринимают единый пул межклеточной среды *in vivo* как внешнюю среду, выделяя в неё всё, что им перестаёт быть нужным. Далее лимфатическая система доносит все эндогенные флогогены и экзогенные патогены до пула клеток РСТ; во всех ПС клеток оседлые макрофаги утилизируют все эндогенные флогогены; экзогенные же патогены клетки РСТ проводят далее в лимфатические узлы. Это позднее в филогенезе структуры, которые реализуют биологические реакции врождённого и приобретённого иммунитета; это опять-таки биологическая функция эндозеологии, биологическая реакция воспаления, хотя можно это действие рассматривать и как реализацию биологической функции адаптации. Также поступает каждая из клеток и с локальным пулом миллионы лет незамкнутой системы кровообращения: все, что не нужно – в кровотоки.

Биологическая реакция воспаления – основная реакция и естественного (врождённого) иммунитета [14]. Уже во время проникновения в организм бактерии сталкиваются с первой линией обороны: это антимикробные пептиды (антибиотики млекопитающих) семейства дефензинов. Биологическую реакцию воспаления вызывают и продукты деградации бактерий: липополисахариды, липо-

пептиды, пептидогликаны, ДНК бактерий [15]. Продукты деградации эндогенных патогенов выявляет семейство toll-подобных рецепторов на плазматической мембране иммунокомпетентных клеток. Часть toll-подобных рецепторов (toll – погребальный звон) распознают изменения и в эпитопах эндогенных флогогенов [16]; реагируют они и на освобождение в плазму крови белков теплового шока [17], семейства шаперонов [18].

Клетки всех органов, всё, что перестало быть необходимым, все катаболиты, формируемые клетками эндосомы, а также содержимое цитоплазмы клеток при гибели их по типу некроза (цитоллиза) освобождается в локальный пул внутрисосудистой системы. Миллионы лет внутрисосудистая среда была замкнутой и сообразалась с единым пулом межклеточной среды. Миллионы лет в системе кровообращения функционировали только локальные перистальтические насосы. Они сформировали ранний в филогенезе дистальный отдел артериального русла: это артериолы мышечного типа, интимы в стенке артериол они не имеют. Миллионами лет позднее, на ступенях филогенеза сформировались артерии эластического типа; они сформировали проксимальный отдел современного артериального русла. Вместе с перистальтическими локальными насосами они осуществляли функцию замкнутой системы кровотока.

Образование сердца как центрального насоса и замкнутой системы кровообращения произошло, вероятно, на поздних ступенях филогенеза. Иницирующим фактором формирования замкнутого кровообращения, мы полагаем, явилось становление биологической функции локомоции, движения за счёт реципрокного сокращения поздних, поперечнополосатых, скелетных миоцитов и синцития кардиомиоцитов. На вопрос, всё ли на ступенях филогенеза происходило согласно принципу «изначальной целесообразности», можно ответить нет.

Не в полной мере обоснованным являются, порой, попытки авторов сопоставить функцию биологических организмов с машиной; общего между ними не столь уж много. При конструировании машины изначально изготавливают чертежи и определяют хотя бы то, для чего конструкция предназначена. В глубинах же океана, в «коацерватном бульоне», когда источником органических молекул являлись «черные курильщики – вулканы», в полной темноте трудно было определить, к построению чего же можно приступить. Реальными были только физико-химические параметры органических молекул, электролиты и возможность осзания молекулами друг друга в поисках локальных мест аффинности – будущего взаимодействия. Можно полагать, что на поздних ступенях филогенеза при формировании замкнутой системы кровообращения пул сбора и утилизации *in situ* биологических катаболитов расположился рядом, в поздней на ступенях филогенеза интиме артерий эластического и мышечно-эластического типа.

Так, *in vivo* на поздних ступенях филогенеза интиме артерий эластического типа стала местом сбора и утилизации *in situ* всего разнообразия эндогенных флогогенов и экзогенных патогенов, выводимых из замкнутого пула кровотока. Казалось бы, излагаемое содержит элементы новизны; в то же время ещё в 1895 г. сотрудники лаборатории Р. Коха, желая получить генерализованное поражение органов туберкулёзом, вводили взвесь палочки Коха в вену экспериментальным животным. Общего инфицирования *in vivo* не получилось; все бактерии

оказались собраны в интиме артерий эластического типа, фиксированы на матриксе интимы и утилизированы клетками РСТ, полифункциональными, оседлыми макрофагами *in situ*.

Так же, за работами с холестерином, которые проведены Н.Н. Аничковым и соавт., мы с опозданием вспоминаем эксперименты А.И. Игнатовского [19]. В них кормление травоядных кроликов плотоядной пищей (мясом) формировало клиническую картину атеросклероза и атероматоз интимы артерий эластического типа. То же самое происходит и в клинике у травоядного в филогенезе вида *Homo sapiens*, но с плотоядным прошлым в океане, когда пациент начинает злоупотреблять мясной пищей [20]. Ведь плотоядным (*Carnivores*) Человек разумный является только в прошлом; в настоящем же филогенезе он травоядный (*Herbivores*), но никак не всеядный (*Omnivores*); таких видов природа не создавала. И сбор эндогенных флогогенов, экзогенных патогенов в интиме артерий эластического и смешанного типов является активным, векторным процессом [21]; представление о пассивной инфильтрации – это *nonsense*.

*Активный сбор, утилизация в реакции воспаления флогогенов и патогенов в интиме.* Эндогенными флогогенами являются и органоспецифические ферменты (АСТ, АЛТ, креатинкиназа, щелочная фосфатаза,  $\gamma$ -глутамилтранспептидаза –  $\gamma$ -ГТ и ЛДГ). В условиях афизиологичного цитоллиза при вирусной инфекции, нарушения биологической реакции метаболизм ↔ микроциркуляция и формирования гипоксии в клетках ферменты истекают в кровоток из цитоплазмы. Как эндогенные флогогены они далее активно перенесены в интиме артерий эластического типа, в пул сбора и утилизации эндогенных флогогенов *in situ* при реализации реакции воспаления. Кроме дипептидилкарбокисептидаз, в крови ферментов протеолиза нет; нет и физико-химических условий для их активности.

Все флогогены, которые в биологической реакции воспаления оказываются в интиме, являются эндогенными, «своими» молекулами и перед выведением из крови их подвергают физиологичной денатурации. Эту функцию в замкнутом пуле плазмы крови исполняют постоянно освобождаемые из костного мозга нейтрофилы; клетки реализуют свойственную им биологическую реакцию «респираторного взрыва» [22]. В реакции, которую катализирует миелопероксидаза, нейтрофилы усиливают образование активных форм кислорода (АФК); их предназначение – формирование патологических эпитопов на поверхности эндогенных флогогенов (макромолекул белка) в процессе физиологичной их денатурации. В составе липопротеинов (ЛП) АФК реализуют и перекисное окисление жирных кислот (ЖК) в форме липидов. Нейтрофилы, синтезируя АФК, формируют в эндогенных молекулах афизиологичные эпитопы, распознавая которые toll-подобные 4-рецепторы определяют как физиологично денатурированные молекулы, запуская активный процесс выведения их из плазмы крови в интиме артерий, в пул сбора и утилизации *in situ* эндогенных флогогенов и экзогенных, порой инфекционных патогенов. Денатурация в кровотоке макромолекул белка путём окисления АФК является первым этапом активированного сбора и далее утилизации их в интиме артерий путём биологической реакции воспаления.

Активированное удаление эндогенных флогогенов, экзогенных патогенов из замкнутого внутрисосудистого русла происходит в несколько этапов:

- физиологичная денатурация эндогенных флогогенов (формирование афизиологичных эпитопов) путём воздействия активных форм  $O_2$ ;

- выявление денатурированных молекул при действии toll-подобных рецепторов иммунокомпетентных клеток;

- биологическая реакция опсонизации, действие компонентов комплемента в целях оптимизации активированного выведения флогогенов и патогенов [23];

- биологическая реакция клатринового (активированного) трансцитоза (эндо→ экзоцитоза) через молослой эндотелия в интиму артерий;

- активация реакции трансцитоза эндогенных флогогенов и экзогенных патогенов в интиму путём повышения артериального давления (АД) в позднем в филогенезе проксимальном отделе артериального русла при активации биологической реакции эндотелийзависимой вазодилатации.

Система комплемента – комплекс протеинов, функционально единого каскада протеинов плазмы крови. Реализуют они биологическую функцию эндозеологии, биологическую реакцию воспаления как систему гуморальной защиты организма от экзогенных инфекционных протеинов, бактерий и вирусов. Система комплемента осуществляет комплекс реакций опсонизации в биологической реакции воспаления, в системе врождённого и приобретённого иммунитета, перед тем как вывести из кровотока в интиму и утилизировать *in situ* все эндогенные флогогены и экзогенные патогены, поддерживая «чистоту» внутрисосудистого и единого пулов межклеточной среды.

Образование и поддержание функции эндо- и экзоцитоза (трансцитоза) [24] обеспечивает синтез специфичного протеина кавеолина. Это интегральный протеин плазматической мембраны клеток, в том числе и монослой эндотелия с двумя глобулярными доменами. В мембране его сдерживают ассоциированные на С-конце белка молекулы пальмитиновой ЖК. Кавеолы задействованы в передаче клетками регуляторных сигналов в биологической реакции эндоцитоза; в онкогенезе; в инфицировании клеток патогенами. Кавеолярный трансцитоз задействован в реализации биологической функции эндозеологии, биологической реакции воспаления.

Особую роль в инициации, в регуляции биологической реакции воспаления играет система гуморальных медиаторов — цитокинов [25]; идентифицировано более 50 цитокинов, иницирующие факторы роста иммунокомпетентных клеток и РСТ [26]. Семейство цитокинов включает как про-, так и противовоспалительные гуморальные медиаторы цитокины: концентрация их в кровотоке быстро возрастает в десятки раз. Регуляторами биологической реакции воспаления являются также хемокины [27], молекулы адгезии клеток, белки острой фазы и семейство факторов роста [28]. Молекулы адгезии клеток включают семейства иммуноглобулинов, селектины, интегрины, аднексины и т.д.; все они являются активными участниками биологической реакции воспаления. Гуморальные медиаторы иницируют ассоциацию иммунокомпетентных клеток крови на поверхности монослой эндотелия артерий эластического типа, затем обеспечивают выход клеток в очаг воспаления путём *perdia pedesis*. Гуморальные медиаторы (протеазы) запускают систему свертывания крови, реакции фибринолиза, активируют систему комплемента, дегрануляцию лейкоцитов [29]. Ранними в филогенезе медиа-

торами биологической реакции воспаления являются и эйкозаноиды, синтез которых осуществляют клетки из экзогенных эссенциальных ЖК.

В клинике же и по настоящее время активированный сбор в интиму эндогенных флогогенов, инфекционных патогенов и выведение из крови в интиму, в очаг физиологичного воспаления многих видов иммунокомпетентных клеток определяют неподобающим словом – инфильтрация. Накопление в кровотоке как эндогенных флогогенов, так и экзогенных патогенов в физиологичном стремлении активировать позднюю в филогенезе биологическую реакцию трансцитоза с уровня сосудодвигательного центра инициирует повышение АД в проксимальном отделе артериального русла, нарушает гидродинамическое давление в дистальном отделе артериол мышечного типа биологическую реакцию метаболизм ↔ микроциркуляция. Биологическая реакция воспаления реализует одновременно два разнонаправленных синдрома: а) синдром системного противовоспалительного ответа и б) синдром компенсаторной противовоспалительной защиты [30].

*Реализация биологической реакции воспаления в интиму артерий.* Поскольку биологическая реакция трансцитоза активна в обоих направлениях, выведенные флогогены (патогены) в матриксе необратимо связывают гликозаминогликаны интимы. Молекулы состоят из повторов кластеров, которые являются, в частности, остатками D-глюкуроновой кислоты и сульфатированных ацетилированных, ацилированных аминсахаров. *In vivo* глюкозаминогликаны ковалентно связаны с молекулами протеогликанов. Небольшое число ранних в филогенезе полифункциональных оседлых, резидентных макрофагов в интиму реализуют столь же ранний на ступенях филогенеза вариант внеклеточного пищеварения. Макрофаги выводят в матрикс интимы протеолитические ферменты – матричные металлопротеиназы-9.

Это семейство Zn-зависимых эндопептидаз; они призваны осуществлять деструкцию матрикса и освободить связанные флогогены и патогены. Далее путём биологической реакции эндоцитоза макрофаги поглощают все освобожденные флогогены, патогены и компоненты структуры матрикса [31]. В лизосомах оседлые макрофаги полностью утилизируют флогогены, патогены до олигопептидов, гидролизуют все липиды - эфиры ЖК, в том числе и холестериновые эфиры полиеновых ЖК (поли-ЭХС). Гладкомышечные клетки меди артерий эластического типа далее изменяют фенотип. Из сократительных, они становятся секреторными и, реализуя биологическую реакцию пролиферации, восстанавливают протеогликаны матрикса интимы и гладкомышечные клетки меди. Фактором, который физиологично активирует пролиферацию клеток *in vivo*, является аполипопротеин(а). Апо(а) в составе ЛП(а) (в ЛП низкой плотности) векторно доставляет ко всем клеткам, которые реализуют биологическую реакцию пролиферации, дополнительное количество экзогенных, эссенциальных ПНЖК. Без этого сформировать новые плазматические мембраны делящихся клеток невозможно.

Полифункциональные, резидентные макрофаги, эффективно реализуя биологическую функцию эндозеологии, биологическую реакцию воспаления, постоянно поддерживают «чистоту» межклеточной среды многоклеточного организма [32]. Полифункциональные макрофаги интимы немногочисленны, однако функции их достаточно для утилизации в интиму *in situ* всего

физиологического количества эндогенных флогенов и экзогенных патогенов. В ситуациях, когда катаболиты, которые при активации биологической реакции трансцитоза скапливаются в интимае, функциональных возможностей макрофагов становится явно недостаточно, макрофаги начинают синтез биологических медиаторов – хемоаттрактантов. Макрофаги по градиенту концентрации этих медиаторов иницируют активированное проникновение из кровотока в интиму моноцитов [33].

Освобожденные из костного мозга моноциты именуют «рекрутами»; в разных тканях и серозных полостях они призваны исполнять несколько разные функции [34]. В интимае артерий эластического типа, после нескольких дней активной специализации, моноциты становятся моноцитами → макрофагами и начинают утилизировать *in situ* биологические катаболиты – флогены и патогены [35]. Казалось бы, все проходит физиологично, но «дьявол кроется в мелочах» [36]. Моноциты → макрофаги, войдя в интиму, не экспрессируют синтез всего-то одного фермента; это кислая гидролаза полиеновых ЖК, которые этерифицированы спиртом холестерина (ХС) [37]. При анализе ЖК в атероматозной массе липидов в интимае артерий, можно идентифицировать массу ЖК с длиной не более С17 в форме эфиров со спиртом ХС. Если же проанализировать положение в катаболитах ЖК двойных связей, можно понять, что это частично катаболизированные ω-3 и ω-6 ПНЖК в форме поли-ЭХС. Получается, что столь необходимые клеткам с ранних ступеней филогенеза эссенциальные ПНЖК, которые являются облигатными для клеток как субстрат для синтеза биологически активных эйкозаноидов, утилизированы *in situ* в интимае артерий при реализации биологической реакции воспаления поздними на ступенях филогенеза моноцитами → макрофагами [38].

Участие в биологической реакции воспаления столь большого количества функционально разных клеток требует постоянного обеспечения их ЖК, субстратами для выработки митохондриями энергии. На ступенях филогенеза функция вектора направленного переноса ЖК к клеткам, которые реализуют биологическую функцию воспаления, исполняет специфичный С-реактивный белок (СРБ) в форме пентамера. Биологическая функция апо(а) и СРБ подробно описана нами ранее [39]. В нескольких словах: специфичным физико-химическим параметром СРБ является на порядки более высокая аффинность к одному из фосфолипидов – к лизофосфатидилхолину.

При действии ассоциированной с липопротеидами очень низкой плотности (ЛПОНП) фосфолипазы А<sub>2</sub> в полярном монослое олеиновых ЛПОНП фермент нарабатывает лизофосфатидилхолин. С последним связывается СРБ; перекрывая физиологичный апоЕ/В-100 лиганд в олеиновых ЛПОНП, СРБ сам становится лигандом. СРБ переадресует поток ЖК в форме ТГ в составе ЛПОНП в первую очередь к клеткам, которые реализуют биологическую реакцию воспаления. При этом все клетки, задействованные в реализации воспаления, выставляют на мембрану специфичные рецепторы к СРБ. При действии СРБ порой в интимае артерий перегруженные ТГ макрофаги становятся похожими на пенистые (лаброциты), формируя в интимае «липидные пятна» [40]. Содержание СРБ пентамера в плазме крови при активации биологической реакции воспаления повышается порой на порядки.

*Афизиологичное исполнение биологической функции эндоэкологии биологической реакции воспаления – основа атероматоза.* Анализ биологической функции эндоэкологии, биологической реакции воспаления, процесса становления синдрома атероматоза даёт возможность понять, что атеросклероз – это патология, состоящая из нарушений физиологичных функций, атероматоз же – патология с ясно выраженной морфологической, деструктивной составляющей. Рассмотрим эти процессы схематично, по этапам.

1. Согласно филогенетической теории общей патологии, вид *Homo sapiens* является не всеядным (*Omnivores*), природа таких видов не создавала, а травоядным (*Herbivores*), но с плотоядным (*Carnivores*) прошлым. Травоядный вид *Человек разумный* может физиологично поедать мясную пищу; однако количество её ограничено особенностями переноса ЖК у травоядных видов в форме ТГ в составе ЛПОНП в кровотоке ко всем клеткам; *Homo sapiens* вид - плотоядный в прошлом и травоядный в настоящем.

2. Травоядные виды основное количество полученной с пищей глюкозы используют в синтезе гепатоцитами ω-9 С18:1 олеиновой ЖК; этерифицируют её в олеиновые ТГ, и апоВ-100 структурирует эти ТГ в состав олеиновых ЛПОНП, освобождая их в кровоток. Далее физиологичная постгепариновая липопротеинлипаза (ЛПЛ) активно гидролизует часть олеиновых ТГ, иницируя формирование апоЕ/В-100 лиганда. Связываемая лигандные олеиновые ЛПОНП своими рецепторами, все клетки поглощают олеиновые ЛПОНП. У травоядных видов образования олеиновых ЛПОНП в крови не происходит.

3. Когда в пище травоядных в филогенезе пациентов с плотоядным прошлым количество мясной пищи превышает физиологичные возможности *in vivo*, гепатоциты всю экзогенную С16:0 пальмитиновую ЖК этерифицируют в пальмитиновые ТГ, далее апоВ-100 формирует пальмитиновые ЛПОНП и клетки секретируют их в кровоток. В крови:

а) постгепариновая ЛПЛ медленно гидролизует не оптимальные для нее субстрат - пальмитиновые ТГ в одноимённых ЛПОНП;

б) формирования апоЕ/В-100 лиганда в пальмитиновых ЛПОНП не происходит и

в) большинство пальмитиновых ЛПОНП превращаются в одноимённые ЛПОНП → ЛПНП. Именно пальмитиновые ЛПОНП → ЛПНП увеличивают в плазме крови содержание ХС-ЛПНП. Пальмитиновые ЛПОНП → ЛПНП столь же медленно формируют и апоВ-100 лиганд, блокируя поглощение клетками ЛПОНП → ЛПНП путём апоВ-100 эндоцитоза со всеми переносимыми ими эссенциальными ПНЖК в форме поли-ЭХС.

4. В результате нарушения биологической функции трофологии, биологической функции экзотрофии формируется синдром атеросклероза. Он включает:

а) дефицит эссенциальных ω-6 и ω-3 ПНЖК и компенсаторный синтез клетками афизиологичных эйкозаноидов (простаглицлины, тромбоксаны, лейкотриены) с нарушением многих реакций метаболизма, биологических реакций метаболизм ↔ микроциркуляция;

б) нарушение функции интегральных протеинов плазматической мембраны при отсутствии ПНЖК и нарушении синтеза наименее гидрофобных, заряженных аминокислотных липидов;

в) нарушение функционального взаимодействия клеток *in vivo*, в частности агрегации тромбоцитов, системы свёртывания крови и

г) формирование выраженной гиперлипопротеинемии, чаще типа IIб.

5. Если избыточное потребление мясной пищи пациентами будет продолжаться, постепенно, вслед за повышением в плазме крови содержания ТГ и ХС-ЛПНП, последует компенсаторное увеличение содержания в плазме крови апоС-III кофермента и синтез гепатоцитами более оптимальной для гидролиза пальмитиновых ТГ печёночной триглицеролгидролазы. Если потребление мясной пищи станет выражено афизиологичным, в крови увеличится содержание апоВ-48 как тест подключения к переносу клеткам от энтероцитов больших количеств пальмитиновой ЖК в составе хиломикрон. Апогеем нарушения переноса ЖК при питании пациента-мясоеда станет формирование гиперлипопротеинемии (ГЛП) типа V, выявляемой при проведении электрофореза ЛП.

6. Формирование атеросклероза и выраженное «замусоривание» внутрисосудистого пула межклеточной среды безлигандными пальмитиновыми ЛПОНП+ЛПНП активирует биологическую функцию эндозеологии и биологическую реакцию воспаления. Все клетки, которые вовлечены в реализацию биологической функции эндозеологии, начинают сбор эндогенных флогогенов (безлигандных пальмитиновых ЛПОНП+ЛПНП) и утилизацию их *in situ* в интима артерий эластического типа. Пока количество эндогенных флогогенов не превышает способность оседлых макрофагов их утилизировать, всё происходит физиологично.

Когда же возможностей немногочисленных оседлых макрофагов, которые неспособны пролиферировать, оказывается недостаточно, макрофаги «засыпают» в интиму моноциты→макрофаги гематогенного происхождения. Именно они, неспособные экспрессировать синтез кислой гидролазы эфиров холестерина, начинают формировать атероматозные массы липидов в интима артерий, только частично исполняя катаболизм ПНЖК, этерифицированы ХС в форме поли-ЭХС. Роль одноатомного, вторичного, циклического спирта ХС при формировании атероматоза интимы артерий является явно пассивной [41].

Стремление клиницистов нормализовать реакции переноса, поглощения клетками и метаболизма ЖК, контролировать состояние ГЛП, предотвратить формирование атеросклероза, атероматоза и ишемической болезни сердца (ИБС) вполне объяснимо, но и сам пациент должен «участвовать» в сохранении своего здоровья. Клиницисты, определяя в динамике тесты клинической биохимии, такие как содержание ТГ→ХС-ЛПНП→апоС-III→апоВ-48→ГЛП типа V, могут объективно оценить характер питания пациента, не опираясь только на показания пациента - «мясоеда» [42].

Одновременно каждому пациенту важно прочувствовать, что в настоящем он травояден и только в прошлом, при жизни в океане, реально был, да и то не мясоедом, а рыбоедом; мясоедом вид *Homo sapiens* никогда не был [43]. Каковыми бы ни были врождённые нарушения, которые у отдельных пациентов способствуют формированию ИБС, нормализация биологической функции питания (трофологии), биологической реакции экзотрофии является основополагающим условием, которое понизит активность биологической функции эндозеоло-

гии, биологической реакции воспаления, предотвратит формирование атеросклероза и атероматоза интимы артерий эластического типа. Можно полагать, что длительный период назначения пациентам статинов в целях первичной профилактики атеросклероза, атероматоза и ИБС, мы уже окончательно «проехали».

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-2, 4-6, 8-18, 20-21, 23-24, 26-29, 31-34, 36-38, 40-41 см. REFERENCES)

3. Титов В.Н. *Клиническая биохимия. Курс лекций*. М.: ИНФРА-М; 2017.
7. Кулинский В.И. Биохимические аспекты воспаления. *Биохимия*. 2007; 72(6): 733 – 46.
19. Гасанов М.З., Батюшин М.М., Терентьев В.П. Профессор А.И. Игнатовский как основоположник теории атеросклероза. *Архив внутренней медицины*. 2017; 6: 407 – 12.
22. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Б.Б. *Окислительный стресс*. М.: МАИК «Наука/Интерпериодика»; 2001.
25. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н. Системное воспаление – миф или реальность? *Вестник Российской академии наук*. 2004; 74(3): 219 – 27.
30. Черешнев В.А., Черешнева М.В. Иммунологические механизмы локального воспаления. *Медицинская иммунология*. 2011; 13(6): 557 – 68.
35. Нозадзе Д.Н., Рвачева А.В., Казначеева Е.И., Сергиенко И.В. Моноциты в развитии и дестабилизации атеросклеротической бляшки. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2012; 3: 25 – 36.
39. Титов В.Н., Осипов С.Г. *Атеросклероз. Роль эндогенного воспаления, белков острой фазы и жирных кислот*. М.: Издательство Фонд «Клиника XXI века»; 2004.
42. Титов В.Н., Рожкова Т.А., Каминная В.И., Алчинова И.Б. Методы клинической биохимии в объективной оценке степени переедания травоядным в филогенезе *Homo Sapiens* (пациентом) плотоядной, мясной пищи. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(6): 324 – 32.
43. 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.

## REFERENCES

1. Levi M., van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit. Care Med.* 2010; 38(2): 26 – 34.
2. Marshal J.C. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit. Care Med.* 2001; 29(7 Suppl): S99-106.
3. Titov V.N. *Clinical biochemistry. Lecture course. [Klinicheskaya biokhimiya. Kurs lektsiy]*. Moscow: INFRA-M; 2017. (in Russian)
4. Novoseltsev V.N., Novosel'tseva Zh.A. Health, homeostasis and longevity. *Adv. Gerontol.* 2011; 24(4): 553 - 62.
5. Ramsay D.S., Woods S.C. Clarifying the roles of homeostasis and allostasis in physiological regulation. *Psychol. Rev.* 2014; 121(2): 225-47.
6. Tkachenko E.I. Nutrition, human endoecology, health, diseases. Current views on their relations. *Ter. Arkh.* 2004; 76(2): 67 - 71.
7. Kulinskiy V.I. Biochemical aspects of inflammation. *Biokhimiya*. 2007; 72(6): 733 – 46. (in Russian)
8. Campbell L.A., Rosenfeld M.E. Infection and atherosclerosis development. *Arch. Med. Res.* 2015; 46(5): 339 - 50.
9. Gluckman P.D., Hanson M.A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*. 2004; 305(5691): 1733 - 6.
10. Ellison P.T. Evolutionary perspectives on the fetal origins hypothesis. *Am. J. Hum. Biol.* 2005; 17(1): 113 - 8.
11. de Vivar Chevez A.R., Finke J., Bukowski R. The role of inflammation in kidney cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014; 816: 197 - 234.
12. Fujiwara N., Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr. Drug. Targets. Inflamm. Allergy*. 2005; 4(3): 281 - 6.

13. Geissmann F., Manz M.G., Jung S., Sieweke M.H., Merad M., Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010; 327(5966): 656 - 61.
14. Esche C., Stellato C., Beck L.A. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J. Invest. Dermatol.* 2005; 125(4): 615 - 28.
15. Soriani A., Stabile H., Gismondi A., Santoni A., Bernardini G. Chemokine regulation of innate lymphoid cell tissue distribution and function. *Cytokine. Growth. Factor. Rev.* 2018; 42: 47 - 55.
16. Lim K.H., Staudt L.M. Toll-like receptor signaling. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 2013; 5(1): a011247.
17. Hoang M., Potter J.A., Gysler S.M., Han C.S., Guller S., Norwitz E.R., Abrahams V.M. Human fetal membranes generate distinct cytokine profiles in response to bacterial Toll-like receptor and nod-like receptor agonists. *Biol. Reprod.* 2014; 90(2): 39 - 46.
18. Sokol C.L., Luster A.D. The chemokine system in innate immunity. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 2015; 7(5): a016303.
19. Gasanov M.Z., Batyushin M.M., Terentyev V.P. Professor A.I. Ignatovskiy as the founder of the theory of atherosclerosis. *Arkhiv vnutrenney meditsiny*. 2017; 6: 407 - 12. (in Russian)
20. Zhou Q., Jiang Z.K., Gui S.Y., Wang Y. Association of aorta intima permeability with myosin light chain kinase expression in hypercholesterolemic rabbits. *Mol. Cell. Biochem.* 2011; 347(1-2): 209-15.
21. Libby P., Okamoto Y., Rocha V.Z., Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ. J.* 2010; 74(2): 213 - 20.
22. Zenkov N.K., Lankin V.Z., Menshchikova B.B. *Oxidative stress. [Okislitel'ny stress]*. Moscow: MAIK «Nauka/Interperiodika»; 2001. (in Russian)
23. Nonaka M. Evolution of the complement system. *Subcell. Biochem.* 2014; 80: 31 - 43.
24. Botham K.M., Wheeler-Jones C.P. Postprandial lipoproteins and the molecular regulation of vascular homeostasis. *Prog. Lipid. Res.* 2013; 52(4): 446-64.
25. Chereshev V.A., Gusev E.Yu., Yurchenko L.N. Systemic inflammation - myth or reality? *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk*. 2004; 74(3): 219 - 27. (in Russian)
26. de Vries E.E., van den Munckhof B., Braun K.P., van Royen-Kerkhof A., de Jager W., Jansen F.E. Inflammatory mediators in human epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2016; 63: 177 - 90.
27. Soriani A., Stabile H., Gismondi A., Santoni A., Bernardini G. Chemokine regulation of innate lymphoid cell tissue distribution and function. *Cytokine. Growth. Factor. Rev.* 2018; 42: 47 - 55.
28. Lambertsen K.L., Biber K., Finsen B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 2012; 32(9): 1677 - 98.
29. Tuttolomondo A., Di Raimondo D., di Sciacca R., Pinto A., Licata G. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr. Pharm. Des.* 2008; 14(33): 3574 - 89.
30. Chereshev V.A., Cheresheva M.V. Immunological mechanisms of local inflammation. *Meditsinskaya immunologiya*. 2011; 13(6): 557 - 68. (in Russian)
31. Wang L., Wei C., Deng L., Wang Z., Song M., Xiong Y., Liu M. The accuracy of serum matrix metalloproteinase-9 for predicting hemorrhagic transformation after acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *J. Stroke. Cerebrovasc. Dis.* 2018; 27(6): 1653 - 65.
32. Swirski F.K., Robbins C.S., Nahrendorf M. Development and function of arterial and cardiac macrophages. *Trends. Immunol.* 2016; 37(1): 32 - 40.
33. Kim D., Haynes C.I. Neutrophil chemotaxis within a competing gradient of chemoattractants. *Anal. Chem.* 2012; 84(14): 6070 - 8.
34. Chanput W., Mes J., Vreeburg RA, Savelkoul HF, Wichers HJ. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food. Funct.* 2010; 1(3): 254 - 61.
35. Nozadze D.N., Rvacheva A.V., Kaznacheeva E.I., Sergienko I.V. Monocytes in the development and destabilization of atherosclerotic plaque. *Ateroskleroz i dislipidemii*. 2012; 3: 25 - 36. (in Russian)
36. Sekiya M., Osuga J., Igarashi M., Okazaki H., Ishibashi S. The role of neutral cholesterol ester hydrolysis in macrophage foam cells. *J. Atheroscler. Thromb.* 2011; 18(5): 359 - 64.
37. Fernandez-Ruiz I., Puchalska P., Narasimhulu C.A., Sengupta B., Parthasarathy S. Differential lipid metabolism in monocytes and macrophages: influence of cholesterol loading. *J. Lipid. Res.* 2016; 57(4): 574 - 86.
38. Chistiakov D.A., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2016; 20(1): 17 - 28.
39. Titov V.N., Osipov S.G. Atherosclerosis. The role of endogenous inflammation, acute phase proteins and fatty acids. [*Ateroskleroz. Rol' endogennoy vospaleniya, belkov ostroy fazy i ghirmyh kislot*]. Moscow: Izdatel'stvo Fond «Klinika XXI veka»; 2004. (in Russian)
40. Bian F., Yang X., Zhou F., Wu P.H., Xing S., Xu G., Li W., Chi J. C-reactive protein promotes atherosclerosis by increasing LDL transcytosis across endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 2014; 171(10): 2671 - 84.
41. Packard R., Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin. Chem.* 2008; 54(1): 24-38.
42. 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)
43. 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)

Поступила 01.10.18

Принята к печати 15.10.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.24-006.048-07:616.316-008.831.1

Бельская Л.В.<sup>1</sup>, Косенок В.К.<sup>2</sup>, Массард Ж.<sup>3</sup>

## АКТИВНОСТЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ СЛЮНЫ ПРИ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЯХ ЛЕГКОГО РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

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

<sup>2</sup>Омский государственный медицинский университет, 644099, Омск;

<sup>3</sup>Университетская больница Страсбурга, 67091, Страсбург, Франция

*До настоящего времени остаются актуальными проблемы оптимизации методов диагностики и прогнозирования течения рака легкого, занимающие лидирующие позиции в структуре онкологических заболеваний. Цель исследования: изучение особенностей активности метаболитических ферментов слюны при НЭО легкого в зависимости от степени злокачественности. В исследовании случай – контроль приняли участие 156 человек, которые были разделены на 2 группы: основную (с диагнозом рак НЭО легкого, n=56) и контрольную группу (условно здоровые, n=100). Всем участникам было проведено анкетирование, биохимическое исследование слюны, гистологическая верификация диагноза. Межгрупповые различия оценены непараметрическим критерием. Показано, что на фоне НЭО легкого наблюдаются метаболитические изменения, характеризующиеся уменьшением коэффициента де Ритиса ( $p=0.0350$ ) и активности лактатдегидрогеназы ( $p=0.0492$ ), а также увеличением активности аланинаминотрансферазы ( $p=0.0114$ ), щелочной фосфатазы ( $p=0.0150$ ) и  $\alpha$ -амилазы ( $p=0.0328$ ). Статистически достоверные отличия между НЭО разной степени злокачественности (G1+G2 и G3) выявлены для аминотрансфераз (АЛТ –  $p=0.0421$ ; АСТ –  $p=0.0472$ ), щелочной фосфатазы ( $p=0.0454$ ) и  $\alpha$ -амилазы ( $p=0.0263$ ). Показано уменьшение активности исследуемых ферментов на фоне прогрессирования заболевания, в том числе наличия отдаленного и регионарного метастазирования. Наиболее перспективным является изучение активности  $\alpha$ -амилазы слюны для диагностики НЭО высокой степени злокачественности.*

Ключевые слова: слюна; ферменты; рак легкого; нейроэндокринные опухоли.

**Для цитирования:** Бельская Л.В., Косенок В.К., Массард Ж. Активность метаболитических ферментов слюны при нейроэндокринных опухолях легкого различной степени злокачественности. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (11): 677-682. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-677-682>

Bel'skaya L.V.<sup>1</sup>, Kosenok V.K.<sup>2</sup>, Massard Zh.<sup>3</sup>

### ACTIVITY OF METABOLIC ENZYMES OF SALIVA WITH NEUROENDOCRINE TUMORS OF THE LUNG OF VARIOUS DEGREES OF MALIGNANCY

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

<sup>2</sup>Omsk State Medical University, Omsk, 644099, Russian Federation;

<sup>3</sup>University Hospital of Strasbourg, Strasbourg

*Up to the present time, problems of optimizing the methods of diagnosis and predicting the course of lung cancer, which occupies the leading positions in the structure of oncological diseases, remain topical. The purpose of the study was to study the characteristics of the activity of metabolic salivary enzymes in neuroendocrine tumors of the lung, depending on the degree of malignancy. In the case-control study, 156 people took part, divided into 2 groups: primary (neuroendocrine lung tumors, n=56) and control (conventionally healthy, n=100). All the participants went through a questionnaire survey, saliva biochemical counts, and a histological verification of their diagnosis. Between-group differences were measured with the nonparametric test. It is shown that against the background of neuroendocrine lung tumors, metabolic changes are observed characterized by a decrease in the de Ritis coefficient ( $p=0.0350$ ) and lactate dehydrogenase activity ( $p=0.0492$ ), as well as an increase in activity of alanine aminotransferase ( $p=0.0114$ ), alkaline phosphatase ( $p=0.0150$ ) and  $\alpha$ -amylase ( $p=0.0328$ ). Statistically significant differences between neuroendocrine tumors of different degrees of malignancy (G1+G2 and G3) were detected for aminotransferases (ALT -  $p=0.0421$ ; AST -  $p=0.0472$ ); alkaline phosphatase ( $p=0.0454$ ) and  $\alpha$ -amylase ( $p=0.0263$ ). A decrease in the activity of the enzymes studied against the background of the progression of the disease, including the presence of distant and regional metastasis is shown. The most promising is the study of the activity of salivary  $\alpha$ -amylase for the diagnosis of neuroendocrine lung tumors of high degree of malignancy.*

Key words: saliva, enzymes, lung cancer; neuroendocrine tumors.

**For citation:** Bel'skaya L.V., Kosenok V.K., Massard Zh. Activity of metabolic enzymes of saliva with neuroendocrine tumors of the lung of various degrees of malignancy. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (11): 677-682 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-677-682>

**For correspondence:** Bel'skaya L.V., PhD in Chemistry, Head of laboratory; e-mail: [ludab2005@mail.ru](mailto:ludab2005@mail.ru)

#### Information about authors:

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

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

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

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

Received 14.08.2018  
Accepted 15.09.2018

Группа нейроэндокринных опухолей (НЭО) объединяет относительно редко встречающиеся эпителиальные новообразования, которые обладают способностью синтезировать биологически активные вещества и пептидные гормоны [1]. Наиболее часто новообразования данного типа возникают в различных отделах пищеварительного тракта и бронхопульмональной системе [2]. Среди всех нейроэндокринных новообразований 25–30% составляют НЭО легкого [3]. Согласно общепринятой классификации выделяют 4 основных подтипа НЭО легкого: типичный карциноид, атипичный карциноид, крупноклеточный и мелкоклеточный рак легкого [4]. В соответствии с современными представлениями, НЭО легкого различают по степени дифференцировки и степени злокачественности (G) [5, 6]. К группе с низкой степенью злокачественности (высокой степенью дифференцировки) относят типичные карциноиды (G1), промежуточной степени соответствуют атипичные карциноиды (G2), тогда как группа низкодифференцированных НЭО высокой степени злокачественности объединяет мелкоклеточный и крупноклеточный рак легкого (G3) [7, 8].

Диагностика НЭО легкого включает определение пептидных гормонов и биогенных аминов [9, 10], а также универсальных маркеров, таких как хромогранин А и нейронспецифическая енолаза [1, 11]. При этом применение перечисленных маркеров зачастую ограничивается мелкоклеточным раком легкого. Исследование биомаркеров не нейроэндокринной природы в отношении диагностики ограничено, в том числе мало внимания уделяется метаболическим ферментам [12]. В данном исследовании в качестве потенциально информативных выбраны следующие ферменты: щелочная фосфатаза (ЩФ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), аминотрансферазы (АЛТ, АСТ) и  $\alpha$ -амилаза. Следует отметить, что в литературе практически отсутствуют данные об активности данных ферментов как в общем, так и в зависимости от степени злокачественности НЭО легкого.

Активность ферментов традиционно определяют в сыворотке и плазме крови, однако перспективным является использование слюны [13]. Преимущества слюны по сравнению с венозной или капиллярной кровью обуславливаются неинвазивностью сбора и отсутствием риска инфицирования при получении биоматериала [14–16]. При этом слюна не только адекватно отражает биохимический статус и физиологическое состояние человека, но и является потенциально более информативной средой для использования ее как в клинической лабораторной диагностике, так и в специальных научных целях [17–19].

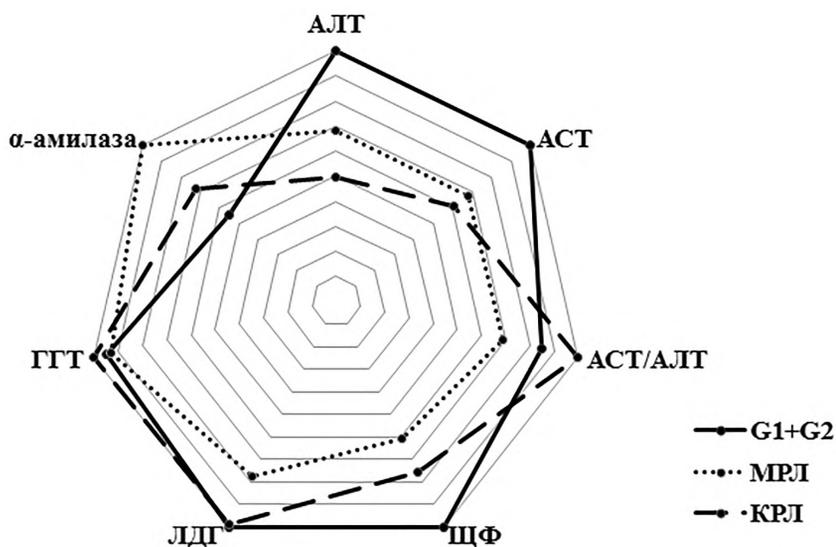
Цель исследования – изучение особенностей активности метаболических ферментов слюны при НЭО легкого в зависимости от степени злокачественности.

**Материал и методы.** В исследовании случай – контроль приняли участие добровольцы, которые были разделены на 2 группы: основную (с диагнозом рак НЭО легкого) и контрольную группу (условно

здоровые). Включение в группы происходило параллельно. В качестве критериев включения рассматривались: возраст пациентов 30–75 лет, отсутствие какого-либо лечения на момент проведения исследования, в том числе хирургического, химиотерапевтического или лучевого, отсутствие признаков активной инфекции (включая гнойные процессы), проведение санации полости рта. Критерии исключения: отсутствие гистологической верификации диагноза. Контрольная группа включала условно здоровых пациентов ( $n=100$ , возраст  $58,9 \pm 1,5$  года), у которых при проведении плановой диспансеризации не было выявлено патологии легких. Оценка биохимических параметров слюны пациентов контрольной группы проведена без дополнительного разбиения на подгруппы. Исследования одобрены на заседании комитета по этике БУЗ Омской области «Клинический онкологический диспансер» от 21 июля 2016 г., протокол № 15.

У всех участников до начала лечения проводили забор слюны в количестве 2 мл. Образцы слюны собирали утром натощак путем сплевывания в стерильные пробирки, центрифугировали при 7000 об/мин. Активность АЛТ и АСТ определяли колориметрическим динитрофенилгидразиновым методом по Райтману-Френкелю, ЩФ методом конечной точки по Бессею-Лоури-Броку, ЛДГ кинетическим УФ-методом по скорости окисления НАДН, ГГТ кинетическим методом с использованием L-гамма-глутамил-3-карбоксит-4-нитроанилида в качестве субстрата по Зейцу-Персину,  $\alpha$ -амилазы кинетическим методом по гидролизу CNP-олигосахарида с образованием 2-хлор-4-нитрофенола [20, 21]. Дополнительно оценивали значение коэффициента де Ритиса, рассчитанного как соотношение активности АСТ/АЛТ (у.е.).

Статистический анализ полученных данных выполнен при помощи программ Statistica 10.0 (StatSoft) и пакета R (версия 3.2.3) непараметрическим методом с использованием в зависимых группах критерия Вилкоксона, в независимых группах – U-критерия Манна-Уитни. Описание выборки производили с помощью под-



Сравнительная динамика активности метаболических ферментов для карциноидов, мелкоклеточного и крупноклеточного рака легкого.

Таблица 1

Описание исследуемой группы

Гистология	Число пациентов, %
Типичный карциноид (G1)	12 (21,4%)
Атипичный карциноид (G2)	3 (5,4%)
Мелкоклеточный рак (G3)	34 (60,7%)
Крупноклеточный рак (G3)	7 (12,5%)
Форма роста	
Центральный	21 (37,5%)
Периферический	24 (42,9%)
Медиастинальный	11 (19,6%)
pM	
M0	42 (75,0%)
M1	14 (25,0%)
pT	
T1	4 (9,5%)
T2	19 (45,2%)
T3	4 (9,5%)
T4	15 (35,8%)
pN	
N0	14 (33,3%)
N1-3	28 (66,7%)

счета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей [LQ; UQ]. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Корреляционный анализ произведен методом Спирмена.

**Результаты.** В исследование включены 56 пациентов Клинического онкологического диспансера г. Омска и 100 практически здоровых людей, выбранных в качестве контрольной группы. Детальное описание основной группы представлено в табл.1.

В ходе проведенных исследований установлено, что на фоне НЭО легкого наблюдается изменение активности метаболических ферментов слюны (табл.2). В частности, растет активность аминотрансфераз (АЛТ – на 22,3%, АСТ – на 2,1%), в результате наблюдается уменьшение коэффициента де Ритиса на 11,3% в основном за счет увеличения активности АЛТ. Также статистически

достоверно увеличивается активность ЩФ и  $\alpha$ -амилазы (+35,7 и +70,7% соответственно), тогда как активность ГГТ не меняется, а ЛДГ снижается на 15,3%.

Анализ активности метаболических ферментов для групп НЭО легкого разной степени злокачественности показал, что активность аминотрансфераз статистически достоверно выше для группы G1+G2, при этом полученные значения выше соответствующих показателей для контрольной группы, тогда как активность аминотрансфераз группы G3 и контрольной практически совпадают (табл.2, 3). Также показано, что активность ЛДГ, ГГТ и  $\alpha$ -амилазы группы G1+G2 и контрольной группы не отличаются, однако активность ЩФ статистически достоверно выше значений, характерных как для контрольной группы (+78,6%), так и для группы G3 (+61,3%). Группа НЭО легкого высокой степени злокачественности отличается уменьшением активности ЛДГ (-19,1%) и увеличением активности  $\alpha$ -амилазы (+72,1%) при постоянном уровне ГГТ (табл. 2).

При более детальном рассмотрении группы НЭО с высокой степенью злокачественности установлено, что активность большинства исследуемых ферментов ниже, чем для группы G1+G2, исключение составляет активность  $\alpha$ -амилазы, возрастающая в случае крупноклеточного и мелкоклеточного рака на 31,0 и 80,7% соответственно (см.рисунок). Дополнительно следует отметить увеличение коэффициента де Ритиса для крупноклеточного рака легкого (+17,7%) в основном за счет уменьшения активности АЛТ (-50,3%,  $p=0.0232$ ). Для крупноклеточного рака легкого также характерно максимальное значение активности ГГТ (22,4 Е/л). В целом для мелкоклеточного рака активность ГГТ, ЛДГ и ЩФ ниже, чем для крупноклеточного, тогда как для аминотрансфераз и  $\alpha$ -амилазы отмечена обратная тенденция.

На следующем этапе исследовано влияние формы роста НЭО легкого на активность метаболических ферментов слюны (табл.4). Показано, что минимальная активность аминотрансфераз наблюдается для медиастинальной формы роста и в этом случае значения максимально близки к контрольным, включая рассчитанный коэффициент АСТ/АЛТ. Активность ЩФ, ЛДГ и  $\alpha$ -амилазы также минимальна, однако для ГГТ выявлены максимальные значения активности среди всех исследуемых групп (+17,6% относительно контрольной группы). Для периферической формы роста отмечены максимальные значения активности всех ферментов за исключением  $\alpha$ -амилазы. При этом в большинстве случаев выявленные различия с центральным раком легкого статистически достоверны, а для активности ЛДГ подтверждены отличия и от медиастинальной формы роста. Центральные НЭО лёгкого характеризуются минимальным значением коэффициента де Ритиса (-18,5%) и максимальной активностью  $\alpha$ -амилазы (+172,2% по сравнению с контрольной группой).

При прогрессировании заболевания уменьшается активность аминотрансфераз до стадии T<sub>3</sub>N<sub>0-3</sub>M<sub>0</sub>, затем остается примерно постоянной, при этом значение коэффициента де Ритиса в этом же направлении растет, достигая максимума при T<sub>3</sub>N<sub>0-3</sub>M<sub>0</sub>, а затем резко снижается (табл. 5). Также при увеличении размера первичной опухоли уменьшается активность ЩФ и ЛДГ, причем наиболее существенное уменьшение активности происходит вплоть до стадии T<sub>3</sub>N<sub>0-3</sub>M<sub>0</sub>, а затем меняется незначительно. Для ГГТ отмечена обратная тенденция: до стадии T<sub>3</sub>N<sub>0-3</sub>M<sub>0</sub> активность практически не меняется, а

Таблица 2

Активность метаболических ферментов при НЭО легкого

Показатель, Е/л	Контроль, n=100	НЭО, n=56	p-value
АЛТ	3,46 [2,38; 4,85]	4,23 [2,77; 6,65]	0,0114
АСТ	5,67 [3,33; 7,75]	5,79 [3,71; 9,38]	-
АСТ/АЛТ	1,51 [1,18; 2,06]	1,34 [1,08; 1,78]	0,0350
ЩФ	60,84 [43,46; 86,92]	82,57 [54,33; 117,34]	0,0150
ЛДГ	1366,0 [819,0; 2054,0]	1156,5 [574,6; 1777,3]	0,0492
ГГТ	21,0 [18,1; 25,2]	21,0 [19,1; 25,1]	-
$\alpha$ -амилаза	233,4 [124,4; 480,4]	398,3 [175,7; 617,1]	0,0328

Таблица 3

**Активность метаболических ферментов в зависимости от степени злокачественности**

Показатель, Е/л	G1+G2	G3	p-value
АЛТ	4,31 [3,00; 6,46]	3,96 [2,23; 5,78]	0,0421
АСТ	7,00 [4,25; 9,25]	5,63 [3,63; 8,29]	0,0472
АСТ/АЛТ	1,37 [1,17; 1,80]	1,33 [1,05; 1,71]	-
ЩФ	108,65 [73,88; 147,76]	67,36 [51,07; 102,13]	0,0454
ЛДГ	1405,0 [697,8; 2319,0]	1136,0 [481,9; 1596,5]	-
ГГТ	21,3 [14,5; 23,6]	20,8 [19,2; 25,7]	-
$\alpha$ -амилаза	242,3 [160,8; 599,0]	417,0 [250,4; 635,2]	0,0263

затем резко увеличивается. Активность  $\alpha$ -амилазы закономерно увеличивается в направлении от  $T_2N_{0,3}M_0$  до  $T_4N_{0,3}M_0$  (табл. 5).

Наличие отдаленного и регионарного метастазирования вносит существенный вклад в изменение активности метаболических ферментов (табл. 6). Так, в обоих случаях снижается коэффициент де Ритиса (-14,7 и -13,5%), активность ЩФ (-38,0 и 43,0%), ЛДГ (-26,1 и -14,0% для  $N_{1,3}M_0$  и  $N_{1,3}M_1$  соответственно). Активность  $\alpha$ -амилазы и в том, и в другом случае растет, однако при наличии как отдаленного, так и регионарного метастазирования активность  $\alpha$ -амилазы практически в 2 раза выше, чем только при метастазировании в лимфоузлы. Диспропорционально меняется активность ГГТ: растет при  $N_{1,3}M_0$  (+8,1%) и снижается при  $N_{1,3}M_1$  (-4,8%).

**Результаты.** На фоне НЭО легкого наблюдаются метаболические изменения, характеризующиеся уменьшением коэффициента де Ритиса за счет повышения активности АЛТ на фоне повышения активности ЩФ и  $\alpha$ -амилазы, а также понижения активности ЛДГ (табл.2). Повышение активности АЛТ также можно рассматривать как усиление роли аланингликозного пути с выбросом из клеток глюкозы за счет ее дефосфорилирования

при высокой активности ЩФ [22, 23]. Известно, что ЩФ участвует в процессах трансмембранного фосфорилирования, обеспечивая наряду с гормональной системой вход и выход глюкозы в клетки, что напрямую влияет на уровень глюкозы в крови, играет роль в поддержании уровня фосфатов, необходимых для биоэнергетики. В связи с этим наблюдается торможение конечных путей обмена глюкозы, о чем говорит низкая активность АСТ, участвующая в понижении коэффициента де Ритиса. Подобные изменения ферментативной активности могут отражать стимуляцию периферических зон обмена, особенно белкового, на фоне торможения центральных путей метаболизма. В ряде исследований показано, что предоперационное значение коэффициента де Ритиса представляет собой независимый прогностический фактор для рака почки [24, 25]. В частности, значение коэффициента более 1.50 считается прогностически неблагоприятным признаком. Однако, при определении активности аминотрансфераз в слюне, а не сыворотке крови, нами получены противоположные данные. Показано, что на фоне НЭО легкого значение коэффициента де Ритиса статистически достоверно уменьшается, подобный эффект был ранее показан для немелкоклеточного рака легкого (1.27 [0.93; 1.70] для аденокарциномы и 1.19 [0.95; 1.61] для плоскоклеточного рака легкого) [21]. При этом максимальное уменьшение коэффициента де Ритиса отмечено для распространенных форм рака легкого, а также на фоне отдаленного и регионарного метастазирования (табл.4-6).

Анализ активности ЛДГ показал, что НЭО легкого характеризуется понижением активности данного фермента (табл.2), причем снижение активности в основном обусловлено вкладом мелкоклеточного рака легкого (табл.3). Максимальная активность ЛДГ соответствует периферической форме роста опухоли, при прогрессировании заболевания равномерно уменьшается (табл. 4, 5). Известно, что высокий уровень ЛДГ в сыворотке крови при раке легкого является прогностически неблагоприятным признаком и ассоциирован с незначительным

Таблица 4

**Влияние формы роста НЭО легкого на активность ферментов**

Показатель, Е/л	Медиастинальный (1)	Центральный (2)	Периферический (3)
АЛТ	3,38 [1,38; 6,46]	4,31 [3,92; 6,77]	4,38 [3,23; 6,80]
	-	$p_{1,2}=0,0486$	-
АСТ	5,50 [1,33; 10,25]	5,75 [4,20; 8,50]	6,75 [3,75; 9,42]
АСТ/АЛТ	1,54 [0,95; 1,90]	1,23 [1,07; 1,43]	1,52 [1,17; 1,86]
	-	-	$p_{2,3}=0,0492$
ЩФ	65,19 [54,33; 86,92]	67,36 [39,11; 106,48]	99,96 [60,84; 134,73]
	-	-	$p_{2,3}=0,0182$
ЛДГ	1148,0 [482,8; 1389,0]	906,8 [331,7; 1448,0]	1599,5 [1062,0; 2281,0]
	-	-	$p_{2,3}=0,0438, p_{1,3}=0,0409$
ГГТ	24,7 [20,8; 31,1]	20,8 [18,5; 24,8]	20,5 [17,3; 23,6]
	-	-	$p_{1,3}=0,0105$
$\alpha$ -амилаза	300,0 [121,3; 1107,0]	635,2 [417,0; 796,8]	317,4 [160,8; 530,1]
	-	-	$p_{2,3}=0,0382$

ответом на проводимую терапию [26, 27]. Как фермент, участвующий в анаэробном метаболизме, ЛДГ может влиять на злокачественный потенциал опухоли посредством различных механизмов, в частности увеличения пролиферации, жизнеспособности и инвазивной способности опухолевых клеток, а также уменьшения апоптоза [28, 29]. Расхождения с литературными данными могут быть связаны с использованием слюны в качестве биосубстрата, а также с определением суммарного содержания всех изоферментов ЛДГ, что не позволяет в полной мере оценить вклад ЛДГ5 как наиболее перспективного в диагностическом плане [30].

Активность ЩФ статистически достоверно выше на фоне НЭО легкого, чем для контрольной группы, что коррелирует с литературными данными [31, 32]. Дополнительно показано различие уровня ЩФ между опухолями разной степени злокачественности, а именно: повышенная активность ЩФ для карциноидных опухолей легкого. Однако, как и в случае ЛДГ, максимальная активность отмечена для периферической формы роста, при прогрессировании заболевания актив-

Таблица 5

Активность метаболических ферментов в зависимости от размера опухоли

Показатель, Е/л	T <sub>1</sub> N <sub>0-3</sub> M <sub>0</sub>	T <sub>2</sub> N <sub>0-3</sub> M <sub>0</sub>	T <sub>3</sub> N <sub>0-3</sub> M <sub>0</sub>	T <sub>4</sub> N <sub>0-3</sub> M <sub>0</sub>
АЛТ	8,33 [4,96; 25,68]	4,08 [2,08; 7,92]	3,38 [2,38; 5,88]	3,38 [1,77; 5,38]
	-	-	<i>p</i> =0,0492	<i>p</i> =0,0357
АСТ	13,82 [5,54; 33,94]	6,17 [3,58; 9,83]	5,42 [2,92; 10,58]	5,50 [2,33; 7,08]
АСТ/АЛТ	1,21 [1,06; 1,55]	1,52 [1,11; 1,80]	1,55 [1,21; 1,79]	1,32 [1,02; 1,86]
ЩФ	115,17 [68,45; 161,89]	99,96 [65,19; 134,73]	70,62 [53,24; 91,27]	67,36 [52,15; 117,34]
ЛДГ	1843,0 [844,0; 2389,5]	1326,0 [906,8; 1941,0]	1072,9 [445,0; 1649,0]	996,9 [400,8; 1407,0]
ГГТ	20,9 [16,9; 24,0]	21,1 [18,4; 25,2]	21,1 [19,6; 22,9]	23,9 [19,4; 30,8]
α-амилаза	Нет данных	242,3 [78,5; 379,5]	383,3 [250,4; 796,8]	530,1 [190,6; 599,0]

ность ЩФ снижается. Данный факт объясняется тем, что локальные стадии заболевания без регионарных и отдаленных метастазов составляют в основном опухоли типа G1+G2, для которых активность ЩФ выше.

Известно, что клетки нормального легкого способны продуцировать α-амилазу, причем доказано, что речь идет именно о слюнной, а не панкреатической α-амилазе [33]. В частности, повышенная экспрессия α-амилазы характерна для аденокарциномы легкого [34, 35]. В подавляющем большинстве исследований активность α-амилазы определяли в ткани опухоли после хирургического лечения или биопсии, в редких случаях в сыворотке крови [36], однако ни в одном из исследований для этой цели не использовали слюну человека. В ходе данного исследования показано, что активность α-амилазы, определяемая в слюне, статистически достоверно увеличивается при НЭО легкого (*p*=0,0328). При этом наблюдается тенденция увеличения активности α-амилазы с ростом степени злокачественности, достигая максимальных значений при мелкоклеточном раке легкого. Также установлено увеличение активности данного фермента при центральной форме роста опухоли и прогрессировании заболевания, в частности наличии отдаленного и регионарного метастазирования. Интересно, что при НЭО активность α-амилазы слюны на 12,3% выше, чем на фоне аденокарциномы, о чем имеются единичные сведения в литературе [21, 37]. Повышение активности слюнной α-амилазы может быть ответом на развитие системной эндогенной интоксикации, которая более выражена в случае НЭО, в особенности мелкоклеточного рака легкого [38].

ГГТ также составляет одну из детоксицирующих систем организма, он принимает участие в разрушении серотонина, гистамина, а также протеолизе денатурированных белков, что позволяет рассматривать его, как маркер интоксикации [39]. Статистически достоверное по-

вышение активности ГГТ выявлено на стадии T<sub>4</sub>N<sub>0-3</sub>M<sub>0</sub>, при наличии регионарного метастазирования, а также при медиастинальной форме роста НЭО легкого (табл.4-6). Увеличение активности ГГТ может быть связано с повышенным образованием активных форм кислорода опухолевой тканью [40, 41]. Тем не менее различий активности ГГТ слюны в зависимости от степени злокачественности рака легкого не выявлено (табл.2).

В целом, при прогрессировании заболевания сохраняется общая тенденция в динамике исследуемых параметров (табл. 5, 6). Активность ферментов максимальна на ранних стадиях заболевания и уменьшается вплоть до появления отдаленных метастазов. Исключение составляют α-амилаза и ГГТ. Как было показано ранее, это может быть связано с увеличением в данном направлении уровня эндогенной интоксикации [42].

Ограничения проведенного исследования связаны с небольшим числом ферментов, включенных в исследование, в частности перспективным является рассмотрение активности антиоксидантных ферментов, а также изоферментов ЛДГ и ЩФ для уточнения и расширения выявленных закономерностей. Интересным является обоснование применения полученных результатов для мониторинга течения заболевания, что требует изучения динамики исследуемых параметров на фоне различных видов лечения, в том числе химиотерапевтического и лучевого.

**Заключение.** На фоне НЭО легкого наблюдается изменение активности метаболических ферментов. Статистически достоверные отличия между опухолями разной степени злокачественности выявлены для аминотрансфераз, ЩФ и α-амилазы. Показано уменьшение активности исследуемых ферментов на фоне прогрессирования заболевания, в том числе наличия отдаленного и регионарного метастазирования. Наиболее перспективным, на наш взгляд, является изучение активности α-амилазы слюны для диагностики мелкоклеточного рака легкого.

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

Таблица 6

Активность ферментов слюны в зависимости от наличия/отсутствия отдаленного и регионарного метастазирования

Показатель, Е/л	N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> (1)	N <sub>1-3</sub> M <sub>0</sub> (2)	N <sub>1-3</sub> M <sub>1</sub> (3)
АЛТ	4,46 [3,38; 6,46]	3,85 [2,08; 5,50]	4,88 [4,00; 6,46]
	-	-	<i>p</i> <sub>2-3</sub> =0,0498
АСТ	6,50 [4,25; 9,25]	5,38 [3,04; 7,46]	6,54 [4,58; 9,33]
АСТ/АЛТ	1,56 [1,17; 1,80]	1,33 [1,08; 1,75]	1,35 [0,97; 1,59]
ЩФ	108,65 [82,57; 147,76]	67,36 [56,50; 117,34]	61,93 [36,94; 84,75]
	-	<i>p</i> <sub>1-2</sub> =0,0464	<i>p</i> <sub>1-3</sub> =0,0082
ЛДГ	1434,5 [1062,0; 2281,0]	1060,5 [441,8; 1613,0]	1233,0 [535,7; 1583,0]
	-	<i>p</i> <sub>1-2</sub> =0,0417	-
ГГТ	20,9 [18,4; 23,6]	22,6 [18,8; 26,5]	19,9 [19,2; 21,0]
α-амилаза	242,3 [160,8; 599,0]	349,6 [121,3; 477,1]	609,3 [458,8; 924,3]

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

ЛИТЕРАТУРА (пп.2-19, 21-41 см. REFERENCES)

1. Кушлинский Н.Е., Красильников М.А. *Биологические маркеры опухолей: фундаментальные и клинические исследования*. М.: Издательство РАМН; 2017.
20. Клиническая биохимия. Сборник инструкций. Новосибирск: ЗАО «Вектор-Бест»; 2011.
42. Бельская Л.В., Косенок В.К., Массард Ж., Завьялов А.А. Состояние показателей липопероксидации и эндогенной интоксикации у больных раком легкого. *Вестник РАМН*. 2016; 71(4): 313-22.

REFERENCES

1. Kushlinskiy N.Ye., Krasil'nikov M.A. Biological markers of tumors: fundamental and clinical studies. Moscow: Izdatel'stvo RAMN; 2017. (in Russian)
2. Asamura H., Kameya T., Matsuno Y., Noguchi M., Tada H., Ishikawa Y., Yokose T., Jiang S.X., Inoue T., Nakagawa K., Tajima K., Nagai K. Neuroendocrine neoplasms of the lung: a prognostic spectrum. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24(1): 70-6.
3. Gustafson B.I., Kidd M., Chan A., Malfertheiner M.V., Modlin I.M. Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer*. 2008; 113(1): 5-21.
4. Travis W.D., Brambilla E., Burke A.P., Marx a., Nicholson A.G. WHO Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon: IARC; 2015.
5. Rekhtman N. Neuroendocrine Tumors of the Lung: an update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2010; 134(11): 1628-38.
6. Hendifar A.E., Marchevsky A.M., Tuli R. Neuroendocrine Tumors of the Lung: Current Challenges and Advances in the Diagnosis and Management of Well-Differentiated Disease. *Journal of Thoracic Oncology*. 2017; 12(3): 425-36.
7. Wolin E.M. Advances in the Diagnosis and Management of Well-Differentiated and Intermediate Differentiated Neuroendocrine Tumors of the Lung. *CHEST*. 2017; 151(5):1141-6.
8. Kim J.Y., Hong S.-M., Ro J.Y. Recent updates on grading and classification of neuroendocrine tumors. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2017; 29: 11-6.
9. Miękus N., Bączek T. Non-invasive screening for neuroendocrine tumors—Biogenic amines as neoplasm biomarkers and the potential improvement of “gold standards”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016; 130: 194–201.
10. Korse C.M., Buning-Kager J.C.G.M., Linders T.C., Heijboer A.C., van den Broek D., Tesselaar M.E.T., van Tellingen O., van Rossum H.H. A serum and platelet-rich plasma serotonin assay using liquid chromatography tandem mass spectrometry for monitoring of neuroendocrine tumor patients. *Clinica Chimica Acta*. 2017; 469:130–5.
11. Chan D.L., Clarke S.J., Diakos C.I., Roach P.J., Bailey D.L., Singh S., Pavlakis N. Prognostic and predictive biomarkers in neuroendocrine tumor's. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017; 113:268–82.
12. Buccheri G., Ferrigno D. Serum biomarkers of non-neuron-endocrine origin in small-cell lung cancer: a 16-year study on carcinoembryonic antigen, tissue polypeptide antigen and lactate dehydrogenase. *Lung cancer*. 2000; 30: 37-49.
13. Wong D.T. Salivary Diagnostics. Wiley-Blackwell: 2008.
14. Malathi N, Mythili S, Vasanthi HR. Salivary Diagnostics: A Brief Review. *ISRN Dentistry*. 2014; 2014:158786.
15. Miller C.S, Foley J.D., Bailey A.L., Campell C.L., Humphries R.L., Christodoulides N., Floriano P.N. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark. Med.* 2010; 4(1): 171–89.
16. Nunes L.A., Mussavira S, Bindhu O.S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem. Med. (Zagreb)*. 2015; 25(2): 177–92.
17. Liu J., Duan Y. Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncology*. 2012;48: 569-77.
18. Arunkumar S, Arunkumar J.S., Krishna N.B., Shakunthala G.K. Developments in diagnostic applications of saliva in oral and systemic diseases - A comprehensive review. *Journal of Scientific and Innovative Research*. 2014; 3(3): 372-87.
19. Shipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of Oral Biology*. 2007; 52: 1114-35.
20. Clinical biochemistry. Collection of instructions [Klinicheskaya biokhimiya. Sbornik instruksiy]. Novosibirsk: ZAO «Vektor-Best»; 2011. (in Russian)
21. Bel'skaya L.V., Kosenok V.K. The activity of metabolic enzymes in the saliva of lung cancer patients. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*. 2017; 7(6): 646-53.
22. Elf S.E., Chen J. Targeting glucose metabolism in patients with cancer. *Cancer*. 2014; 120: 774.
23. Vander Heiden M.G., Cantley L.C, Thompson C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009; 324: 1029.
24. Bezan A., Mrcic E., Krieger D., Stojakovic T., Pummer K., Zigeuner R., Hutterer G.C., Pichler M. The Preoperative AST/ALT (De Ritis) Ratio Represents a Poor Prognostic Factor in a Cohort of Patients with Nonmetastatic Renal Cell Carcinoma. *The Journal of Urology*. 2015; 194: 30-5.
25. Lee H., Choi Y.H., Sung H.H., Han D.H., Jeon H.G., Jeong B.C., Seo S.I., Jeon S.S., Lee H.M., Choi H.Y. De Ritis ratio (AST/ALT) as a significant prognostic factor in patients with upper tract urothelial cancer treated with surgery. *Clinical Genitourinary Cancer*; 2016.
26. Huijgen H.J., Sanders G., Koster R.W., Vreeken J., Bossuyt P. The clinical value of lactate dehydrogenase in serum: a quantitative review. *Eur. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1997; 35(8): 569-79.
27. Hermes A., Gatzemeier U., Waschki B., Reck M. Lactate dehydrogenase as prognostic factor in limited and extensive disease stage small cell lung cancer – A retrospective single institution analysis. *Respiratory Medicine*. 2010; 104: 1937-42.
28. Wang Z-X., Yang L-., Qiu M-Z., Wang Z-Q., Zhou Y-X., Wang F., Zhang D-S., Wang F-H., Li Y-H., Xu R-H. Prognostic value of preoperative serum lactate dehydrogenase levels for resectable gastric cancer and prognostic nomograms. *Oncotarget*. 2016; 26(7): 945-56.
29. Yao F., Zhao T., Zhong C., Zhu J., Zhao H. LDHA is necessary for the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma. *Tumor Biology*. 2013; 34: 25-31.
30. Augoff K., Hryniewicz-Jankowska A., Tabola R. Lactate dehydrogenase 5: An old friend and a new hope in the war on cancer. *Cancer Letters*. 2015; 358(1): 1-7.
31. Malathi M., Shrinivas B.R. Relevance of serum alkaline phosphatase as a diagnostic aid in lung pathology. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 2001; 45(1): 119-21.
32. Dokic-Lisanin M., Pantovic V., Jovanovic Z., Samardzic G., Jurisic V. Values of alkaline phosphatase and their isoenzyme profiles in patients with cancer in respect to bone and liver metastasis. *Arch. Oncol.* 2013; 21(1): 14-6.
33. Nakamura Y., Tomita N., Nishide T., Emi M., Horii A., Ogawa M., Mori T., Kosaki G., Okabe T., Fujisawa M., Ohsawa N., Kameya T., Matsubara K. Production of salivary type  $\alpha$ -amylase in human lung cancer. *Gene*. 1989; 77: 107-12.
34. Lenler-Petersen P., Grove A., Brock A., Jernes R. Alpha-amylase in resectable lung cancer. *Eur. Respir. J.* 1994; 7: 941-5.
35. Turkeli S., Atici A.G., Kayhan S., Yilmaz Y.A. Analysis of pleural amylase levels in chest disease clinic. *Journal of Experimental and Clinic Medicine*. 2013; 30: 349-52.
36. Sakai M., Yamamoto T., Onizuka M., Sakakibara Y., Noguchi M. A direct measurement of serum amylase levels produced by lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* 2005; 79:1409-11.
37. Wang H., Wu Q. A case of amylase-producing small cell lung cancer. *Clinical Biochemistry*. 2016; 49(7-8): 613-6.
38. Grigoleit J-S., Kullmann J.S., Overbeck R., Schedlowski M., Engler H. Salivary  $\alpha$ -amylase response to endotoxin administration in humans. *Psychoneuroendocrinology*. 2013; 38: 1819-23.
39. Whitfield J.B. Gamma Glutamyl Transferase. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2001; 38(4): 263-355.
40. Pompella A., De Tata V., Paolicchi A., Zunino F. Expression of  $\gamma$ -glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochemical Pharmacology*. 2006; 71: 231-8.
41. Van Hemelrijck M., Jassem W., Walldius G., Fentiman I.S., Hammar N., Lambe M., Garmo H., Jungner I., Holmberg L. Gamma-glutamyltransferase and risk of cancer in a cohort of 545,460 persons – the Swedish AMORIS study. *European Journal of Cancer*. 2011; 47: 2033-41.
42. Bel'skaya L.V., Kosenok V.K., Massard Zh., Zav'yalov A.A. Status Indicators of Lipid Peroxidation and Endogenous Intoxication in Lung Cancer Patients. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2016; 71(4): 313-22. (in Russian)

Поступила 14.08.18

Принята к печати 15.09.18

© САНДАКОВ Я.П., 2018

УДК 616-036.12-06:616-008.9]-085

Сандаков Я.П.

## НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ НЕИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ И СПОСОБЫ ИХ КОРРЕКЦИИ В ХОДЕ ДИСПАНСЕРИЗАЦИИ

Диагностический центр № 3 Департамента здравоохранения г. Москвы, 109444, Москва, Россия

Проведен сравнительный анализ до и после проведения воздушной криотерапии следующих показателей: общее количество холестерина с помощью набора реагентов CHOL\_2 на автоматическом биохимическом анализаторе ADVIA 2400 (Siemens, США), глюкозы с помощью набора реагентов Glucose Hexokinase II на автоматическом биохимическом анализаторе ADVIA 2400 (Siemens), холестерина липопротеидов низкой плотности с помощью набора реагентов L-HDL на автоматическом биохимическом анализаторе ADVIA 2400 (Siemens). Количество окисленных липопротеинов (ЛП) определяли по методу Музы Г.И., количество резистентных к окислению ЛП по методу Рагино Ю.И. В клиническую группу вошли 30 человек с верифицированным диагнозом метаболический синдром, средний возраст которых составил 45,3±3,7 лет. Пациенты клинической группы получали курс криотерапии по методике, включающей нахождение в предварительной камере при t<sup>0</sup> –60°С в течение 30 секунд, затем в основной камере при t<sup>0</sup> –110–120°С в течение 180 секунд. Процедуры отпускались повторно с интервалом 20 минут, ежедневно в течение 10 дней. Статистическую обработку полученных данных проводили согласно общепринятым методам с определением средней арифметической, ошибки средней с использованием программы STADIA версия 6.0. О достоверности различия показателей клинической группы до и после коррекции судили по величине t-критерия Стьюдента после проверки распределения на нормальность. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности p<0,05. У пациентов клинической группы с метаболическим синдромом до лечения обнаружены повышенный уровень общего холестерина сыворотки на 24,3% и глюкозы на 12,8% относительно показателей нормы. После проведения курса общей воздушной криотерапии снизилось общее количество липопротеинов низкой плотности на 15,47%, общего холестерина сыворотки на 32,3% при одновременном менее значимом снижении уровня глюкозы сыворотки на 11,8% относительно показателей, зарегистрированных в клинической группе до начала криотерапии.

**Ключевые слова:** метаболический синдром; коррекция нарушений метаболизма; диспансеризация; криотерапия.

**Для цитирования:** Сандаков Я.П. Нарушения метаболизма при хронических неинфекционных заболеваниях и способы их коррекции в ходе диспансеризации. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63 (11): 683-685. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-683-685>

Sandakov Ya.P.

### METABOLIC DISORDERS IN CHRONIC NON-COMMUNICABLE DISEASES AND WAYS OF THEIR CORRECTION DURING THE MEDICAL EXAMINATION OF THE POPULATION

Diagnostic center № 3 of Moscow City Health Department, 109444, Russia, Moscow

In the study, comparative analysis before and after the air cryotherapy for the following parameters: total cholesterol (using a set of reagents CHOL\_2, automatic biochemical analyzer ADVIA 2400( Siemens), glucose (using a set of reagents Glucose Hexokinase II, automatic biochemical analyzer ADVIA 2400 (Siemens), cholesterol of low-density lipoproteins (using the set of reagents of L-HDL, automatic biochemical analyzer ADVIA 2400 (Siemens). The number of oxidized lipoproteins (LP) was determined by the method of the Muzya G. I., the amount of LP resistant to oxidation was determined by the Ragino Yu.I. The clinical group consisted of 30 people with a verified diagnosis of metabolic syndrome, the average age of which was 45.3±3.7 years. Patients of the clinical group received a course of cryotherapy by the method, including the presence in the pre –chamber at t<sup>0</sup> –600C for 30 seconds, then in the main chamber at t<sup>0</sup> –110–1200C for 180 seconds. Procedures were released again with an interval of 20 minutes, daily within 10 days. Statistical processing of the obtained data was carried out according to conventional methods with the determination of the arithmetic mean, the mean error using the program STADIA version 6.0. The significance of differences in the clinical group before and after the correction was judged by the Student's t-test value after checking the distribution for normality. Differences corresponding to the probability error p<0.05 were considered statistically significant. In patients of the clinical group with metabolic syndrome before treatment, elevated levels of total serum cholesterol by 24.3% and glucose by 12.8% relative to normal values were found. After the course of General air cryotherapy, the total number of low-density lipoproteins decreased by 15.47%, total serum cholesterol by 32.30%, while the serum glucose level decreased by 11.8% compared to the indicators registered in the clinical group before cryotherapy.

**Key words:** metabolic syndrome; correction of metabolic disturbances; medical examination of the population; cryotherapy.

**For citation:** Sandakov Ya.P. Metabolic disorders in chronic non-communicable diseases and ways of their correction during the medical examination of the population. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics).2018; 63 (11): 683-685 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-683-685>

**For correspondence:** Sandakov Ya. P., PhD (Medical), Deputy chief physician for medical direction; e-mail: sand\_2004@mail.ru

**Information about author:**

Sandakov Ya. P., <http://orcid.org/0000-0002-3976-9509>

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

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

Received 07.11.2018  
Accepted 29.11.2018

Для корреспонденции: Сандаков Яков Павлович, канд. мед. наук, зам.глав. врача по медицинской части; e-mail: sand\_2004@mail.ru

**Введение.** С целью раннего выявления хронических неинфекционных заболеваний (состояний), которые являются основной причиной инвалидности и преждевременной смертности населения Российской Федерации, а также основных факторов риска их развития (повышенный уровень артериального давления, повышенный уровень в крови общего холестерина, повышенный уровень глюкозы в крови, курение табака, пагубное потребление алкоголя, нерациональное питание, низкая физическая активность, избыточная масса тела, ожирение) проводится углубленное обследование состояния здоровья граждан в рамках диспансеризации [1,2]. Классическим примером, в котором сочетаются указанные риски, является наличие у пациента метаболического синдрома (МС). Основным клиническим признаком МС является абдоминальное ожирение (окружность талии/объем бёдер у мужчин более 0,9 и у женщин более 0,85). Дополнительные критерии МС: артериальная гипертензия (АД более 140/90 мм.рт.ст.), повышение уровня холестерина липопротеидов низкой плотности (ХСЛПНП) более 3,0 ммоль/л, триглицеридов более 1,7 ммоль, уровня глюкозы натощак более 6,1 ммоль/л. Наличие МС в 3–6 раз повышает риск развития как сахарного диабета 2 типа, так и артериальной гипертензии. МС ассоциируется с субклиническим поражением жизненно важных органов, что проявляется в снижении фильтрационной функции почек, микроальбуминурии, повышении жесткости артерий, гипертрофии миокарда левого желудочка, диастолической дисфункции, увеличении размеров полости левого желудочка, утолщении стенки сонной артерии, причём многие из этих нарушений проявляются независимо от наличия артериальной гипертензии. В то же время эти изменения являются обратимыми, при соответствующем лечении можно добиться уменьшения выраженности основных проявлений МС. Например, применение современных физиотерапевтических методов, таких как криотерапия в различных областях показало, что эта методика оказывает на организм неспецифичное корригирующее действие на адаптационный потенциал организма. Доказано, что криотерапевтическое воздействие вызывает в организме процесс автокоррекции, при котором выявляются и устраняются отклонения от физиологической нормы [3]. В этой связи целью исследования стала оценка результатов коррекции метаболических нарушений путем неинвазивного метода воздушной криотерапии у лиц с хроническими неинфекционными заболеваниями, выявленными в ходе диспансеризации.

**Материал и методы.** В качестве способа коррекции нарушений метаболизма был предложен неинвазивный метод физиотерапевтического лечения в виде общей воздушной криотерапии. Клиническая группа была сформирована на основании результатов диспансеризации. В нее вошли 30 человек с верифицированным диагнозом метаболический синдром, средний возраст которых составил  $45,3 \pm 3,7$  лет. Пациенты клинической группы получали курс криотерапии по методике, включающей нахождение в предварительной камере при  $t^0 -60^{\circ}\text{C}$  в течение 30 с, затем в основной камере при  $t^0 -110-120^{\circ}\text{C}$  в течение 180 секунд. Процедуры общей воздушной криотерапии пациентам с МС проводили под врачебным контролем после проведения инструктажа и оценки общего состояния пациентов. Процедуры проводились повторно с интервалом 20 мин, ежеднев-

но в течение 10 дней. Группа обследуемых была сформирована согласно правилам проведения клинических испытаний (GSP), после получения информированного согласия. Клинические исследования выполнены в соответствии с Хельсинской декларацией. Материалом для исследования выбрана сыворотка венозной крови, взятая натощак. Забор крови осуществлялся до начала курса общей воздушной криотерапии и на 10-е сут от начала воздействия. Для достижения поставленной цели в сыворотке крови определяли общее количество холестерина с помощью набора реагентов CHOL\_2 на автоматическом биохимическом анализаторе ADVIA 2400 (Siemens, США), глюкозы с помощью набора реагентов Glucose Hexokinase II на автоматическом биохимическом анализаторе ADVIA 2400 (Siemens, США), холестерина липопротеинов низкой плотности с помощью набора реагентов L-HDL на автоматическом биохимическом анализаторе ADVIA 2400 (Siemens, США). Количество окисленных липопротеинов (ЛП) определяли по методу Г.И. Музы [4] и количество резистентных к окислению ЛП по Ю.И. Рагино [5]. Статистическую обработку полученных данных проводили согласно общепринятым методам с определением средней арифметической, ошибки средней с использованием программы STADIA версия 6.0 [6]. О достоверности различия показателей клинической группы до и после коррекции судили по величине t-критерия Стьюдента после проверки распределения на нормальность. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности  $p < 0,05$ .

**Результаты.** В ходе проведенной диспансеризации и последующего клинико-лабораторного исследования метаболического обеспечения установлено, что у пациентов клинической группы с метаболическим синдромом до лечения имеет место выраженный рост как окисленно-модифицированных липопротеинов (ЛП) на 61,03%, так и резистентных к окислению ЛП – на 39% на фоне значительного повышения количества общих липопротеинов низкой плотности сыворотки на 25,2% относительно показателей нормы. Необходимо указать, что имеет место также повышенный уровень общего холестерина сыворотки на 24,3% и глюкозы на 12,8% относительно показателей нормы.

После проведения курса процедур общей воздушной криотерапии у пациентов клинической группы с метаболическим синдромом отмечается продолжающийся рост уровня окисленно-модифицированных ЛП на 74,1% на фоне менее выраженного роста резистентных к окислению ЛП – на 18,33%. При этом общее количество липопротеинов низкой плотности после проведения курса общей воздушной криотерапии снизилось на 15,47%. Выявлено также снижение общего холестерина сыворотки на 32,3% при одновременном менее значимом снижении уровня глюкозы сыворотки на 11,8% относительно клинической группы до начала криотерапии.

**Заключение.** Ретроспективный анализ сведений из Единой медицинской информационно-аналитической системы за 2017 г. по ДЦ № 3 ДЗМ г. Москвы показал, что впервые выявленные болезни системы кровообращения были верифицированы у 48% прошедших диспансеризацию, а болезни эндокринной системы – у 17,7%. Высокий и очень высокий абсолютный суммарный сердечно-сосудистый риск установлен у 22,6% из числа завершивших диспансеризацию. Наиболее часто выявляются следующие факторы риска:

нерациональное питание – у 21,7% лиц, прошедших диспансеризацию; – избыточная масса тела – 13,9%; низкая физическая активность – 20,3%; - курение табака – 9,4%; повышенный уровень артериального давления (повышенное кровяное артериальное давление при отсутствии диагноза гипертензии) – 1,5%; повышенное содержание глюкозы в крови (неуточненная гипергликемия) – 1,6%; отягощенная наследственность по хроническим неинфекционным заболеваниям в семейном анамнезе – 11,9%. Полученные результаты свидетельствуют о массовом раннем формировании метаболического синдрома, который характеризуется, в частности, повышением уровня холестерина липопротеинов низкой плотности, триглицеридов, уровня глюкозы натощак. При этом криотерапия направлена на стимуляцию собственных адаптивных механизмов защиты, повышение доступности биологических субстратов для химического термогенеза и усиление процессов липолиза, преимущественно за счет расхода атерогенных фракций ЛПНП, минуя стадию аутоагрессии эндотоксикоза. Накопление окисленно-модифицированных ЛПНП приводит к разобщению окислительного фосфорилирования и является экстренным аварийным механизмом увеличения теплопродукции в условиях холодового стресса. Результаты собственного исследования также подтверждают, что по мере воздействия холодового фактора усиливаются процессы окислительной деструкции ЛПНП-частиц. Менее значимый рост резистентных к окислению ЛПНП, сочетающийся с выраженным снижением атерогенных липопротеинов свидетельствует о переключении метаболизма на использование липидных резервов в качестве субстрата для участия в процессе химического термогенеза в условиях низких температур. Полученные результаты позволяют рекомендовать проводить коррекцию метаболических нарушений в виде двукратного посещения криокамеры пациентам с выявленным метаболическим синдромом.

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

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 26.10.2017 г. № 869н «Об утверждении порядка проведения диспансеризации определенных групп взрослого населения».
2. Кочубей А.В., Ластовецкий А.Г., Цветкова Е.А. Особенности нормативного правового регулирования организации профилактической помощи при реализации программ государственных гарантий оказания бесплатной медицинской помощи. *Вестник Росздравнадзора*. 2015; 3: 64-6.
3. Чернышев И.С. Криогенный физиологический стресс – универсальный лечебный фактор. Иллюзии и реальность. М.: Медицина; 2010.
4. Музы Г.И., Куликов В.И., Пономарева И.В. Окисление липопротеинов в крови женщин при патологическом течении беременности. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1999; 3: 8-10.
5. Рагино Ю.Н., Дудкин М.И. Резистентность к окислению гепарин-осажденных β-липопротеидов сыворотки крови при ишемической болезни сердца. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1998; 11:3-5.
6. Кулайчев А.П. Методы и средства комплексного анализа данных. М.: Медицина; 2006.

## REFERENCES

1. Prikaz Ministerstva zdavoohraneniya RF ot 26.10.2017. № 869n «On approval of the procedure for clinical examination of certain groups of the adult population». (in Russian)
2. Kochubei A.V., Lastovetskiy A.G., Tsvetkova E.A. Features of the regulatory legal regulation of the organization of preventive care in the implementation of programs of state guarantees of free medical care. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2015; 3: 64-6. (in Russian)
3. Chernyshev I.S. Cryogenic physiological stress - a universal therapeutic factor. [Kriogennyj fiziologicheskij stress – universal'nyj lechebnyj faktor. Illyuzii i real'nost']. Moscow: Meditsina; 2010. (in Russian)
4. Muzya G.I., Kulikov V.I., Ponomareva I.V. Oxidation of lipoproteins in the blood of women during the pathological course of pregnancy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1999; 3: 8-10. (in Russian)
5. Ragino YU.N., Dudkin M.I. Resistance to oxidation of serum heparin-deposited β-lipoproteins in coronary heart disease. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1998; 11: 3-5. (in Russian)
6. Kulaychev A.P. Methods and tools for integrated data analysis [Metody i sredstva kompleksnogo analiza dannyh]. Moscow: Meditsina; 2006. (in Russian)

Поступила 07.11.18

Принята к печати 29.11.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.244.015.44:616.24-002.5

Рясенский Д.С., Гришкина Н.А.

## ВЛИЯНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРА «ФОСФОГЛИВ®» НА СПЕКТР ФОСФОЛИПИДОВ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

ФГБОУ ВО «Тверской государственной медицинский университет» Минздрава РФ, 170100, Тверь, Россия

*Применение в комплексной терапии пациентов с туберкулезом легких гепатопротектора «Фосфоглив®» позволяет определить влияние препарата на состав липидов мембран мононуклеаров в условиях проведения этиотропной химиотерапии по 1 стандартному режиму. Определение соотношения классов фосфолипидов в мембранах мононуклеаров периферической крови позволит получить представление о нарушении структурно функционального состояния клеточного звена иммунитета у пациентов с туберкулезом до лечения, на фоне интенсивной фазы основного курса химиотерапии, а так же изменение данных показателей при использовании в комплексной терапии препарата «Фосфоглив®». В исследование вошли 356 пациентов туберкулезом легких молодого и среднего возраста. Из них 308 пациентов получали этиотропную химиотерапию без использования фосфоглива, а у 48 больных в комплексной терапии использовали комбинированную схему орально-парентерального введения препарата фосфоглив. Применение гепатопротектора «Фосфоглив®» в комплексной терапии больных туберкулезом позволило уменьшить побочное действие противотуберкулезных препаратов на мононуклеары периферической крови, снизить дезорганизацию их мембран и привести показатели спектра фосфолипидов ближе к соответствующим значениям контрольной группы. При анализе лабораторных данных и рентгенологической картины непосредственная положительная клинико-рентгенологическая динамика отмечена у 81,5% пациентов второй группы и 87,5% пациентов третьей группы. Через 2 месяца проведения интенсивной фазы противотуберкулезной химиотерапии без использования фосфоглива отсутствие бактерий туберкулеза достигнуто у 61% пациентов, а в комплексной терапии которых применяли гепатопротектор «Фосфоглив®», у 81%. Более выраженная положительная рентгенологическая динамика (уменьшение зоны инфильтрации и уменьшение очагов диссеминации) наблюдали у больных, которые принимали «Фосфоглив®».*

**Ключевые слова:** Фосфоглив; туберкулез; липидный спектр; клеточный иммунитет; противотуберкулезная химиотерапия.

**Для цитирования:** Рясенский Д.С., Гришкина Н.А. Влияние гепатопротектора «Фосфоглив®» на фосфолипидный спектр мононуклеаров периферической крови у больных туберкулезом легких. Клиническая и лабораторная диагностика. 2018; 63 (11): 686-690. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-686-690>

Riasenskii D.S., Grishkina N.A.

### INFLUENCE OF PHOSPHOGLIV® HEPATOPROTECTOR ON PHOSPHOLIPID SPECTRUM OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEARS IN PATIENTS WITH TUBERCULOSIS OF LUNGS

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Tver State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 170100, Tver, Russia

*The administration of the "Phosphogliv®" hepatoprotector in the comprehensive treatment of patients with pulmonary tuberculosis will allow determining its effect on the lipid composition of membranes of mononuclear cells under conditions of etiotropic chemotherapy according to 1 standard regimen. The determination of the ratios of the most important classes of phospholipids in membranes of peripheral blood mononuclear cells will give an idea of the structural-functional state violation of the most important representatives of the cellular immunity in patients with tuberculosis prior to treatment, against the backdrop of the intensive phase of the main course of chemotherapy as well as the change in these indices when the "Phosphogliv®" drug is administered in the comprehensive treatment therapy. The study included 356 patients with pulmonary tuberculosis of young and middle age, out of which 308 patients received etiotropic chemotherapy without the administration of phosphogliv, and 48 patients receiving comprehensive treatment used a combined scheme of oral-parenteral administration of phosphogliv. The administration of the "Phosphogliv®" hepatoprotector in the comprehensive treatment of tuberculosis patients made it possible to reduce the severity of the toxic effect of anti-tuberculosis drugs on peripheral blood mononuclear cells, to reduce the degree of disorganization of their membranes and to bring the phospholipid spectrum closer to the corresponding values of the control group. Direct positive clinical and radiological dynamics in 81.5% of patients in the second group and 87.5% in the third group was noted during the analysis of laboratory data and the X-ray pattern. After 2 months of the intensive phase of anti-tuberculosis chemotherapy, abacilation was achieved in 61% of patients having no phosphogliv administered, and in 81% of patients receiving complex therapy with the administration of "Phosphogliv®" hepatoprotector. More apparent positive X-ray dynamics (infiltration zone and dissemination foci decrease) was observed in patients receiving Phosphogliv®.*

**Key words:** Phosphogliv; tuberculosis; lipid spectrum; cell-bound immunity; anti-tuberculosis chemotherapy.

**For citation:** Riasenskii D.S., Grishkina N.A. Influence of phosphogliv® hepatoprotector on phospholipid spectrum of peripheral blood mononuclears in patients with tuberculosis of lungs. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (10): 686-690 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-686-690>

**For correspondence:** Riasenskii D.S., Ph.D. (Medicine), Associate Professor of the Department of Phthisiology; e-mail: meddim3@mail.ru

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

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

Received 11.10.2018  
Accepted 01.11.2018

*Введение.* По данным Всемирной организации здравоохранения в мире от туберкулеза ежегодно умирает более 1,4 млн человек. Россия названа страной с высоким показателем «бремени туберкулеза» [1]. Несмотря на тенденцию к улучшению эпидемической ситуации заболевания туберкулезом, заболевание по-прежнему остается медицинской проблемой [2]. Эффективность противотуберкулезной терапии во многом определяет эффективность этиотропной химиотерапии и иммунологической резистентностью пациента. Основой этиотропной терапии туберкулеза легких остаётся первый режим, который включает назначение противотуберкулезных препаратов (ПТП) первого ряда (изониазид, рифампицин, пиразинамид, этамбутол, стрептомицин). В литературе подробно описано нежелательное побочное действие химиопрепаратов на гепатобилиарную, выделительную систему и желудочно-кишечный тракт организма [3-6]. Опубликованы отдельные работы, посвященные действию ПТП на разные звенья иммунной системы [7, 8].

Ведущую роль в развитии иммунного ответа при туберкулезе играют клеточные реакции, важнейшим звеном которых являются мононуклеары. Токсическое действие ПТП сказывается не столько на общей численности мононуклеаров, сколько на особенностях организации их мембран и, следовательно, функциональной активности. Состав билипидного слоя иммунокомпетентных клеток является чувствительным маркером нарушений иммунитета на молекулярном уровне. В основе патогенеза мембранодеструктивного действия ПТП лежит изменение соотношения отдельных классов фосфолипидов в плазматической мембране мононуклеарных клеток [9]. Определение нарушений соотношения фосфолипидов и способов их коррекции позволит сократить длительность интенсивной фазы, улучшить переносимость ПТП, повысить иммунологическую резистентность и, за счет этого, улучшить эффективность этиотропной терапии. Гепатопротектор «Фосфоглив®» содержит не только основной фосфолипид структуры биологических мембран – фосфатидилхолин, но и иммуноотропное вещество – глицирризиновую кислоту, основной тритерпеновый сапонин экстракта корней солодки голой. Введение этого препарата отражается в первую очередь на составе фосфолипидов плазмы крови. Совместное действие основных компонентов гепатопротектора «Фосфоглив®» на соотношение фосфолипидов в плазме крови и в плазматических мембранах мононуклеаров периферической крови у больных туберкулезом легких, получающих химиотерапию в литературе не освещено. В литературе нет и данных об изменении эффективности этиотропной химиотерапии у больных туберкулезом легких при включении препарата в комплексную терапию.

Оценка особенностей соотношения липидных фракций мембран мононуклеаров периферической крови у больных туберкулезом легких до лечения и на фоне противотуберкулезной химиотерапии позволит получить представление о мембранодеструктивном действии препаратов первого ряда и позволит определить оптимальные пути восстановления мембран мононуклеаров. Применение в комплексной терапии пациентов с туберкулезом легких гепатопротектора «Фосфоглив®» позволит определить действие его на липидный состав мембран мононуклеаров в условиях проведения этиотропной химиотерапии согласно первому стандартному режиму.

Определение соотношений классов фосфолипидов в мембранах мононуклеаров периферической крови даст представление о нарушении структурно функционального состояния клеточного звена иммунитета у больных туберкулезом до лечения, на фоне интенсивной фазы основного курса химиотерапии, а так же изменение данных показателей при включении в комплексную терапию препарата «Фосфоглив®».

*Цель работы* - оценить действие гепатопротектора «Фосфоглив®» на соотношение фосфолипидных фракций клеточных мембран мононуклеаров периферической крови и значимость одновременной этиотропной химиотерапии у больных туберкулезом легких гепатопротектором «Фосфоглив®».

*Материал и методы.* В исследование включили 356 больных туберкулезом легких молодого и среднего возраста, по градации всемирной организации здравоохранения (от 25 до 60 лет). Все пациенты получали основной курс химиотерапии согласно первому стандартному режиму в Тверском областном клиническом противотуберкулезном диспансере. Обследованы лица обоих полов в равном соотношении в соответствии с критериями включения и исключения. Критерии включения: добровольное информированное согласие, отсутствие диагностированной сопутствующей соматической или инфекционной патологии, туберкулез легких без распада, лечение согласно первому стандартному режиму. Критерии исключения: отказ от продолжения лечения, выявление сопутствующей патологии, появление распада легочной ткани, выявление устойчивости микобактериальной флоры или индивидуальной непереносимости препаратов первого ряда. В группу первую и вторую включены пациенты, обследованные до начала курса химиотерапии и после окончания интенсивной фазы основного курса, всего 308 человек. В 3 группу (группа 3) включены пациенты после окончания интенсивной фазы основного курса, в комплексном лечении которых использовали гепатопротектор «Фосфоглив®»; всего 48 человек. Контрольную группу составили 36 здоровых добровольцев, обследованных в поликлинике Тверского государственного медицинского университета.

Фосфоглив пациенты принимали в двух формах: парентерально и в капсулах per os. Первые 20 дней больные получали «Фосфоглив®» в виде раствора для внутривенных инъекций. Разовая доза содержала 120 мг фосфатидилхолина и 60 мг глицирризиновой кислоты. Далее переходили на пероральное введение фосфоглива: по 2 капсулы 4 раза в день в течении всего срока интенсивной фазы противотуберкулезной химиотерапии. Кровь для исследования отбирали из периферической вены в объеме 10 мл в пробирки с цитратом натрия. Плазму отделяли от клеточных элементов центрифугированием, экстракцию липидов проводили по Фолчу. Разделение основных фракций фосфолипидов проводили методом тонкослойной одномерной проточной хроматографии. В спектре фосфолипидов определяли следующие фракции: суммарные лизофосфолипиды (ЛФЛ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтаноламин (ФЭ). Окрашивание хроматографических зон проводили в парах серной кислоты. Подсчет соотношений основных классов фосфолипидов проводили денситометрически с использованием программно-аппаратного комплекса хромоскан [10]. Для расчета площади пиков с частичным наложением их друг на друга использова-

ли метод аппроксимации. Рассчитанные площади пиков пропорциональны содержанию липидов в соответствующих фракциях. Для определения процентного содержания липидов в каждой фракции сумма площади всех анализируемых пиков делили на площадь пика, соответствующего данной фракции.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программных средств StatSoft «Statistica10.0» и Microsoft Excel 2016. Все результаты, полученные при обследовании, проверялись на предмет выявления эмпирических функций распределения и соответствие этих функций нормальной функции распределения Гаусса. Для обработки полученных значений использовали среднее арифметическое ( $M$ ), среднее квадратичное отклонение (сигма), а для нормально распределенных параметров ошибку среднего арифметического ( $m$ ). Сравнение проводили с использованием  $t$ -критерия, который позволяет оценить различие между группами по разности выборочных средних. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости  $p < 0,05$  [11].

**Результаты и обсуждение.** Данные, полученные в результате обследования больных туберкулезом легких до начала проведения химиотерапии, после окончания интенсивного курса, а так же после лечения с использованием гепатопротектора «Фосфоглив®» приведены в таблице.

Так у больных до начала лечения содержание ЛФЛ было несколько снижено относительно контрольной группы, однако различие не достоверно ( $p > 0,05$ ). Относительное содержание СМ в первой группе оказалось достоверно ниже контрольной группы ( $p < 0,01$ ). Фрак-

ция ФИ более чем в 2 раза превышала группу контроля ( $p < 0,01$ ). Уровень ФХ у больных группы 1 снизился и был достоверно ниже контрольных значений ( $p < 0,01$ ). Фракция ФС, так же была снижена у пациентов с туберкулезом до начала лечения, по сравнению со здоровыми ( $p < 0,01$ ). Относительное содержание ФЭ, напротив, повышено относительно контрольных значений ( $p < 0,01$ ).

В группе больных туберкулезом, которые получали ПТП, наблюдали выраженное изменение спектра фосфолипидов мембран мононуклеаров, однако эти изменения носили иной характер и отражали мембранотоксическое действие химиотерапии. Содержание ЛФЛ резко повышено, и достоверно отличался от контрольных значений и от первой группы. Относительное содержание СМ оставалось сниженным, как у больных до приема ПТП, так и на фоне лечения. Достоверных различий по этому признаку между группой 1 и группой 2 не выявлено ( $p > 0,05$ ). Кроме того, оставался повышенным уровень ФИ, значение которого во второй группе в 2 раза выше контрольного значения и достоверно не отличалось от первой группы ( $p > 0,05$ ). Относительное содержание ФХ у пациентов второй группы снижено, по сравнению с контрольной ( $p < 0,01$ ) и первой группой ( $p < 0,01$ ). Уровень ФС повышался у больных туберкулезом на фоне приема ПТП ( $p < 0,01$ ), однако оставался достоверно ниже соответствующего значения в контрольной группе ( $p < 0,01$ ). Относительное содержание ФЭ оставалось повышенным после приема ПТП, так же как и до начала химиотерапии ( $p > 0,05$ ) и достоверно отличалось от уровня ФЭ контрольной группы ( $p < 0,01$ ).

В группе пациентов, которые получали в комплексной терапии гепатопротектор «Фосфоглив®», содер-

**Фосфолипидный спектр мононуклеаров крови у больных туберкулезом легких**

Фракции фосфолипидов	Показатели липидов ( $M \pm m$ ) в относительных процентах				P
	Контроль (n=36)	Группа 1 (n=308)	Группа 2 (n=308)	Группа 3 (n=48)	
ЛФЛ	7,1 ± 0,3	6,8 ± 0,2	11,4 ± 0,1	6,1 ± 0,2	$P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,01$ $P_3 < 0,01$ $P_4 < 0,01$ $P_5 < 0,01$
СМ	18,6 ± 0,5	14,9 ± 0,4	14,7 ± 0,3	18,1 ± 0,4	$P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$ $P_3 > 0,05$ $P_4 > 0,05$ $P_5 < 0,01$
ФИ	5,3 ± 0,3	10,9 ± 0,1	10,6 ± 0,2	8,1 ± 0,2	$P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$ $P_3 < 0,01$ $P_4 > 0,05$ $P_5 < 0,01$
ФХ	43,4 ± 0,8	38,9 ± 0,5	33,6 ± 0,5	52,0 ± 0,8	$P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$ $P_3 < 0,01$ $P_4 < 0,01$ $P_5 < 0,01$
ФС	5,1 ± 0,3	2,4 ± 0,2	3,6 ± 0,2	4,8 ± 0,2	$P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$ $P_3 < 0,05$ $P_4 < 0,01$ $P_5 < 0,01$
ФЭ	20,5 ± 0,5	26,1 ± 0,4	26,0 ± 0,4	10,9 ± 0,4	$P_1 < 0,01$ $P_2 < 0,01$ $P_3 < 0,01$ $P_4 > 0,05$ $P_5 < 0,01$

Примечание:  $P_1$  - достоверность различий показателей фосфолипидов группы 1 по отношению к контрольной группе;  $P_2$  - достоверность различий показателей фосфолипидов группы 2 по отношению к контрольной группе;  $P_3$  - достоверность различий показателей фосфолипидов группы 3 по отношению к контрольной группе;  $P_4$  - достоверность различий показателей фосфолипидов группы 1 по отношению к группе 2;  $P_5$  - достоверность различий показателей фосфолипидов группы 2 по отношению к группе 3.

жание ЛФЛ резко снизилось и было достоверно ниже соответствующего показателя в группе контроля, а так же в первой и второй группах ( $p < 0,01$ ). Относительное содержание СМ возросло и достоверно не отличалось от группы контроля ( $p > 0,05$ ), а так же достоверно выше относительного содержания СМ в группе 2 ( $p < 0,01$ ). Значения фракции ФИ снизились и оказались достоверно ниже соответствующего показателя во второй группе ( $p < 0,01$ ), но выше чем группе контроля ( $p < 0,01$ ). Относительное содержание ФХ в мембранах мононуклеаров после применения гепатопротектора «Фосфоглив®» резко возросло и оказалось достоверно выше, чем соответствующий показатель в контроле и во второй группе ( $p < 0,01$ ). Значение фракции ФС так же увеличилось выше, чем во второй группе ( $p < 0,01$ ), но ниже, чем в контрольной группе ( $p < 0,01$ ). Содержание ФЭ снизилось по сравнению со второй группой ( $p < 0,01$ ), но оставалось почти в 2 раза выше, по сравнению с группой контроля ( $p < 0,01$ ).

Таким образом, нами выявлены значительные изменения спектра фосфолипидов мембран мононуклеаров у всех больных туберкулезом. В процессе противотуберкулезной химиотерапии эти изменения нарастили и приобрели новые черты. Содержание токсичной фракции ЛФЛ в мембранах лимфоцитов, в основном, определяет активностью фосфолипазы  $A_2$  цитоплазмы, которая катализирует гидролиз фосфатидилхолина с образованием лизофосфатидилхолина, основного компонента суммарных ЛФЛ. Накопление этой фракции снижает устойчивость мононуклеаров и их функциональную активность. После проведения интенсивной фазы противотуберкулезной химиотерапии активность фосфолипазы  $A_2$  достигает максимума, на что указывают высокие показатели ЛФЛ и снижение содержания ФХ.

Глицерризиновая кислота, которая входит в состав гепатопротектора «Фосфоглив®» угнетает активность фосфолипазы  $A_2$ . Нами выявлено понижение содержания ЛФЛ при одновременном значительном повышении ФХ у больных туберкулезом, которые получали лечение «Фосфоглив®». Снижение уровня СМ у больных туберкулезом до лечения и после интенсивной фазы химиотерапии является компенсаторным и обусловлено действием сфингомилиназы, которая гидролизует СМ мембраны с образованием ФХ и церамида. Активность сфингомилиназы возрастает под влиянием фосфатидной кислоты, которая накапливается при гидролизе фосфатидилхолина, и под влиянием фактора некроза опухоли-альфа, который продуцируют лимфоциты. Действие фосфоглива приводит к накоплению СМ в мембранах мононуклеаров. Это повышает устойчивость мононуклеаров и косвенно отражает повышение иммунологической резистенции организма, а так же снижает мембранодеструктивное действие ПТП. ФИ и ФС определяют и топологию встроенных протеинов. Физиологический иммунный ответ клеток возможен только при определенной плотности этих липидов в мембране. Нарушение относительного содержания фракций фосфолипидов отражает разнонаправленное действие препаратов, что приводит к дезорганизации структуры клеточной мембраны мембраны, как следствие, приводит к угнетению функциональной активности мононуклеаров. Такое нарушение выявлено у пациентов первой и второй групп. Применение гепатопротектора «Фосфоглив®» значительно улучшает соотношение этих фракций. Повышение содержания ФЭ происходит за счет

декарбоксилирования ФС, уровень которого снижался. Применение препарата позволило понизить уровень ФЭ и повысить содержание ФС.

Применение гепатопротектора «Фосфоглив®» в комплексной терапии больных туберкулезом в третьей группе снизило токсическое действие ПТП на мононуклеары, степень дезорганизации их мембран и привело показатели спектра фосфолипидов ближе к значениям контрольной группы. При анализе лабораторных данных и рентгенологической картины, непосредственная положительная клиничко-рентгенологическая динамика отмечена у 81,5% пациентов второй группы и 87,5% пациентов третьей группы. Через 2 месяца проведения интенсивной фазы противотуберкулезной химиотерапии без фосфоглива, отсутствие туберкулезной палочки в мокроте удалось достичь у 61% пациентов, а у больных, в комплексной терапии которых применяли гепатопротектор «Фосфоглив®», у 81%. Более выраженная положительная рентгенологическая динамика (уменьшение зоны инфильтрации и уменьшение очагов диссеминации) наблюдали у больных третьей группы.

**Заключение.** Противотуберкулезная химиотерапия вызывает дезорганизацию липидных мембран мононуклеаров периферической крови, приводит к накоплению лизофосфолипидов при одновременном снижении уровня фосфатидилхолина. Применение гепатопротектора «Фосфоглив®» у больных туберкулезом легких, позволяет нормализовать отношение фракций фосфолипидов в мембране иммунокомпетентных клеток и создать более благоприятные условия для иммунного ответа организма. На этом фоне эффективность этиотропной терапии по выделению из мокроты бактерий Коха повысилась с 61% до 81% с позитивной динамикой клиничко-рентгенологических данных.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева И.А., Белиловский Е.М., Борисов С.Е., Стерликов С.А. Заболеваемость, смертность и распространенность как показатели бремени туберкулеза в регионах воз. странах мира и в российской федерации Часть 2. Смертность от туберкулеза. *Туберкулез и болезни легких*. 2017; 95(7): 8-16.
2. Макаров В.К., Крылов В.В., Королюк Е.Г., Степанова Ю.Е., Стариков С.В., Гришкина Н.А. Тенденции развития эпидемической ситуации по туберкулезу в Тверской области и пути её оздоровления. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 2(2): 13-3.
3. Лысов А.В., Мордык А.В., Затворницкий В.А., Кондря А.В. О побочных нейротоксических реакциях при химиотерапии туберкулеза и их лечении. *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. 2006; (9): 45-8.
4. Меркулов С.А., Королева М.В. Применение таурина в лечении лекарственного поражения печени на фоне специфической терапии туберкулеза лёгких. *Врач-аспирант*. 2013; (4): 33-9.
5. Мишин В. Ю. *Медикаментозные осложнения комбинированной химиотерапии туберкулеза легких*. М: ООО «Медицинское информационное агентство»; 2007.
6. Мишин В.Ю. Чуканов В.И., Григорьев Ю.Г. *Побочное действие противотуберкулезных препаратов при стандартных и индивидуализированных режимах химиотерапии*. М.: Компьютербург; 2004.
7. Серебрякова В.А., Васильева О.А., Уразова О.И., Новицкий В.В., Воронкова О.В., Стрелис А.К., Будкина Т.Е., Хасанова Р.Р., Наследникова И.О. Проллиферативный и секреторный ответ

- мононуклеарных лейкоцитов на комбинированное воздействие этамбутола и микобактериального антигена. *Медицинская иммунология*. 2009; 11(3): 153-7.
8. Чурина Е.Г., Новицкий В.В., Уразова О.И., Колосова А.Е., Воронкова О.В., Филинук О.В., Некрасов Е.В., Есимова И.Е., Хасанова Р.Р. Особенности иммунорегуляции у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких. *Медицинская иммунология*. 2011; 13(2-3): 267-72.
  9. Есимова И.Е. *Состояние липидной фазы мембраны мононуклеарных клеток крови при туберкулезе легких*. Дис. ... канд. мед. наук. Томск; 2007.
  10. Рясенский Д.С., Макаров В.К. Применение компьютерных программ для денситометрии липидного состава крови. *Фармация*. 2008; (1): 5-3.
  11. Елисеева И.И., Курышева С.В., Егорова И.И. *Статистика*. М: Проспект; 2015.
- 
- #### REFERENCES
1. Vasil'yeva I.A., Belilovskiy Ye.M., Borisov S.Ye., Sterlikov S.A. Morbidity, mortality and prevalence as indicators of the burden of tuberculosis in the regions of the world, the countries of the world and in the Russian Federation Part 2. Mortality from tuberculosis. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2017; 95(7): 8-16. (in Russian)
  2. Makarov V.K., Krylov V.V., Korolyuk Ye.G., Stepanova YU.Ye., Starikov S.V., Grishkina N.A. Trends in the development of the epidemic situation of tuberculosis in the Tver region and ways to improve it. *Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni*. 2015; 2(2): 13-3. (in Russian)
  3. Lysov A.V., Mordyk A.V., Zatornitskiy V.A., Kondrya A.V. About adverse neurotoxic reactions at a chemotherapy of a tuberculosis and their treatment. *Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh*. 2006; (9): 45-8. (in Russian)
  4. Merkulov S.A., Koroleva M.V. The use of taurine in the treatment of drug damage to the liver against the background of specific therapy for pulmonary tuberculosis. *Vrach-aspirant*. 2013; (4): 33-9. (in Russian)
  5. Mishin V. YU. Medication complications of combined chemotherapy of pulmonary tuberculosis [Medikamentoznye oslozhneniya kombinirovannoy khimioterapii tuberkuleza legkikh]. Moscow: OOO «Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo»; 2007. (in Russian)
  6. Mishin V.YU. Chukanov V.I., Grigor'yev YU.G. Side effects of anti-TB drugs with standard and individualized regimens of chemotherapy [Pobochnoye deystviye protivotuberkuloznykh preparatov pri standartnykh i individualizirovannykh rezhimakh khimioterapii]. Moscow: Komp'yuternyye; 2004. (in Russian)
  7. Serebryakova V.A., Vasil'yeva O.A., Urazova O.I., Novitskiy V.V., Voronkova O.V., Strelis A.K., Budkina T.Ye., Khasanova R.R., Naslednikova I.O. Proliferative and secretory response of mononuclear leukocytes to combined effects of ethambutol and mycobacterial antigen. *Meditsinskaya immunologiya*. 2009; 11(3): 153-7. (in Russian)
  8. Churina Ye.G., Novitskiy V.V., Urazova O.I., Kolosova A.Ye., Voronkova O.V., Filinyuk O.V., Nekrasov Ye.V., Yesimova I.Ye., Khasanova R.R. Features of immunoregulation in patients with fibrous-cavernous pulmonary tuberculosis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2011; 13(2-3): 267-72. (in Russian)
  9. Esimova I.E. The state of the lipid phase of the membrane of mononuclear blood cells in pulmonary tuberculosis. Dis. Tomsk; 2007. (in Russian)
  10. Riasenskii D.S., Makarov V.K. Application of computer programs for densitometry of lipid composition of blood. *Farmatsiya*. 2008; (1): 5-3. (in Russian)
  11. Eliseeva I.I., Kuryshcheva S.V., Egorova I.I. *Statistics [Statistika]*. Moscow: Prospekt; 2015. (in Russian)

Поступила 11.10.18  
Принята к печати 01.11.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.24-007.272-036.12-07:616.155.1-007.1

Соснин Д.Ю., Ховаева Я.Б., Подъянова А.И., Сыромятникова Т.Н., Ненашева О.Ю.

## ЭРИТРОПОЭТИН КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ТЯЖЕСТИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЁГКИХ

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

Изучена концентрация эритропоэтина (ЭПО) в сыворотке крови. В исследование включены 122 человека, разделённых на две группы. Основную группу составили 102 пациента с хронической обструктивной болезнью лёгких (ХОБЛ). Контрольную группу, сопоставимую по возрасту и полу, составили 20 обследованных без признаков дыхательной недостаточности. Концентрацию ЭПО определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-системы Эритропоэтин – ИФА – БЕСТ (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Концентрация ЭПО в сыворотке пациентов основной группы достоверно превысила таковую в контрольной группе, медиана и интерквартильный диапазон составили соответственно: 12,0 (7,4–16,1) мМЕ/мл в основной группе и 7,5 (5,65–8,1) мМЕ/мл в контрольной ( $p = 0,000454$ ). Степень увеличения ЭПО коррелировала с тяжестью ХОБЛ по шкале GOLD. При попарном сравнении полученных результатов достоверные различия установлены между контрольной группой и подгруппой С по классификации GOLD ( $p_{(контроль \text{ и } C)} = 0,021578$ ), а также контрольной группой и подгруппой D по классификации GOLD ( $p_{(контроль \text{ и } D)} = 0,000721$ ). Увеличение содержания ЭПО в крови, вероятно, обусловлено реакцией юкстагломерулярного аппарата нефрона на формирование гипоксии вследствие нарушения функции внешнего дыхания. Определение концентрации ЭПО можно использовать для оценки тяжести ХОБЛ; при оценке результатов лабораторного теста важно учитывать возможность увеличения его концентрации вследствие нарушения функции внешнего дыхания.

Ключевые слова: хронические обструктивные болезни лёгких; эритропоэтин; дыхательная недостаточность.

**Для цитирования:** Соснин Д.Ю., Ховаева Я.Б., Подъянова А.И., Сыромятникова Т.Н., Ненашева О.Ю. Эритропоэтин как показатель тяжести хронической обструктивной болезни лёгких. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 ( 11 ): 691-695. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63- 11- 691-695>

Sosnin D.Yu., Khovaeva Ya.B., Podyanova A.I., Syromyatnikova T. N., Nenasheva O.Yu.

### ERITROPOETIN AS LABORATORY INDEX OF THE DEGREE OF RESPIRATORY INSUFFICIENCY IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASES

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Academician Ye. A. Vagner Perm State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 614990, Perm, Russian Federation

The concentration of erythropoietin (EPO) in serum was studied. The study included 122 people divided into two groups. The main group (group 1) consisted of 102 patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The control group (group 2), comparable in age and sex, was 20 surveyed, with no signs of respiratory failure. The concentration of EPO was determined by the method of solid-phase enzyme immunoassay (ELISA) using the test system "Erythropoietin-EIA-BEST" (ZAO Vector-Best, Russia). The concentration of EPO in the serum of the patients of the main group significantly exceeded its content in the control group, the median and interquartile range were respectively 12.0 (7.4 - 16.1) mIU / ml in the main group and 7.5 (5.65-8 , 1) mIU / ml in the control group ( $p = 0.000454$ ). The degree of increase in EPO correlated with the severity of COPD on the GOLD scale. In a pair comparison of the results obtained, significant differences were established between the control group and the G grade subgroup ( $p_{(control \text{ and } C)} = 0.021578$ ), and the control group and subgroup D according to the GOLD classification ( $p_{(control \text{ and } D)} = 0, 000721$ ). An increase in the content of EPO in the blood is probably due to the reaction of the juxtaglomerular nephron apparatus to the formation of hypoxia due to a violation of the function of external respiration.

Thus, the study of the concentration of EPO can be used to assess the severity of COPD, and in interpreting the results of this laboratory test, the possibility of increasing its concentration due to impairment of the function of external respiration should be considered.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; COPD; erythropoietin; respiratory failure.

**For citation:** Sosnin D.Yu., Khovaeva Ya.B., Podyanova A.I., Syromyatnikova T. N., Nenasheva O.Yu., Eritropoetin as laboratory index of the degree of respiratory insufficiency in chronic obstructive pulmonary diseases. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 ( 11 ): 691-695 (in Russ.). DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-691-695>

**For correspondence:** Sosnin D. Yu., Dr. Sci. Med., associate Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics o; e-mail: [sosnin\\_dm@mail.ru](mailto:sosnin_dm@mail.ru)

#### Information about authors:

Khovaeva Ya.B. <https://orcid.org/0000-0003-1186-3867>

Sosnin D.Yu. <http://orcid.org/0000-0002-1232-8826>

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

**Acknowledgment.** The authors express their sincere gratitude to Vector-Best LLC for the gratuitous provision of the ELISA-kit "Erythropoietin-IFA-BEST" (A 8776) (Vector-Best, Russia).

Received 29.11.2018  
Accepted 06.12.2018

Хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ) занимает ведущее место в структуре заболеваний органов дыхания у взрослого населения [1, 2]. Причиной патологических процессов, которые формируются при ХОБЛ, является в первую очередь нарушение функции внешнего дыхания [3]. Следует учитывать, что формирующаяся первичная альвеолярная гипоксия не только является основным фактором, индуцирующим местное повреждение ткани, но она способно вторично активировать и усиливать системную воспалительную реакцию, провоцирующую дальнейшее повреждение ткани лёгкого [4], а также, в определённых условиях, влиять на функцию других систем, органов и тканей, например, проводящей системы миокарда [5]. Установлено, что при гипоксии происходит изменение метаболизма, проявляющееся не только в накоплении низкомолекулярных метаболитов анаэробного обмена (лактата, пирувата), но и в компенсаторных реакциях организма, направленных на восстановление гомеостаза. Данные реакции могут рассматриваться как проявление общебиологической функции поддержания гомеостаза [6–8]. Гипоксия сопровождается продукцией или изменением свойств ряда белковых соединений: фактора 1, индуцируемого гипоксией (*англ.* HIF 1); его альфа субъединицы (HIF 1 $\alpha$ ); O<sub>2</sub> и/или Fe<sup>2+</sup> зависимой пролилксидазы (*англ.* PHD), а также эритропоэтина (ЭПО, *англ.* EPO) [9–11].

ЭПО прочно вошёл в практику клинико-диагностических лабораторий в качестве лабораторного теста, который используют в том числе для диагностики заболеваний и состояний, которые сопровождается гипоксией [12–15]. В литературе мы нашли одну публикацию, в которой приведены результаты определения содержания ЭПО у пациентов при ХОБЛ без сопутствующей анемии или патологии почек [16]. Поиск выполняли в электронной библиотеке <https://elibrary.ru> по фразе «эритропоэтин при хронической обструктивной болезни лёгких» и в базе данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> по фразе «erythropoietin by chronic obstructive pulmonary disease». Недостаток публикаций по данной проблеме обуславливает интерес к проведению дальнейших исследований ЭПО у пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести.

*Цель исследования* – оценить и сравнить концентрацию ЭПО в сыворотке крови у здоровых людей и у пациентов с ХОБЛ разной степени тяжести.

*Материал и методы.* Проведено одномоментное обсервационное исследование типа случай–контроль. Работа выполнена с соблюдением этических принципов проведения медицинских протоколов с участием людей в качестве субъектов, согласно Хельсинкской декларации ВОЗ. Проведение работы одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е. А. Вагнера» Минздрава России. В исследование включены 122 человека, разделённых на две группы (табл. 1). Основную группу составили 102 пациента ХОБЛ, разделённых по тяжести заболевания на четыре подгруппы (А, В, С, D). Стратификацию подгрупп ХОБЛ провели на основе интегральной оценки симптомов, риска развития осложнений и спирометрической оценки функции внешнего дыхания по классификации GOLD 2017 [17]. Контрольную группу составили 20 человек, которые проходили плановое обследование при периодическом профилактическом осмотре. Основная и контрольная группы были сопоставимы по полу и возрасту (табл. 1).

*Критерии включения в исследование:*

- 1) пациенты с ХОБЛ разной степени тяжести по GOLD 2017 [17] в возрасте от 40 до 85 лет;
- 2) наличие информированного согласия на участие в исследовании.

*Критерии исключения:*

- 1) туберкулез лёгких и бронхоэктазы;
- 2) состояния, сопровождающиеся гипоксией, не связанной с ХОБЛ: анемии разного генеза со снижением концентрации гемоглобина менее 117 г/л, проживание в местности с низким парциальным давлением кислорода во вдыхаемом воздухе в течение последних 6 мес (высокогорье, Крайний Север);
- 2) парентеральное введение ЭПО (терапия рекомбинантным ЭПО);
- 3) заболевания почек: хроническая почечная недостаточность III степени тяжести и выше (снижение скорости клубочковой фильтрации ниже 60 мл/мин), поликистоз почек, патология почечных сосудов с формированием реноваскулярной артериальной гипертензии;
- 4) индекс массы тела более 40 кг/м<sup>2</sup>;

Таблица 1

Характеристика групп пациентов

Показатель	Основная группа (n = 102)				Контрольная группа (n = 20)
	подгруппа А	подгруппа В	подгруппа С	подгруппа D	
М/Ж	12/2	14/4	28/9	28/5	15/5
Возраст, годы	63,6 ± 5,0 63 (60 – 65) 60 – 70	63,6 ± 5,8 65 (60 – 70) 42 – 80	65,4 ± 7,84 62 (33 – 75) 50 – 81	64,6 ± 10,2 67 (58 – 73) 40 – 81	66,5 ± 9,6 66 (59,5 – 74,5) 42 – 80
H-критерий Краскела–Уоллиса	H (4, n = 122) = 1,543405; p = 0,8189*				

Примечание. В числителе – среднее значение ± стандартное отклонение (M ± SD), в знаменателе – медиана и интерквартильный диапазон (Me; 25% квартиль – 75% квартиль), под дробью результаты мин. – макс.

\* – различие между группами по H-критерию Краскела–Уоллиса).

5) печёночная недостаточность, хроническая сердечная недостаточность IV ФК (NY-НА);

6) миелопролиферативные заболевания и злокачественные опухоли.

Оценку функции внешнего дыхания проводили с помощью компьютерной спирометрии путём регистрации петли поток/объём на аппарате SCHILLER Spirovit SP-260 (SCHILLER, Швейцария). Исследование проводили с 8 до 9 ч утра, натощак, не ранее чем через 8 ч по-

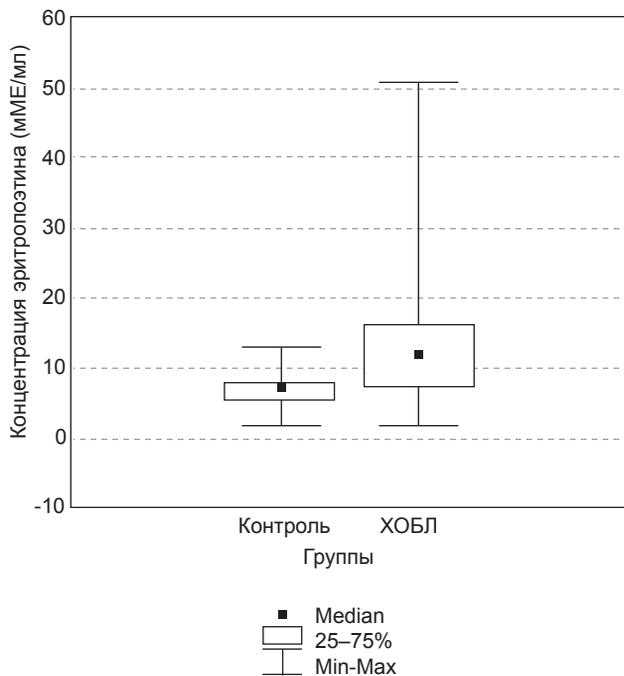


Рис. 1. Концентрация эритропоэтина (в мМЕ/мл) у здоровых обследованных (контроль) и у пациентов с хронической обструктивной болезнью лёгких (основная группа).

сле приёма короткодействующих бронходилататоров и через 12 ч после приёма длительно действующих бронходилататоров. Основными оцениваемыми параметрами являлись: форсированная жизненная ёмкость лёгких (ФЖЕЛ, %), объём форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ<sub>1</sub>, %), отношение ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ (%), максимальные объёмные скорости в интервале от 25 до 75% объёма ФЖЕЛ (МОС<sub>25-75%</sub>, %), пиковая скорость выдоха (ПСВ, %). Полученные данные сравнивали с нормативами, рассчитанными для лиц соответствующего пола, возраста, роста и массы тела по R.Knudson [18]. Для определения обратимости обструкции использовали стандартную пробу с бронхолитиком (сальбутамол в дозе 400 мкг). Расчёт бронходилатационного ответа выполняли в соответствии с рекомендациями [19].

Исследовали образцы крови, полученные в утренние часы. Кровь получали методом венопункции кубитальной вены в пробирки с активатором свертывания крови Greiner VACUETTE®, (Greiner Bio-one, Austria). Сыворотку крови отделяли от форменных элементов путём центрифугирования при 3000 об/мин в течение 15 мин не позднее, чем через 2 ч после взятия биологического материала. Концентрацию ЭПО (в мМЕ/мл) определяли методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-системы «Эритропоэтин – ИФА – БЕСТ» (А 8776) («Вектор-Бест», Россия). Оптическую плотность проб регистрировали на вертикальном фотометре StatFax 3200 (Awareness, США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA v. 7 (StatSoft Inc., США). Для каждого массива данных рассчитывали параметры описательной статистики: среднюю арифметическую ( $M$ ), стандартное отклонение ( $SD$ ), медиану ( $Me$ ) и интерквартильный диапазон (25%–75% процентиля), а также минимальное ( $min$ ) и максимальное ( $max$ ) значение. Массивы данных оценивали на наличие и степень выраженности выбросов. Характер распределения полученных результатов оценивали с использованием критерия Шапиро – Уилка (табл. 2). Полученные результаты позволили отвергнуть нулевую гипотезу о нормальном характере их распределения. Это послужило основанием для использования непараметрических методов при дальнейшем статистическом анализе. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна–Уитни, трёх и более – H-критерий Краскела–Уоллиса с последующей оценкой внутригрупповых попарных сравнений. Количественную оценку линейной связи между двумя случайными величинами определяли путём расчёта коэффициента ранговой корреляции ( $R$ ) Спирмена. За максимально приемлемую вероятность ошибки первого рода ( $p$ ) принимали величину уровня статистической значимости, равную или меньшую 0,05.

**Результаты.** Концентрация ЭПО в контрольной группе составила  $7,16 \pm 3,32$  мМЕ/мл и колебалась в диапазоне 1,9–13,0 мМЕ/мл; это соответствует референсным границам нормы, приведённым в литературе [20]. Концентрация ЭПО в

Таблица 2

Концентрация эритропоэтина (ЭПО) в группах пациентов

Показатель	Основная группа				Контрольная группа
	A	B	C	D	
Концентрация ЭПО, мМЕ/мл	$9,76 \pm 5,01$ 8,1(7,4–3,0) 1,9–20,5	$11,21 \pm 5,76$ 9,8(6,9–15,1) 4,2–22,2	$12,05 \pm 5,18$ 12,1(8,2–14,1) 4,2–29,4	$18,02 \pm 13,97$ 14,9(8,4–21,6) 2,2–50,7	$7,16 \pm 3,32$ 7,5 (5,65–8,1) 1,9–13,0
W - критерий Шапиро–Уилка	0,94462	0,90039	0,92586	0,81996	0,90137
p	0,48068	0,05836	0,01671	0,00008	0,04375
H – критерий Краскела–Уоллиса	H (4, n = 1222) 17,093 p = 0,0019				

Примечание. В числителе – среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ), в знаменателе – медиана и интерквартильный диапазон ( $Me$ ; 25% квартиль – 75% квартиль), под дробью – результаты мин. – макс.

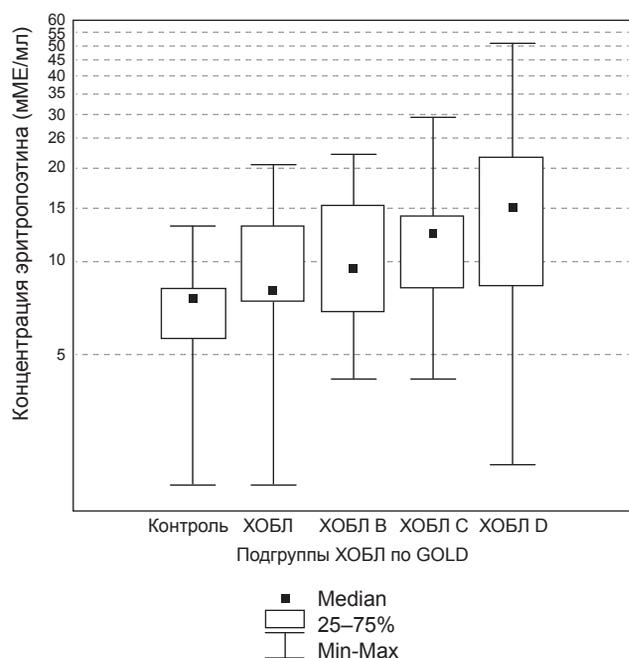


Рис. 2. Концентрация ЭПО (мМЕ/мл) в подгруппах пациентов ХОБЛ в зависимости от тяжести (А-Д) и здоровыми пациентами (контроль).

основной группе составила  $13,51 \pm 9,51$  мМЕ/мл и колебалась в значительно более широком диапазоне – от 1,9 до 50,7 мМЕ (рис. 1). Медианы содержания ЭПО различались в 1,6 раза и составили с интерквартильным диапазоном соответственно 7,5 (5,65–8,1) мМЕ/мл и 12,0 (7,4–16,1) мМЕ/мл ( $U = 513$ ;  $p = 0,000454$ ) (рис. 1).

Результаты определения концентрации ЭПО в подгруппах пациентов с разной тяжестью ХОБЛ представлены в табл. 2. Увеличение концентрации ЭПО в основной группе зависело от степени тяжести: наименьшее содержание ЭПО выявлено у пациентов с наиболее лёгким течением ХОБЛ (подгруппа А по классификации GOLD) и наибольшее – у пациентов с наиболее тяжёлым течением ХОБЛ (подгруппа D по классификации GOLD) (рис. 2). При попарном сравнении полученных результатов достоверные различия установлены между контрольной группой и подгруппой С ( $p_{(\text{контроль}-\text{С})} = 0,021578$ ), а также контрольной группой и подгруппой D ( $p_{(\text{контроль}-\text{D})} = 0,000721$ ). При попарном сравнении других подгрупп достоверных различий не обнаружено:  $p_{(\text{контроль}-\text{А})} = 1,000000$ ;  $p_{(\text{контроль}-\text{В})} = 0,475235$ ;  $p_{(\text{А}-\text{В})} = 1,000000$ ;  $p_{(\text{А}-\text{D})} = 0,570861$ ;  $p_{(\text{А}-\text{С})} = 1,000000$ ;  $p_{(\text{В}-\text{D})} = 1,000000$ . Таким образом, достоверное увеличение концентрации ЭПО обнаружено при тяжёлом течении ХОБЛ (подгруппы С и D по классификации GOLD).

**Обсуждение.** Известно, что гипоксия вызывает резкие изменения в организме аэробов. Реакции на снижение доставки кислорода к тканям опосредованы через разные механизмы, так называемые сенсорные механизмы дефицита кислорода [5, 21].

Углубление гипоксии сопровождается включением разных адаптационных механизмов, например, увеличением частоты и глубины дыхания, а также увеличением кислородной ёмкости крови (полицитемия, повышение содержания гемоглобина в эритроцитах и изменение диссоциации оксигемоглобина при снижении парциального давления кислорода). Многие из указанных эффектов реализуются путём изменения содержания или состояния различных биологических соединений [1, 5, 21, 22].

Диагностика дефицита кислорода в организме является комплексной и включает оценку клинических признаков (частоту дыхания, цвет кожных покровов и видимых слизистых); функциональных показателей, регистрируемых при исследовании функции внешнего дыхания [1, 3]; а также ряда лабораторных показателей [8, 22]. На сегодняшний день предложено множество разных лабораторных признаков, которые характеризуют степень гипоксии организма: изменение параметров кислородпереносящей функции крови; изменение ферментативной активности ферментов и синтеза тканевых белков, а также содержание ряда соединений, например, молочной кислоты [22–24].

Однако большинство лабораторных показателей характеризуют разные операционные показатели (диагностическая чувствительность, диагностическая специфичность и др.). На сегодняшний день актуально выявление потенциальных маркёров гипоксии по причине нарушения функции внешнего дыхания для диагностики и стратификации тяжести заболеваний, характеризующихся нарушением функции внешнего дыхания. Полученные результаты свидетельствуют о возможности выявления гипоксии у пациентов с ХОБЛ путём измерения концентрации ЭПО сыворотки крови для оценки нарушения функции внешнего дыхания. Обнаруженные изменения концентрации ЭПО в данной группе пациентов требуют дальнейших исследований для уточнения вида и характера зависимости от разных показателей, которые характеризуют степень тяжести нарушения внешнего дыхания.

#### Выводы.

1. Концентрация ЭПО сыворотки крови у пациентов с ХОБЛ выше таковой у здоровых людей.
2. Степень увеличения концентрации ЭПО зависит от тяжести ХОБЛ: минимальна при лёгкой степени ХОБЛ (подгруппа А) и максимальна при наиболее тяжёлой степени ХОБЛ (подгруппа D).
3. Эритропоэтин можно использовать как лабораторный тест, характеризующий тяжесть ХОБЛ.
4. При интерпретации результатов определения содержания ЭПО следует учитывать вероятность возможного увеличения этого показателя у пациентов с ХОБЛ.

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

**Финансирование.** Авторы выражают искреннюю признательность компании ООО «Вектор-Бест» за безвозмездное предоставление набора «Эритропоэтин – ИФА – БЕСТ» (А 8776) («Вектор-Бест», Россия).

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4, 5, 7–9, 11, 13–18, 21–24  
см. REFERENCES)

1. Чучалин А.Г., Авдеев С.Н., Айсанов З.Р., Белевский А.С., Лещенко И.В., Мещерякова Н.Н. и др. Российское респираторное общество. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению хронической обструктивной болезни легких. *Пульмонология*. 2014;(3):15-54.
3. Шустов С.Б., Куренкова И.Г., Харитонов М.А., Асямов К.В. Нарушение функции внешнего дыхания при различных формах легочной патологии. *Пульмонология*. 2017; 27(3): 410-8.
6. Титов В.Н. Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез метаболических пандемий. Артериальная гипертензия. М.: ИНФРА-М; 2015.
10. Новиков В.Е., Левченкова О.С. Гипоксией индуцированный фактор (HIF-1α) как мишень фармакологического воздействия. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2013; 11(2): 8-16.
12. Асадов Ч.Д., Гасанова М.Б., Алимierzоева З.Х., Мамедова Т.А. Сывороточный эритропоэтин при промежуточной талассемии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 57(1): 16-8.
19. Айсанов З.Р., Кокосов А.Н., Овчаренко С.И., Хмелькова Н.Г., Цой А.Н., Чучалин А. Г. и др. Хронические обструктивные болезни легких. Федеральная программа. *Русский медицинский журнал*. 2001;1: 3-50.
20. Энциклопедия клинических лабораторных тестов Н. У Тиц, ред. Пер с англ. В. В. Меньшиков, ред. М.: Издательство «Лабинформ»; 1997.

REFERENCES

1. Chuchalin A.G., Avdeev S.N., Aysanov Z.R., Belevskiy A.S., Leshchenko I.V., Meshcheryakova N.N. et al. Russian respiratory society. Federal guidelines on diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Pul'monologiya*. 2014;(3):15-54. (in Russian)
2. Lindberg A., Linder R., Backman H., Eriksson Ström J., Frølich A., Nilsson U. et al. From COPD epidemiology to studies of pathophysiological disease mechanisms: challenges with regard to study design and recruitment process: respiratory and cardiovascular effects in COPD (COLIN). *Eur. Clin. Respir. J.* 2017; 17;4(1): 1415095.
3. Shustov S.B., Kurenkova I.G., Haritonov M.A., Asyamov K.V. Violation of the function of external respiration in various forms of pulmonary pathology. *Pul'monologiya*. 2017; 27(3): 410-8. (in Russian)
4. Chen T., Yang C., Li M., Tan X. Alveolar Hypoxia-Induced Pulmonary Inflammation: From Local Initiation to Secondary Promotion by Activated Systemic Inflammation. *J. Vasc. Res.* 2016; 53(5-6): 317-29.
5. Khovaeva Ya.B., Syromyatnikova T.N., Ermachkova L.V. Myocardial electric instability markers in patients with chronic obstructive pulmonary disease and connective tissue dysplasia. *European Heart Journal*. 2016; 37(1): 3387.
6. Titov V.N. Phylogenetic theory of general pathology. Pathogenesis of metabolic pandemics. Arterial hypertension [Filogeneticheskaya teoriya obshchey patologii. Patogenez metabolicheskikh pandemiy. Arterial'naya gipertenziya]. Moscow: INFRA-M; 2015. (in Russian)
7. Andreev D.E., O'Connor P.B., Zhdanov A.V., Dmitriev R.I., Shatsky I.N., Papkovsky D.B. et al. Oxygen and glucose deprivation induces widespread alterations in mRNA translation

- within 20 minutes. *Genome Biology*. 2015;16(1): 90.
8. Bussink J., Kaanders J.H., van der Kogel A.J. Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother. Oncol.* 2003;67(1): 3-15.
9. Schmid T., Zhou J., Brüne B. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J. Cell Mol. Med.* 2004; 8(4): 423-31.
10. Novikov V.E., Levchenkova O.S. Hypoxia-inducible factor (HIF-1α) as a pharmacological target. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*. 2013; 11(2): 8-16. (in Russian)
11. Gupta N., Wish J.B. Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors: A Potential New Treatment for Anemia in Patients With CKD. *Am. J. Kidney Dis.* 2017; 69(6): 815-26.
12. Asadov Ch.D., Gasanova M.B., Alimirzoeva Z.H., Mamedova T.A. Serum erythropoietin with intermediate thalassemia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 57(1): 16-8. (in Russian)
13. Summanen M., Seikku L., Rahkonen P., Stefanovic V., Teramo K., Andersson S. et al. Comparison of Umbilical Serum Copeptin Relative to Erythropoietin and S100B as Asphyxia Biomarkers at Birth. *Neonatology*. 2017;112(1): 60-6.
14. Silver R.T., Chow W., Orazi A., Arles S.P., Goldsmith S.J. Evaluation of WHO criteria for diagnosis of polycythemia vera: a prospective analysis. *Blood*. 2013; 122(11):1881-6.
15. Mossuz P., Girodon F., Donnard M., Latger-Cannard V., Dobo I., Boiret N. et al. Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *Haematologica*. 2004; 89(10): 1194-8.
16. Graudal N., Galløe A.M., Nielsen O.J. Erythropoietin in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respiration* 1991;58: 141-4.
17. Vogelmeier C.F., Criner G.J., Martinez F.J., Anzueto A., Barnes P.J., Bourbeau J. et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 Report. GOLD executive summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2017; 195(5): 557-82.
18. Knudson R.J., Kaltborn W.T., Burrows B. The effects of cigarette smoking and smoking cessation on the carbon monoxide diffusion capacity of the lung in asymptomatic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989; 140(3): 645-51.
19. Ajsanov Z.R., Kokosov A.N., Ovcharenko S.I., Hmel'kova N.G., Coj A.N., Chuchalin A.G. et al. Chronic obstructive pulmonary diseases. The federal program. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2001;1: 3-50. (in Russian)
20. Clinical guide to laboratory tests. Third Edition [Entsiklopediya laboratornykh testov]. N. W Tietz, ed. Translation from English. V. V. Men'shikov, ed. Moscow: Labinform; 1997. (in Russian)
21. Prabhakar N.R., Semenza G.L. Oxygen Sensing and Homeostasis. *Physiology*. 2015;30(5): 340-8.
22. Cummins G., Kremer J., Bernassau A., Brown A., Bridle H.L., Schulze H. et al. Sensors for Fetal Hypoxia and Metabolic Acidosis: A Review. *Sensors (Basel)*. 2018 Aug 13;18(8) pii: E2648.
23. Kushimoto S., Akaishi S., Sato T., Nomura R., Fujita M., Kudo D. et al. Lactate a useful marker for disease mortality and severity but an unreliable marker of tissue hypoxia/hypoperfusion in critically ill patients. *Acute Medicine & Surgery*. 2016;3(4): 293-7.
24. Ferguson B.S., Rogatzki M.J., Goodwin M.L., Kane D.A., Rightmire Z., Gladden L.B. Lactate metabolism: historical context, prior misinterpretations, and current understanding. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2018 Apr;118(4): 691-728.

Поступила 29.11.18  
Принята к печати 06.12.18

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 578.82/.83.083.3

Марданлы С.Г., Авдонина А.С.

### РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА G К ОТДЕЛЬНЫМ АНТИГЕНАМ ВИРУСА КРАСНУХИ МЕТОДОМ ИММУННОГО БЛОТТИНГА В ФОРМАТЕ «WESTERN BLOT»

ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Московская область, Россия

*Разработана отечественная тест-система для выявления антител класса G к отдельным антигенам вируса краснухи методом иммунного блоттинга в формате «Western Blot». Новая тест-система предназначена для проведения подтверждающих и дифференцирующих исследований в диагностике краснушной инфекции. Она имеет чувствительность и специфичность, не уступающие чувствительности и специфичности своего аналога – тест-системы «Anti-Rubella virus (IgG) WESTERNBLOT» («EUROIMMUN AG», Германия).*

**Ключевые слова:** краснушная инфекция; вирус краснухи; антитела класса G; иммунный блоттинг.

**Для цитирования:** Марданлы С.Г., Авдонина А.С. Разработка набора реагентов для выявления антител класса G к отдельным антигенам вируса краснухи методом иммунного блоттинга в формате «Western blot». Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (11): 696-701 DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-696-701>

Mardanly S.G., Avdonina A.S.

DEVELOPMENT OF A TEST KIT FOR THE DETECTION OF IGG-ANTIBODIES TO INDIVIDUAL ANTIGENS OF RUBELLA VIRUS BY IMMUNOBLOTTING (WESTERN BLOT)

Closed Joint Stock Company «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Moscow region, Russian Federation

*A Russian test kit for detecting IgG-antibodies to individual antigens of Rubella virus by immunoblotting (Western Blot) was designed. The new test kit is intended for confirmation of positive screening results and for differentiation of stages of infection. It has sensitivity and specificity not conceding one of its analogues, the «Anti-Rubella virus (IgG) WESTERNBLOT» («EUROIMMUN AG», Germany).*

**Key words:** Rubella; Rubella virus; IgG-antibodies; immunoblotting.

**For citation:** Mardanly S.G., Avdonina A.S. Development of a test kit for the detection of IgG-antibodies to individual antigens of Rubella virus by immunoblotting (Western blot). Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (11): 696-701 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-696-701>

**For correspondence:** Avdonina Alexandra Sergeevna, the head of Research and Production Department «STI», vice-head of the Advanced technology; e-mail: [ekolab-avdonina@mail.ru](mailto:ekolab-avdonina@mail.ru)

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

**Acknowledgment.** The work was carried out within the framework of scientific work on the basis of Closed Joint Stock Company «EKOLab».

Received 30.10.2018  
Accepted 06.11.2018

Последние десятилетия ознаменовались резким снижением заболеваемости краснухой во всех регионах Земли, в которых была организована и регулярно проводится вакцинация детей против этой инфекции. Однако, ее медико-социальная значимость по-прежнему велика, а потребность в эффективных методах ее лабораторной диагностики не только не уменьшилась, но даже увеличилась в связи с необходимостью дифференциации иммунологического статуса, вызванного первичной инфекцией, от поствакцинальных состояний.

**Для корреспонденции:** Авдонина Александра Сергеевна, нач. научно-производственного отделения «ИППП», зам. нач. отдела перспективных разработок; e-mail: [ekolab-avdonina@mail.ru](mailto:ekolab-avdonina@mail.ru)

Для такой дифференциации может быть недостаточно использования иммуноферментных тест-систем (ИФТС), определяющих наличие в исследуемых образцах антител разных классов к возбудителю, их содержание и аффинитет. В ряде случаев результаты таких исследований не дают оснований для однозначного заключения о наличии или отсутствии инфекционного процесса, тем более что, по данным Bouthry E. et al. [2], оценки одних и тех же исследуемых образцов, полученные с использованием тест-систем разных производителей, могут не только количественно отличаться друг от друга, но быть прямо противоположными даже в качественном отношении.

В связи с этим существенно возрастает диагностическое значение иммунного блоттинга (ИБ), позволя-

ющего проводить исследование наличия антител к отдельным антигенам возбудителя, поскольку динамика антителообразования независимо от присутствия соответствующих клинических проявлений тесно связана как с возникновением и развитием краснушной инфекции, так и с поствакцинальными процессами в организме [3, 5, 6, 8, 11, 13, 14, 17- 19, 22-24, 26, 27].

В вирусе краснухи выделены три иммунологически значимых антигена – капсидный (С-белок) и два поверхностных гликопротеина оболочки (Е1 и Е2) [9, 12, 21, 25].

Антиген С – негликозилированный белок, молекулярная масса которого зависит от условий электрофореза: при электрофорезе в восстановленных условиях (в присутствии β-меркаптоэтанола) она составляет 33 килодальтон (кДа), а в невосстановленных условиях выделяется его димер с молекулярной массой около 66 кДа [4, 16].

Молекулярная масса Е1 – 58 кДа, молекулярная масса Е2 – 42-48 кДа [10, 20].

Wilson K. M., Di Camillo C., Doughty L., and Dax E. M. [27], исследуя в ИБ (в формате «Western blot») сыворотки сероконверсионной панели, которая состояла из девяти образцов, полученных через 19, 37, 43, 50, 57, 71, 80, 88 и 107 дней после появления симптомов краснушной инфекции, показали очевидную зависимость наличия и интенсивности окрашивания зон, соответствующих отдельным антигенам возбудителя, от стадии инфекционного процесса, во время которой получены исследуемые образцы (рис. 1). Иначе говоря, подтверждена значимость ИБ для диагностики краснухи и оценки стадии текущего инфекционного процесса.

Однако на сегодняшний день для ИБ при диагностике краснухи могут быть использованы только импортные тест-системы – наборы производства фирм «EUROIMMUN AG» (Германия) и «Microgen» (Германия), что делает безусловно актуальной задачу разработки и внедрения в практику их отечественного аналога.

Целью данной работы явилась разработка иммуноферментной тест-системы (на основе нативного лизата вируса краснухи) для выявления антител класса G к отдельным антигенам вируса краснухи методом иммунного блоттинга в формате «Western blot».

**Материал и методы.** Для получения иммуносорбента использовали лизат вируса краснухи фирмы «Biokit» (Испания). В качестве твердой фазы при изготовлении иммуносорбента была использована нитроцеллюлозная мембрана фирмы «Sartorius» (Германия).

При получении иммуносорбента применяли следующие методы:

1. Вертикальный электрофорез лизата вируса краснухи в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-электрофорез, денатурирующие условия по Laemmli U.K. [15]) и β-меркаптоэтанола (восстановленные условия), приводящий к разделению белков (антигенов) по молекулярному весу.

2. Электроперенос разделенных антигенов лизата вируса краснухи из геля на нитроцеллюлозную мембрану (блоттинг).

3. Выявление нанесенных на мембрану антигенов

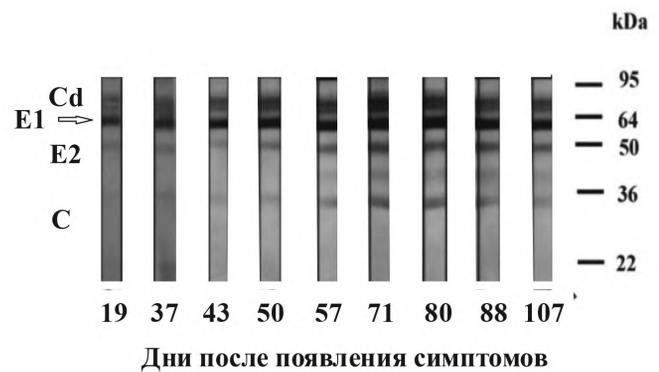


Рис.1. Результаты иммунного блоттинга сывороток сероконверсионной панели [27].

с помощью иммунного блоттинга с последующей визуальной оценкой результатов исследования.

Для детекции вирусспецифических IgG, связавшихся с антигенами иммуносорбента, использовали козы антитела против IgG человека, конъюгированные со щелочной фосфатазой, фирмы «Jakson» (США). Для индикации реакции использовали окрашивающий раствор фирмы «Kem-En-Tec» (Дания), содержащий 5-бром-1-хлор-3-индолилфосфат и нитроголубой тетразолий.

В качестве референсного материала при оценке чувствительности разработанной тест-системы были исследованы сыворотки стандартной панели положительных образцов предприятия ЗАО «ЭКОлаб», содержащих IgG к отдельным антигенам вируса краснухи (СОП<sup>+</sup>-Краснуха-G – 12 образцов). В качестве референсного материала при оценке специфичности разработанной тест-системы были исследованы сыворотки стандартной панели отрицательных образцов предприятия ЗАО «ЭКОлаб», не содержащих антитела к вирусу краснухи (СОП<sup>-</sup>-Краснуха – 12 образцов). Образцы данных панелей изготавливали из сывороток, полученных в коммерческой лаборатории «ИНВИТРО» (г. Москва) и предварительно исследованных на наличие или отсутствие IgG к вирусу краснухи и подтвержденных в тест-системе «Anti-Rubella virus (IgG) WESTERNBLOT» фирмы «EUROIMMUN AG» (Германия). Дополнительным критерием отбора сывороток явилось отсутствие в них антител к возбудителю сифилиса – *Treponema pallidum*, вирусам иммунодефицита человека 1 и 2 типов (ВИЧ-1,2), гепатитов В и С, а также антигенов р24 ВИЧ-1 и HBsAg по результатам скринингового исследования в ИФА.

В качестве клинического материала при оценке диагностической чувствительности и специфичности разработанной тест-системы были использованы сыворотки, полученные из Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора (г. Москва). Сыворотки были предварительно протестированы на наличие IgG к вирусу краснухи с помощью тест-системы «ИФА-Краснуха-IgG» фирмы ЗАО «ЭКОлаб» (Россия).

Статистическая обработка полученных результатов выполнена в соответствии с рекомендациями по стати-

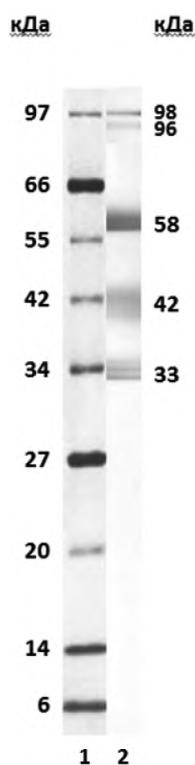


Рис. 2. Результаты электрофоретического анализа антигенного состава лизата вируса краснухи.

1 – белковый маркер молекулярного веса; 2 – результат ИБ мембраны с нанесенными антигенами лизата вируса краснухи при исследовании сыворотки, положительной по наличию IgG к вирусу краснухи.

стической оценке результатов клинических испытаний медицинских изделий для *in vitro* диагностики [1].

**Результаты и обсуждение.** Для разработки новой тест-системы потребовалось решение следующих задач:

- определение оптимального количества лизата вируса краснухи для нанесения на поверхность ПААГ;
- подбор условий электрофореза и электропереноса

са белков на нитроцеллюлозную мембрану;

- определение условий последующей обработки мембраны;

- оптимизация состава остальных компонентов тест-системы (буферные растворы для промывания стрипов и разведения сывороток, конъюгат и окрашивающий раствор);

- подбор оптимальных условий проведения анализа (разведение образца, время инкубаций).

Первый этап в разработке новой тест-системы был связан с отработкой технологии изготовления иммуносорбента.

Электрофоретический анализ антигенного состава лизата вируса краснухи ф. «Biokit» (Испания) показал наличие в нем всех основных высокоспецифичных антигенов: димера поверхностных гликопротеинов E1 и E2 (молекулярная масса 96-98 кДа), поверхностного гликопротеина E1 (58 кДа), поверхностного гликопротеина E2 (42 кДа) и мономера капсидного белка вируса С (33 кДа). Результаты данного исследования представлены на рис. 2.

В ходе испытаний было установлено, что для более четкого электрофоретического разделения белков по молекулярному весу необходимо использование двухфазного ПААГ с концентрацией акриламида 11,5 % в нижней фазе и 4% в верхней фазе.

На втором этапе были подобраны оптимальный состав реагентов для проведения анализа (раствор для разведения сывороток, промывочный раствор, конъюгат) и отработана схема постановки ИБ. Были определены оптимальное разведение исследуемого образца, время инкубации стрипов иммуносорбента с сывороткой, конъюгатом и окрашивающим раствором.

Итогом разработки явилась тест-система «ИФА-Блот-Краснуха-IgG» следующего состава:

1. Иммуносорбент – полоски (стрипы) из нитроцеллюлозной мембраны с сорбированными на них методом электропереноса отдельными антигенами вируса краснухи: гр 98 - гр 96 (димер гликопротеинов E1-E2), гр 58 (гликопротеин E1), гр 42 (гликопротеин E2), р 33 (С-белок); в виде контрольной линии нанесены антитела против IgG человека.

Таблица 1

**Интерпретация результатов ИБ в тест-системе «ИФА-Блот-Краснуха-IgG»**

Наличие IgG к антигенам вируса краснухи	Обозначение	Результат
Выявлены антитела хотя бы к одному из гликопротеинов	+	Положительный
Не выявлены антитела ни к одному из антигенов	-	Отрицательный
Выявлены антитела к антигену р 33 при отсутствии антител к гликопротеинам	+/-	Неопределенный

Таблица 2

**Клиническая интерпретация результатов ИБ в тест-системе «ИФА-Блот-Краснуха-IgG»**

Наличие IgG к поверхностным гликопротеинам		Интерпретация
E1	E2	
-	-	Отрицательный результат, возможна недавняя первичная инфекция или вакцинация
+	-	Ранняя стадия краснухи или недавняя вакцинация. Не исключена поздняя стадия заболевания с задержкой, низким уровнем или отсутствием образования IgG к E2
+	+	Перенесенная краснушная инфекция или вакцинация. Исключена ранняя стадия заболевания
+/-	+/-	Неопределенный результат. Необходимы дополнительные исследования через 2 недели

Таблица 3

**Результаты исследования сывороток стандартной панели положительных образцов предприятия ЗАО «ЭКОлаб» «СОП<sup>+</sup>-Краснуха-G» в тест-системах «Anti-Rubella virus (IgG) WESTERNBLOT» и «ИФА-Блот-Краснуха-IgG»**

№ образца	Результаты исследования в тест-системе...			
	«Anti-Rubella virus (IgG) WESTERNBLOT»		«ИФА-Блот-Краснуха-IgG»	
	наличие антител к антигенам...	оценка	наличие антител к антигенам...	оценка
1	E1, E2, C	положительный	E1, E2, C	положительный
2	E1, E2, C	положительный	E1, E2, C	положительный
3	E1, C	положительный	E1, C	положительный
4	E1, C	положительный	E1, C	положительный
5	E1, E2, C	положительный	E1, E2, C	положительный
6	E1, E2, C	положительный	E1, E2, C	положительный
7	E1, C	положительный	E1, C	положительный
8	E1, E2, C	положительный	E1, E2, C	положительный
9	E1, E2, C	положительный	E1, E2, C	положительный
10	E1, C	положительный	E1, C	положительный
11	E1, E2, C	положительный	E1, E2, C	положительный
12	E1, E2, C	положительный	E1, E2, C	положительный

Таблица 4

**Результаты исследования сывороток стандартной панели отрицательных образцов предприятия ЗАО «ЭКОлаб» «СОП<sup>-</sup>-Краснуха-G» в тест-системах «Anti-Rubella virus (IgG) WESTERNBLOT» и «ИФА-Блот-Краснуха-IgG»**

№ образца	Результаты исследования в тест-системе...			
	«Anti-Rubella virus (IgG) WESTERNBLOT»		«ИФА-Блот-Краснуха-IgG»	
	наличие антител к антигенам...	оценка	наличие антител к антигенам...	оценка
1	-	отрицательный	-	отрицательный
2	-	отрицательный	-	отрицательный
3	-	отрицательный	-	отрицательный
4	-	отрицательный	-	отрицательный
5	-	отрицательный	-	отрицательный
6	-	отрицательный	-	отрицательный
7	-	отрицательный	-	отрицательный
8	-	отрицательный	-	отрицательный
9	-	отрицательный	-	отрицательный
10	-	отрицательный	-	отрицательный
11	-	отрицательный	-	отрицательный
12	-	отрицательный	-	отрицательный

2. Конъюгат – козы антигена против IgG человека, конъюгированный со щелочной фосфатазой.

3. Окрашивающий раствор – 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат и нитроголубой тетразолий.

4. 5-кратный концентрат промывочного раствора [ПР(x5)].

5. Раствор для разведения сывороток (PPC).

6. Референс-стрип (или его фотография) – стрип с проявленным белковым профилем антигенов вируса краснухи: gr 98 - gr 96 (димер гликопротеинов E1-E2), gr 58 (гликопротеин E1), gr 42 (гликопротеин E2), p 33 (С-белок).

Результаты теста оцениваются визуально, интерпретация результатов для каждого исследованного образца осуществляется в зависимости от того, с каким антигеном были выявлены антитела (табл. 1).

Дифференциация первичной и ранее перенесенной инфекций достигается путем определения специфических IgG к поверхностным гликопротеинам E1 и E2 вируса краснухи. IgG к E1 обнаруживаются через 4-6

дней после инфицирования, в то время как выявление IgG к E2 возможно только через 3-4 месяца после начала инфекции (табл. 2).

В случае подозрения на инфекцию, вызванную вирусом краснухи во время беременности, необходимы дальнейшие серодиагностические исследования, например определение специфических IgM и авидности специфических IgG. Выявление высокоавидных антител исключает возможность протекания острого инфекционного процесса в последние 4-6 недель.

Чувствительность разработанной тест-системы вначале была оценена на сыворотках стандартной панели положительных образцов предприятия ЗАО «ЭКОлаб», содержащих IgG к отдельным антигенам вируса краснухи (СОП<sup>+</sup>-Краснуха-G – 12 образцов). В качестве тест-системы сравнения была использована тест-система «Anti-Rubella virus (IgG) WESTERN-BLOT» фирмы «EUROIMMUN AG» (Германия). Результаты данного исследования приведены в табл. 3.

Специфичность разработанной тест-системы бы-

Таблица 5

**Результаты оценки диагностической чувствительности (с доверительной вероятностью 95%) тест-системы «ИФА-Блот-Краснуха-IgG»**

Исследованные образцы	Число исследованных образцов	Результаты исследования в ИБ		Диагностическая чувствительность, %, не менее
		Положительный	Отрицательный	
Сыворотки, содержащие IgG к вирусу краснухи	764	764	0	99,60

Таблица 6

**Результаты исследования диагностической специфичности (с доверительной вероятностью 95%) тест-системы «ИФА-Блот-Краснуха-IgG»**

Исследованные образцы	Число исследованных образцов	Результаты исследования в ИБ		Диагностическая специфичность, %, не менее
		Положительный	Отрицательный	
Сыворотки, не содержащие IgG к вирусу краснухи	31	0	31	90,78

Таблица 7

**Результаты сравнительных испытаний тест-систем «Anti-Rubella virus (IgG) WESTERNBLOT» фирмы «EUROIMMUN AG» (Германия) и «ИФА-Блот-Краснуха-IgG» фирмы ЗАО «ЭКОлаб» на сыворотках, неопределенных по содержанию IgG к вирусу краснухи**

Тест-система фирмы	№ образца	Результат ИБ				Оценка образца
		Наличие антител к антигенам...				
		димер E1-E2	E1	E2	C	
EUROIMMUN	1	+/-	+	-	+	Положительный
ЭКОлаб		+/-	+	-	+	Положительный
EUROIMMUN	2	+/-	+	-	-	Положительный
ЭКОлаб		+/-	+	-	-	Положительный
EUROIMMUN	3	+/-	+	-	-	Положительный
ЭКОлаб		+/-	+	-	-	Положительный
EUROIMMUN	4	+/-	+	-	-	Положительный
ЭКОлаб		+/-	+	-	-	Положительный
EUROIMMUN	5	+/-	+	-	+	Положительный
ЭКОлаб		+/-	+	-	+	Положительный

ла оценена на сыворотках стандартной панели отрицательных образцов предприятия ЗАО «ЭКОлаб», не содержащих антитела к вирусу краснухи (СОП-Краснуха – 12 образцов). Результаты данного исследования приведены в табл. 4.

Результаты, приведенные в табл. 3 и 4, показывают полное совпадение оценок сывороток панелей, полученных в исследовании, с их исходными характеристиками, что является свидетельством высокой диагностической чувствительности и специфичности разработанной тест-системы (нижние значения доверительных интервалов полученных при этом значений показателей диагностической чувствительности и специфичности для вероятности 0,95 составили 0,79).

Для более представительной оценки диагностической (клинической) чувствительности и специфичности тест-системы «ИФА-Блот-Краснуха-IgG» были исследованы 800 сывороток, полученных в Федеральном центре гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора (г. Москва). Предварительное исследование на наличие IgG к вирусу краснухи в скрининговой тест-системе «ИФА-Краснуха-IgG» фирмы ЗАО «ЭКОлаб» показало наличие IgG в 764 образцах и отсутствие IgG в 31 образце. 5 образцов были неопределенными (оптическая плотность в ИФА в пределах «серой зоны»).

Результаты оценки диагностической чувствительности и специфичности разработанной тест-системы приведены в табл. 5 и 6.

5 сывороток, неопределенных по содержанию IgG к вирусу краснухи в ИФА, были исследованы в разработанной тест-системе с целью оценки ее диагностической эффективности в качестве подтверждающего теста. Исследование проводили в сравнении с тест-системой «Anti-Rubella virus (IgG) WESTERNBLOT» фирмы «EUROIMMUN AG» (Германия). Полученные результаты представлены в табл. 7.

Как следует из представленных в табл. 7 данных, все образцы, получившие в ИФА неопределенную оценку по наличию IgG к вирусу краснухи, в ИБ в обеих использованных тест-системах были оценены как положительные.

Таким образом, образцы, неопределенные в ИФА, получили в тест-системе «ИФА-Блот-Краснуха-IgG» окончательные оценки по наличию IgG к вирусу краснухи, полностью совпадающие с оценками, полученными в тест-системе «Anti-Rubella virus (IgG) WESTERNBLOT» фирмы «EUROIMMUN AG» (Германия), что подтверждает высокую диагностическую эффективность разработанной тест-системы как подтверждающего теста.

*Выводы.* Полученные результаты позволяют сде-

дать вывод о том, что разработанная тест-система «ИФА-Блот-Краснуха-IgG», предназначенная для выявления антител класса G к отдельным антигенам вируса краснухи методом иммунного блоттинга в формате «Western blot», имеет высокую диагностическую эффективность, не уступающую характеристикам импортного аналога.

Разработанная тест-система может быть использована для проведения подтверждающих и дифференцирующих исследований в диагностике краснушной инфекции.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках научной работы на базе ЗАО «ЭКОлаб».

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 2 – 27 см. REFERENCES)

1. Антонов В.С. Вопросы статистической оценки результатов клинических испытаний медицинских изделий для *in vitro* диагностики [Электронный ресурс]. - URL: <http://www.ap-skld.ru/Risunki/Antonov.pdf> (дата обращения: 30.10.2018).

#### REFERENCES

1. Antonov V.S. Questions of statistical evaluation of the results of clinical trials of medical products for *in vitro* diagnostics. URL: <http://www.ap-skld.ru/Risunki/Antonov.pdf> (date of the application: 30.10.2018). (in Russian)
2. Bouthry E., Furione M., Huzly D., Ogee-Nwankwo A., Hao L., Adebayo A., Icenogle J., Sarasini A., Grazia Revello M., Grangeot-Keros L., Vauloup-Fellousa Ch. Assessing Immunity to Rubella Virus: a Plea for Standardization of IgG (Immuno) assays. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016; 54 (7): 1720-5.
3. Chaye H.A.H., Mauracher Ch.A., Tingle A.J., Gillam Sh. Cellular and Humoral Immune Responses to Rubella Virus Structural Proteins E1, E2, and C. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992; 30: 2323-9.
4. Clarke D.M., Loo T.W., Hui I. et al. Nucleotide sequence and *in vitro* expression of rubella virus 24S subgenomic mRNA encoding the structural proteins E1, E2 and C. *Nucl. Ac. Res*. 1987; 15: 1531-47.
5. Cusi M.G., Metelli R., Valensin P.E. Immune responses to wild and vaccine rubella viruses after rubella vaccination. *Arch. Virol*. 1989; 106: 63-72.
6. Cusi M.G., Rossolini G.M., Cellesi C., Valensin P.E. Antibody response to wild rubella virus structural proteins following immunization with RA 27/3 live attenuated vaccine. *Archives of Virology*. 1988; 101 (1-2): 25-33.
7. deMazancourt A., Waxham M.N., Nicolas J.C., Wolinsky Y.S. Antibody response to the rubella virus structural proteins in infants with the congenital rubella syndrome. *J. Med. Virol*. 1986; 79: 111-22.
8. Dimech W., Grangeot-Keros L., Vauloup-Fellousb Ch. Standardization of Assays That Detect Anti-Rubella Virus IgG Antibodies. *Clinical Microbiology Reviews*. 2016; 29 (1): 163-74.
9. Dorsett P.H., Miller D.C., Green K.Y., Byrd F.I. Structure and function of the rubella virus proteins. *Rev. Infect. Dis*. 1985; 7: 150-6.

10. Ho-Terry L., Cohen A. The role of glycosylation on hemagglutination and immunological reactivity of rubella virus. *Arch. Virol*. 1984; 79: 139-46.
11. Hornstein L., Levy U., Fogel A. Clinical rubella with virus transmission to the fetus in a pregnant woman considered to be immune. *N. Engl. J. Med*. 1988; 319: 1415-6.
12. Kalkkinen N., Oker-Blom K., Pettersson R.F. Three Genes Code for Rubella Virus Structural Proteins E1, E2a, E2b and C. *J. Gen. Virol*. 1984; 65: 1549-57.
13. Kangro H.O., Grint P.C.A., Hardiman A.E., Ho-Terry L., Terry G.M., Londesborough P. Abnormal antibody response against the rubella virus haemagglutinin. *Serodiag. Immunother. Infect. Dis*. 1989; 3: 161-5.
14. Katow S., Sugiura A. Antibody response to individual rubella virus proteins in congenital and other rubella virus infections. *J. Clin. Microbiol*. 1985; 21: 449-51.
15. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-5.
16. Mauracher C.A., Mitchell L.A., Shukin R., Tingle A.G. pH-dependent solubility shift of rubella virus capsid protein. *Virology*. 1991; 181: 773-7.
17. Mauracher C.A., Mitchell L.A., Tingle A.J. Differential IgG avidity to rubella virus structural proteins. *Journal of Medical Virology*. 1992; 36 (3): 202-8.
18. Meurman O. Detection of antiviral IgM antibodies and its problems (a review). *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 1983; 104:101-31.
19. Nedeljkovic J., Jovanovic T., Mladjenovic S., Hedman K., Peitsaro N., Oker-Blom Ch. Immunoblot analysis of natural and vaccine-induced IgG responses to rubella virus proteins expressed in insect cells. *J. Clin. Virology*. 1999; 14 (2): 119-31.
20. Oker-Blom C., Kalkkinen N., Kääriäinen L. et al. Rubella virus contains one capsid protein and three envelope glycoproteins, E1, E2a and E2b. *J. Virol*. 1983; 46: 964-73.
21. Pettersson R.F., Oker-Blom C., Kalkkinen N., Kallio A., Ulmanen I., Kaariainen L., Partanen P., Vaheri A. Molecular and anti-genic characteristics and synthesis of rubella virus structural proteins. *Rev. Infect. Dis*. 1985; 7: 140-9.
22. Serdula M.K., Halstead S.B., Wiegenga N.H., Herrman K.L. Serological response to rubella revaccination. *JAMA*. 1984; 251: 1974-7.
23. Tingle A.J., Chantler J.K., Pot K.H., Paty D.W., Ford D.K. Postpartum rubella immunization: association with development of prolonged arthritis, neurological sequelae and chronic rubella viremii. *J. Infect. Dis*. 1985; 152: 606-12.
24. Wandinger K-P., Saschenbrecker S., Steinhagen K., Schepher Th., Meyer W., Bartelt U., Enders G. Diagnosis of recent primary rubella virus infections: Significance of glycoprotein-based IgM serology, IgG avidity and immunoblot analysis. *Journal of Virological Methods*. 2011; 174 (1-2): 85-93.
25. Waxham M.N., Wolinsky J.S. A model of the structural organization of rubella virions. *Rev. Infect. Dis*. 1985; 7: 133-9.
26. Williams L.L., Wolinsky J.S., Cao S.N., Shannon B.T., Leguire L.E. Antibody response to rubella virus antigen and structural proteins in retinitis pigmentosa. *J. Infect. Dis*. 1992; 166 (3): 525-30.
27. Wilson K.M., Di Camillo C., Doughty L., Dax E.M. Humoral Immune Response to Primary Rubella Virus Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2006; 13 (3): 380-6.

Поступила 30.10.18  
Принята к печати 06.11.18

Лаврова Д.П.<sup>1</sup>, Заводовский Б.В.<sup>2</sup>, Ахвердян Ю.Р.<sup>2</sup>, Полякова Ю.В.<sup>2</sup>, Сивордова Л.Е.<sup>2</sup>, Зборовская И.А.<sup>2</sup>, Яковлев А.Т.<sup>1</sup>

## ИРИСИН КАК НОВЫЙ МАРКЕР РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ НИЗКОТРАВМАТИЧЕСКИХ ПЕРЕЛОМОВ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 400131, Волгоград, Россия;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского», 400138, Волгоград, Россия

*Целью данного исследования было изучение взаимосвязи между уровнем ирисина в сыворотке крови и наличием низкотравматических переломов костей у больных ревматоидным артритом (РА).*

*Было обследовано 170 человек, из них 110 пациентов с диагнозом РА и 60 здоровых лиц, составивших группу сравнения. Уровень ирисина в сыворотке крови определялся методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческой тест-системы ELISA Irisin (BioVendor, cat. № RAG018R).*

*Средний уровень ирисина в группе здоровых лиц составил  $20,49 \pm 4,82$  мкг/мл ( $\mu \pm \sigma$ ). Уровень нормальных значений, определяемый как  $M \pm 2\sigma$ , составил 10,85-30,13 мкг/мл. Сниженный уровень ирисина был выявлен у 41 человека из 110 пациентов с диагнозом РА (37% случаев). Для данной группы больных было характерно: более высокая степень активности по DAS28, наличие внесуставных проявлений, продолжительность болезни от 5 до 10 лет, больший класс функциональной недостаточности суставов, более низкий уровень 25(OH)-витамина D. Также была выявлена достоверная взаимосвязь между уровнем ирисина в сыворотке крови и наличием низкотравматических переломов костей в анамнезе.*

**Ключевые слова:** ирисин; цитокины; миокины; ревматоидный артрит; остеопороз; низкотравматические переломы.

**Для цитирования.** Лаврова Д.П., Заводовский Б.В., Ахвердян Ю.Р., Полякова Ю.В., Сивордова Л.Е., Зборовская И.А., Яковлев А.Т. Ирисин как новый маркер ранней диагностики низкотравматических переломов при ревматоидном артрите. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (11): 702-706. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-702-706>

Lavrova D.P.<sup>1</sup>, Zavadovsky B.V.<sup>2</sup>, Akhverdyan Yu.R.<sup>2</sup>, Polyakova Yu.V.<sup>2</sup>, Sivordova L.E.<sup>2</sup>, Zborovskaya I.A.<sup>2</sup>, Yakovlev A.T.<sup>1</sup>

### IRISIN AS A NEW MARKER OF EARLY DIAGNOSTICS OF LOW-TRAUMATIC FRACTURES IN RHEUMATOID ARTHRITIS

<sup>1</sup>Volgograd State Medical University, 400131, Volgograd, Russian Federation;

<sup>2</sup>The research institute of clinical and experimental rheumatology them. A.B. Zborovsky, 400138, Volgograd, Russian Federation

*The aim of this study was to study the relationship between serum irisin level and the presence of low-traumatic bone fractures in rheumatoid arthritis (RA) patients.*

*We examined 170 people including 110 RA patients and 60 healthy individuals as comparison group. The serum irisin level was determined with solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay using ELISA Irisin test system (BioVendor, cat. No. RAG018R). The average level of irisin in the group of healthy individuals was  $20.49 \pm 4.82$   $\mu\text{g/ml}$  ( $\mu \pm \sigma$ ). The level of normal values, defined as  $M \pm 2\sigma$ , was 10.85-30.13  $\mu\text{g/ml}$ . Decreased irisin level was detected in 41 of 110 patients with RA diagnosis (37% of cases). This group of patients had higher RA activity degree (DAS28), extra-articular manifestations, disease duration from 5 to 10 years, greater class of functional joint's failure, lower level of 25 (OH) -vitamin D. There was also a reliable relationship between serum irisin level and presence of low-fracture bone fractures in the anamnesis.*

**Key words:** irisin; cytokines; myokines; rheumatoid arthritis; osteoporosis; low-fracture fractures.

**For citation:** Lavrova D.P., Zavadovsky B.V., Akhverdyan Yu.R., Polyakova Yu.V., Sivordova L.E., Zborovskaya I.A., Yakovlev A.T. Irisin as a new marker for the early diagnosis of low-traumatic fractures in rheumatoid arthritis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (11): 702-706 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-702-706>

**For correspondence.** Lavrova D.P., post-graduate student of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics; e-mail: [DiaLav-office@mail.ru](mailto:DiaLav-office@mail.ru)

#### Information about authors:

Lavrova D.P., <https://orcid.org/0000-0001-7931-8959>

Akhverdyan Yu.R., <https://orcid.org/0000-0001-8010-6777>

Sivordova L.E., <https://orcid.org/0000-0002-0965-6060>

Zavadovsky B.V., <https://orcid.org/0000-0002-8864-9570>

Polyakova Yu.V., <https://orcid.org/0000-0002-3022-4166>

Yakovlev A.T., <https://orcid.org/0000-0001-5501-2461>

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

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

Received 08.07.2018  
Accepted 01.10.2018

**Введение.** На сегодняшний день РА является одним из наиболее грозных аутоиммунных ревматических заболеваний с неустановленной этиологией [1]. В 28-77% случаев РА осложняется остеопорозом (ОП), который относится к вторичным метаболическим остеопатиям, обусловленным иммуноопосредованным нарушением костного ремоделирования с преобладанием процессов костной резорбции, приводящих к снижению костной плотности и увеличению риска низкотравматических переломов [2].

В патогенезе ОП при РА большое значение играют антропометрические показатели, такие, как возраст и женский пол (ранняя менопауза), низкие индексы массы тела и минеральная плотность костной ткани (МПКТ), отягощенный семейный анамнез, дефицит витамина D и недостаточное потребление кальция. Другая группа факторов риска связана с тяжестью и активностью заболевания. К ним относятся активация клеточного звена иммунитета и повышенная продукция провоспалительных цитокинов, высокая активность РА и функциональная недостаточность суставов, снижение двигательной активности, гормональные нарушения, снижение клиренса креатинина, скорости клубочковой фильтрации, повышение концентрации гомоцистеина в плазме крови, осложнения терапии глюкокортикоидами (ГК) и цитостатиками.

В многочисленных исследованиях было установлено, что в патогенезе метаболических заболеваний костей большое значение играют адипокины и миокины, вырабатываемые жировой и мышечной тканью соответственно. Показано, что данные вещества обладают свойствами гормонов, активно принимают участие в развитии воспаления и иммунном ответе [3]. Так, адипокин адипонектин повышает чувствительность периферических тканей к инсулину [4]. Его дефицит ведёт к развитию синдрома инсулинорезистентности [5, 6]. Аналогичные эффекты были выявлены и у других адипокинов: адипсина, висфатина, лептина, резистина, фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) [7-11].

В настоящее время показано, что миокины способны синтезироваться не только мышечной тканью, но и подкожной жировой клетчаткой, лимфоидными органами, нервной тканью и даже клетками аденомы гипофиза [12].

Термин миокин был впервые предложен P. Pedersen в 2008 г. [13]. Он же выдвинул концепцию морбидомы (в оригинале - «diseasome») - нозологического кластера, который имеет в своей основе хроническое низкоактивное воспаление, являющееся общей чертой патогенеза многих метаболических заболеваний [14]. Первым обнаруженным и наиболее изученным миокином является интерлейкин-6 (ИЛ-6) - провоспалительный цитокин с широким спектром иммунорегуляторных свойств, а также медиатор образования, роста и прогрессии опухолей различной природы и локализации [15]. В настоящее время семейство миокинов включает в себя: миостатин, декорин, интерлейкин-8, остеонектин, интерлейкин-15, мозговой нейротрофический фактор (МНФ) [16-20].

Один из наиболее важных миокинов ирисин (irisin) был открыт в 2002 г. Было выявлено, что он облада-

ет свойствами цитокина и в связи с этим был назван в честь греческой богини Ириды (по-английски *Iris*), считавшейся вестницей богов. В последние годы показана взаимосвязь между уровнем ирисина и состоянием костной ткани. Установлено, что сниженные уровни ирисина обнаруживаются у женщин с постменопаузальным остеопорозом (ОП) с низкотравматическими переломами костей в анамнезе [21, 22]. Показано, что в присутствии этого миокина увеличивается функциональная активность остеобластов: повышается отложение кальция в культуре клеток, увеличивается активность щелочной фосфатазы.

Исходя из этих данных можно сделать вывод о том, что изучение уровня ирисина у пациентов с РА, осложнённым ОП, является актуальным и представляет большой научный интерес.

**Материал и методы.** Для решения поставленных задач в исследование были включены 170 человек, разделённые на группу пациентов с диагнозом РА и здоровых лиц. Отбор по группам проводился в соответствии с рядом требований.

Критериями включения стали:

1. Наличие у больных диагноза РА, соответствующего диагностическим критериям (согласно критериям Американской коллегии ревматологов, ACR/EULAR 2010 г.), установленным не менее, чем за месяц до планируемого скрининга.

2. Возраст от 18 до 90 лет.

3. Наличие письменного информированного согласия пациента на участие в исследовании.

Критериями исключения были:

1. Беременность и период лактации.

2. Острая и хроническая формы гепатита в анамнезе.

3. Хронические инфекции, признаки острой инфекции в период наблюдения и за 3-4 недели до взятия крови.

4. Тяжёлые сопутствующие патологии (сахарный диабет 1 и 2 типа, хроническая почечная недостаточность 3 и 4 функционального класса, хроническая почечная недостаточность в терминальной стадии, дыхательная недостаточность 2 и 3 степени), требующие активного лечения.

5. Злокачественные образования на момент отбора.

В исследовании принимали участие пациенты, проходящие амбулаторное лечение в клинко-диагностическом отделении ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского» (Волгоград) и практически здоровые лица, являющиеся донорами отделения переливания крови ГУЗ «ГКБСМП № 25» г. Волгограда, не имеющие жалоб на боли в суставах в течение всей жизни и без клинических проявлений РА. Исследование проводилось с 2015 по 2018 г.

В каждой группе было проведено полное клинко-лабораторное обследование, состоявшее из сбора анамнеза, осмотра, клинических лабораторных и инструментальных методов исследования:

– счетчика активности болезни (Disease Activity Score) для 28 суставов;

– определение минеральной плотности костной ткани и композитного состава тела проводилось с по-

Таблица 1

**Взаимосвязь между уровнем ирисина и лабораторными показателями, отражающими интенсивность обмена костной и хрящевой тканей**

Лабораторные показатели	Уровень ирисина, ( $\mu\pm\sigma$ )		Достоверность различий в группах F, p
	Нормальный $\geq 10,85$ мкг/мл; n=66	Сниженный $< 10,85$ мкг/мл; n=44	
25(ОН)-витамина D (нг/мл)	53,16 $\pm$ 18,62	46,13 $\pm$ 16,13	F=4,166 p=0,044
Cartilaps/Creatinin urine	459,10 $\pm$ 199,27	564,45 $\pm$ 218,68	F=6,558 p=0,012
C-телопептид коллагена I типа (нг/мл)	0,64 $\pm$ 0,35	0,74 $\pm$ 0,41	F=1,925 p=0,168
N-терминальный пропептид проколлаген I типа (P1NP) (нг/мл)	61,39 $\pm$ 37,91	57,98 $\pm$ 55,50	F=0,127 p=0,722

мощью DEXA-денситометра Lunar DPX-Pro (General Electric; США);

- общеклинические анализы крови и мочи;
- определение маркеров, отражающих активность заболевания: уровня ревматоидного фактора (РФ) (HUMATEX RF (Human GmbH; Германия)) и высокочувствительного варианта иммуноферментного анализа для выявления С-реактивного белка (High sensitivity C-reactive protein enzyme immunoassay test Kit (Biomerica; США));

- измерение уровня маркеров костного обмена: С-телопептид коллагена I типа (AccuBind; США) и уровня N-терминального пропептида проколлагена I типа (Procollagen I N-terminal peptide (PINP) (CloudClone Corp.; USA));

- определение маркера хрящевого обмена - продукта деградации коллагена II типа urine CartiLaps (Immunodiagnostiosystems; Япония);

- количественное измерение уровня 25(ОН)-витамина D (25-Hydroxy Vitamin D EIA (Immunodiagnostiosystems; Япония)).

Определение уровня ирисина в сыворотке крови проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческого набора *Irisin ELISA BioVender* (кат. № RAG018R) согласно инструкции производителя.

Группу больных РА составили 110 человек, из которых было 106 женщин и 4 мужчин в возрасте от 21 до 81 года (53,58 $\pm$ 12,32 лет ( $M\pm\sigma$ )). Большая часть обследованных были представлены лицами трудоспо-

собного возраста, что говорит о важной социальной значимости заболевания.

В контрольную группу вошли 60 практически здоровых лиц, из них 54 женщины и 6 мужчин, не имеющих жалоб на боли в суставах в анамнезе и на момент исследования. Больные РА были сопоставимы с группой здоровых лиц по возрасту и полу.

Было получено заключение комитета по биомедицинской этике ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ (протокол №2096-2016 от 13 января 2017 г.).

Статистическая обработка данных клинического обследования была осуществлена с помощью программного пакета «STATISTICA 10.0 для Windows». Статистический анализ количественных данных произведён с использованием критерия достоверности Стьюдента, качественных данных - с применением критерия достоверности «хи-квадрат». Достоверность различий между группами определяли с помощью дисперсионного анализа. Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты и обсуждение.* Для создания представления о нормальных величинах изученных параметров, характерных для здоровых людей, нами была произведена оценка уровня ирисина сыворотки крови здоровых лиц.

В ходе исследования было установлено, что средний уровень ирисина у здоровых лиц составил 20,49 $\pm$ 4,82 мкг/мл ( $M\pm\sigma$ ), при этом уровень нормальных значений ирисина, определяемый как  $M\pm 2\sigma$ , составил от 10,85 до 30,13 мкг/мл.

Таблица 2

**Взаимосвязь между уровнем ирисина в сыворотке крови и наличием переломов костей в анамнезе при РА**

Переломы костей в анамнезе	Нормальный уровень ирисина, $\geq 10,85$ мкг/мл ( $\mu\pm\sigma$ ); n=66	Сниженный уровень ирисина, $< 10,85$ мкг/мл ( $\mu\pm\sigma$ ); n=44	Достоверность различий в группах $\chi^2, p$
Наличие любых переломов, %	26 (60,47%)	17 (39,53%)	$\chi^2=0,006$ p=0,936
Отсутствие любых переломов, %	40 (59,70%)	27 (40,30%)	
Наличие низкотравматических переломов, %	5 (35,71%)	9 (64,29%)	$\chi^2=3,942$ p=0,047
Отсутствие низкотравматических переломов, %	61 (63,54%)	35 (36,46%)	

Таблица 3

**Взаимосвязь между уровнем ирисина в сыворотке крови и локализацией переломов костей при РА**

Параметр	Нормальный уровень ирисина, $\geq 10,85$ мкг/мл ( $\mu \pm \sigma$ ); $n=66$	Сниженный уровень ирисина, $< 10,85$ мкг/мл ( $\mu \pm \sigma$ ); $n=44$	Достоверность различий в группах $\chi^2$ , $p$
Типы низкотравматических переломов			
Центральные	3 (4,55%)	3 (6,82%)	$\chi^2=0,324$ $p=0,852$
Периферические	23 (34,85%)	14 (31,82%)	

Уровень ирисина не зависел от пола, возраста, антропометрических данных, композитного состава и индекса массы тела как у здоровых лиц, так и у пациентов с РА. Нами не было выявлено у больных РА взаимосвязи между сывороточным уровнем ирисина и минеральной плотностью костной ткани ( $p=0,472$ ). Снижение уровня ирисина у пациентов с РА также не зависело от степени активности заболевания и степени минеральной плотности костной ткани по данным DEXA-денситометрии ( $p=0,472$ ).

Для выяснения клинико-патогенетического значения определения уровня данного миокина у пациентов с РА они были разделены на две группы с нормальным (более 10,85 мкг/мл) и сниженным (менее 10,85 мкг/мл) уровнем ирисина. В группах проводилось измерение лабораторных маркеров костного обмена (С-телопептид коллагена I типа, N-терминальный пропептид проколлагена I типа в сыворотке крови), 25-ОН витамина D, скорости деструкции суставного хряща (Cartilaps/Creatinin в моче), минеральной плотности костной ткани, наличию и локализации переломов костей в анамнезе. Результаты представлены в табл. 1-3.

Нами было выявлено, что у больных РА со сниженным уровнем ирисина наблюдаются меньшие уровни 25(ОН)-витамина Д ( $p=0,044$ ) в сыворотке крови и более высокие - продукта деградации коллагена II типа Cartilaps в моче, отражающего скорость деградации хряща при РА ( $p=0,012$ ).

Сниженный уровень изучаемого миокина был достоверно связан с наличием низкотравматических переломов костей в анамнезе ( $p=0,047$ ), но не зависел от типа этих переломов (центральные или периферические) и их локализации (позвонки, проксимальный отдел бедренной кости или предплечье) ( $p=0,166$ ).

**Заключение.** Из результатов нашего исследования следует, что средний уровень ирисина сыворотки крови у больных с РА достоверно ниже, чем у здоровых лиц, и не связан с активностью заболевания. Также уровень ирисина не коррелирует с минеральной плотностью костной ткани.

Снижение уровня этого миокина при РА ассоциируется со сниженным уровнем 25(ОН)-витамина Д в сыворотке крови и повышением концентрации продукта деградации коллагена II типа urine Cartilaps в моче, являющимся маркером деградации суставного хряща при РА. Нами была выявлена достоверная связь между уровнем ирисина и наличием низкотравмати-

ческих переломов костей в анамнезе вне зависимости от типа этих переломов и их локализации. Мы считаем, что данный метод определения ирисина может использоваться в диагностике для прогнозирования низкотравматических переломов костей у больных РА. Мы также предполагаем, что уровень ирисина в сыворотке крови может отражать качество костной ткани у больных с РА.

**Сфера возможного применения результатов исследования.** Взаимосвязь уровня 25 (ОН)-витамина Д сыворотки крови с уровнем ирисина при РА вероятно позволит выделить группу пациентов с РА с повышенным риском развития низкотравматических переломов костей. Взаимосвязь между концентрацией ирисина и уровнем Cartilaps мочи может быть использована для прогнозирования скорости разрушения суставного хряща при РА.

Определение уровня ирисина сыворотки крови может стать лабораторным показателем, позволяющим охарактеризовать качество костной ткани, что даст возможность прогнозировать низкотравматические переломы костей при данном заболевании.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-8, 12-15, 18-22 см. REFERENCES)

- Зборовская И.А., Симакова Е.С., Заводовский Б.В., Ахвердян Ю.Р., Кононов В.Е. Прогностическое значение определения уровня лептина у работников промышленных предприятий города Волгограда с остеоартрозом. *Медицина труда и промышленная экология*. 2013; 1: 34-8.
- Павлова А.Б., Ахвердян Ю.Р., Симакова Е.С., Заводовский Б.В., Сивордова Л.Е. Определение адипонектина у работников промышленных предприятий с воспалительными заболеваниями суставов. *Медицина труда и промышленная экология*. 2013; 1: 38-41.
- Ахвердян Ю.Р., Заводовский Б.В., Полякова Ю.В., Сивордова Л.Е., Зборовская И.А. Никотинамидфосфорибозилтрансфераза как маркер системного воспаления при остеоартрозе. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(10): 606-10.
- Друцкая М.С., Носенко М.А., Атретханы К.С.Н., Ефимов Г.А., Недоспасов С.А. Интерлейкин 6 - от молекулярных механизмов передачи сигнала к физиологическим функциям и терапевтическим мишеням. *Молекулярная биология*. 2015; 49(6): 937-43.

REFERENCES

- Colaianne G., Cuscito C., Mongelli T., et al. Irisin enhances osteoblast differentiation in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014; 2014: 902186.
- Palermo A., Strollo R., Maddaloni E., et al. Irisin is associated with osteoporotic fractures independently of bonemineral density, body composition or daily physical activity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015; 82(4): 615-9.
- Rall L.C., Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. Oxford: Rheumatology. 2004; 43:1219-23.
- Furuhashi M., Nobuyuki U., Moniwa N. et al. Possible Impairment of Transcardiac Utilization of Adiponectin in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27: 2217-21.
- Havel P. J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate. *Diabetes*. 2004; 52: 143-51.
- Rajala M.W., Scherer P.E. Adipocyte - at the crossroads of energy ho-

- meostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology Journals*. 2003; 144(9): 3765-73.
7. Rajala M., Scherer E. The Adipocyte - at the crossroads of energy homeostasis, inflammation and atherosclerosis. *Endocrinology*. 2003; 144: 3765-73.
  8. Berndt J., Klöting N., Kralisch S. et al. Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes*. 2005; 54: 2911-16.
  9. Zborovskaya I.A., Simakova E.S., Zavodovsky B.V., Akhverdyan Yu.R., Kononov V.E. The prognostic value of determining leptin levels in workers of industrial enterprises of the city of Volgograd with osteoarthritis. *Meditsina truda I promyshlennaya ekologiya*. 2013; 1: 34-8. (in Russian)
  10. Pavlova, A. B., Akhverdyan, Yu.R., Simakova, E.S., Zavodovsky, B.V., Sivordova, L.E. Definition of adiponectin in industrial workers with inflammatory diseases of the joints. *Meditsina truda I promyshlennaya ekologiya*. 2013; 1: 38-41. (in Russian)
  11. Akhverdyan Yu.R., Zavodovsky B.V., Polyakova Yu.V., Sivordova L.E., Zborovskaya. I.A. Nicotinamidphosphoribosyltransferase as a marker of systemic inflammation in osteoarthritis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62 (10): 606-10. (in Russian)
  12. Boström P., Wu J., Jedrychowski M.P., et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012; 481(7382): 463-8.
  13. Pedersen B.K., Febbraio M.A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological Reviews*. 2008; 88: 1379-1406.
  14. Pedersen B.K. The disease of physical inactivity and the role of myokines in muscle-fat cross talk. *The Journal of Physiology*. 2009; 587(23): 5559-68.
  15. Matsuzawa Y., Funahashi T., Kihara S., Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004; 1: 24-9.
  16. Drutskaya M.S., Nosenko M.A., Atretkhany K.C.N., Efimov, G.A., Nedospasov S.A. Interleukin 6 - from molecular mechanisms of signal transmission to physiological functions and therapeutic targets. *Molekulyarnaya biologiya*. 2015; 49 (6): 937-43. (in Russian)
  17. Uldry M., Yang W., St-Pierre J. et al. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell metabolism*. 2006; 3(5): 333-41.
  18. Arany Z., He H., Lin J. et al. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell metabolism*. 2005; 1(4): 259-71.
  19. Lin J., Wu P.H., Tarr P.T. et al. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha mice. *Cell*. 2004; 119(1): 121-35.
  20. Kanzleiter T., Rath M., Görgens S.W. et al. The myokine decorin is regulated by contraction and involved in muscle hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014; 450(2): 1089-94.
  21. Yaprak E.-Ü., Emel K.Ç., Ayşe Y.G., Muhammed F.P. Postmenopausal osteoporosis is associated with serum chemerin and irisin but not with apolipoprotein M levels. *Journal of Menopausal Medicine*. 2016; 22: 76-9.
  22. Yan J., Liu H.-J., Guo W.-C., Yang J. Low serum concentrations of irisin are associated with increased risk of hip fracture in Chinese older women. *Joint Bone Spine*. 2017; 1297-319X(17)30074.

Поступила 08.07.18

Принята к печати 01.10.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 618.11-006.04-053.88-078.33

Харченко В.В.<sup>1</sup>, Агарков Н.М.<sup>2</sup>, Коровин Е.Н.<sup>3</sup>, Иванов В.А.<sup>1</sup>, Будник И.В.<sup>2</sup>, Макконен К.Ф.<sup>4</sup>, Жернакова Н.И.<sup>4</sup>

## ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ И ДИСКРИМИНАНТНЫЙ АНАЛИЗ В СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЯИЧНИКОВ В ПОЖИЛОМ ВОЗРАСТЕ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет, 305041, Курск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Юго-Западный государственный университет, 305040, Курск, Россия;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО Воронежский государственный технический университет, 394026, Воронеж, Россия;

<sup>4</sup>ФГАУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет, 308015, Белгород, Россия

*Среди женщин пожилого возраста рак яичников является распространенной патологией в структуре новообразований. Цель работы – выявление ведущих показателей интерлейкинового профиля для совершенствования диагностики рака яичников в пожилом возрасте. Иммуноферментным анализом изучено содержание интерлейкинов в сыворотке крови у 78 больных раком яичников IIВ-IIIВ стадии по классификации FIGO в возрасте 65-70 лет и 42 женщин аналогичного возраста без рака яичников на момент исследования и в анамнезе. Дифференциация сравниваемых групп проведена с помощью дискриминантного метода. Ведущими диагностическими интерлейкинами для рака яичников в пожилом возрасте являются IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 и TNF- $\alpha$ . Построенные дискриминантные модели позволяют дифференцировать больных раком яичников и женщин контроля с точностью 93,2-93,8%. Применение иммуноферментного и дискриминантного анализа совершенствуют диагностику рака яичников у лиц пожилого возраста.*

**Ключевые слова:** рак яичников; интерлейкины крови; иммуноферментный анализ; дискриминантный метод.

**Для цитирования:** Харченко В.В., Агарков Н.М., Коровин Е.Н., Иванов В.А., Будник И.В., Макконен К.Ф., Жернакова Н.И. Иммуноферментный и дискриминантный анализ в совершенствовании диагностики рака яичников в пожилом возрасте. Клиническая лабораторная диагностика 2018; 63 (11): 707-710. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-707-710>

Kharchenko V.V.<sup>1</sup>, Agarkov N.M.<sup>2</sup>, Korovin E.N.<sup>3</sup>, Ivanov V.A.<sup>1</sup>, Budnik I.V.<sup>2</sup>, Makkonen K.F.<sup>4</sup>, Zhernakova N.I.<sup>4</sup>

### IMMUNOASSAY AND DISCRIMINANT ANALYSIS TO IMPROVE THE DIAGNOSIS OF OVARIAN CANCER IN THE ELDERLY

<sup>1</sup>FGBOU VO Kursk state medical University, 305041, Kursk, Russia;

<sup>2</sup>FGBOU VO Southwestern state University, 305040, Kursk, Russia;

<sup>3</sup>FGBOU VO Voronezh state technical University, 394026 Voronezh, Russia;

<sup>4</sup>FGAOU VO Belgorod state University, 308015, Belgorod, Russia

*Ovarian cancer is a common pathology in the structure of tumors among elderly women. The aim of the work is to identify the leading indicators of interleukin profile to improve the diagnosis of ovarian cancer in the elderly. Enzyme immunoassay studied serum levels of interleukins in 78 patients with ovarian cancer stage IIВ-IIIВ according to the classification of FIGO at the age of 65-70 years and 42 women of similar age without ovarian cancer at the time of the study and in history. The differentiation of the compared groups is carried out by means of discriminant method. The leading diagnostic interleukins for ovarian cancer in the elderly are IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF- $\alpha$ . The constructed discriminant models allow to differentiate patients with ovarian cancer and control women with an accuracy of 93.2-93.8%. The use of enzyme immunoassay and discriminant analysis improve the diagnosis of ovarian cancer in the elderly.*

**Key words:** ovarian cancer; blood interleukins; enzyme immunoassay; discriminant method.

**For citation:** Kharchenko V.V., Agarkov N.M., Korovin E.N., Ivanov V.A., Budnik I.V., Makkonen K.F., Zhernakova N.I. Immunoassay and discriminant analysis to improve the diagnosis of ovarian cancer in the elderly. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (11): (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-707-710>

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

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

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

Received 27.06.2018  
Accepted 25.11.2018

**Введение.** В современной онкогинекологии рак яичников (РЯ) объективно считается высокоактуальной проблемой [1- 4]. В 2012 г., согласно Всемирной базе данных GLOBOCAN, РЯ в мире заболели около 238 700 женщин и 151 900 умерли от него [5]. По оценкам экс-

пертов, в 2015 г. число заболевших РЯ превысило 250 000, а число умерших – 160 000 с ежегодным увеличением заболеваемости на 0,6% и смертности на 0,8%.

По заболеваемости РЯ Российская Федерация в 2015 г. вышла на первое место в мире (17,9 случаев на 100 000

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

женщин). В 2015 г. в России более 14 000 женщин заболели РЯ и почти 8 000 умерли от него [6]. Среди злокачественных новообразований женских репродуктивных органов РЯ находится на 3-ем месте по числу заболевших и на 1-м месте – по числу умерших [1, 3, 6]. Заболеваемость РЯ резко возрастает после 40 лет и достигает пика в пожилом возрасте (65-69 лет), составляя 40,6 случаев на 100 000 женщин данного возраста [3]. Средний возраст больных с впервые установленным диагнозом РЯ составляет 59-63 года [7]. Однако по мере увеличения доли пожилых женщин среди населения России, наблюдаемое в последние годы, заболеваемость и смертность вследствие РЯ будут увеличиваться [3].

Высокая заболеваемость и смертность при РЯ обусловлены отсутствием характерных симптомов, эффективных способов ранней диагностики; скрининговых методов, продемонстрировавших свою результативность в крупных клинических исследованиях; скрытым течением ранних этапов онкогенеза; выявлением 80% РЯ на поздних стадиях; низкой медицинской активностью женщин пожилого возраста, снижением противоопухолевого иммунитета в данном возрасте [4, 8]. В связи с этим перспективным методом диагностики считается иммунологический и, в частности, по изучению цитокинового статуса пациентов [8-10].

*Цель работы* – выявление ведущих показателей интерлейкинового профиля для совершенствования диагностики РЯ в пожилом возрасте.

*Материал и методы.* В Белгородском областном онкологическом диспансере проведено обследование 78 больных РЯ в возрасте 65-70 лет, составивших основную группу. Контролем послужили 42 женщины аналогичного возраста, не имеющих на момент исследования и в анамнезе РЯ. В основной группе на основе клинического, лабораторного, иммуноферментного, гистологического и ультразвукового методов верифицирован РЯ IIВ-IIIВ стадии в соответствии с классификацией FIGO [11]. Определение уровня интерлейкинов в периферической крови осуществлялось твердофазным иммуноферментным анализом с набором реагентов ООО «Цитокин» ( Санкт-Петербург).

Статистическая обработка результатов исследования включала вычисление средних арифметических величин, ошибок этих величин, показателей дезинтеграции по ранее опубликованной методике [2] на ЭВМ типа «Pentium» по стандартной программе «Statistica 6.0».

С помощью названного пакета прикладных программ и дискриминантного метода выполнена дифференциация больных РЯ и женщин без РЯ из контрольной группы.

*Результаты и обсуждение.* Анализ концентрации интерлейкинов в периферической крови больных РЯ и в контроле выявил по большинству параметров достоверную разницу (табл. 1). Обращает внимание, что развитие РЯ приводит к резкому увеличению содержания IL-1 $\beta$ , которое по отношению к группе сравнения возросло в 21 раз. У больных РЯ значительно повысилась и концентрация IL-8, IL-1 $\alpha$ . Концентрация TNF- $\alpha$  при злокачественных новообразованиях яичников репрезентативно выросла, а в контроле практически не изменилась. Не установлено достоверных различий в сравниваемых группах концентрации в периферической крови IL-2, IL-10 и IL-12. Содержание IL-4 при РЯ возросло ( $p < 0,001$ ), но в контрольной группе – понижено существенно.

В ранее выполненном исследовании сыворотки крови твердофазным иммуноферментным анализом у больных I-IV стадии РЯ (по FIGO) установлено существенное повышение IL-1 $\beta$  до 216,7 $\pm$ 49,35 пг/мл при I стадии и 230,9 $\pm$ 15,09 пг/мл при IV стадии РЯ против 36,8 $\pm$ 10,7 пг/мл среди здоровых женщин-доноров крови [12, 13]. Сывороточный уровень IL-1 $\beta$  статистически повышен во всех группах больных РЯ пожилого возраста T<sub>2-3</sub> N<sub>0-1</sub> M<sub>0</sub> стадий при сравнении с группой здоровых лиц [14].

Аналогичная закономерность характерна и для содержания TNF- $\alpha$  в сыворотке крови [12, 13, 14]. Изучение содержания TNF- $\alpha$  выявило достоверное повышение его значений во всех исследуемых группах больных РЯ по сравнению с группой здоровых лиц [14]. Сывороточные уровни TNF- $\alpha$  статистически достоверно увеличены во всех группах больных при сравнении их между собой. Среди больных РЯ I стадии уровень TNF- $\alpha$  составляет 55,0 $\pm$ 9,53 пг/мл, а пациентов IV стадии – 93,8 $\pm$ 9,96 пг/мл [12]. Сравнительный анализ уровней TNF- $\alpha$  с группой здоровых лиц показал, что его содержание повышено во 2-й группе больных в 5,7 раз [14].

Уровень IFN- $\gamma$  также достоверно возрастает у больных РЯ уже на I стадии до 95,8 $\pm$ 9,49 пг/мл против 44,0 $\pm$ 7,67 пг/мл в контроле ( $p < 0,001$ ), а максимального значения достигает на III стадии – 120,9 $\pm$ 10,33 пг/мл [12]. Наблюдаемые изменения уровня IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  обнаруживают прямые корреляционные связи со стадией заболевания ( $r = +0,12$  и  $r = +0,70$  соответственно) [12].

Выявлено статистически значимое повышение в сыворотке крови IL-6 во всех группах больных РЯ пожилого возраста по сравнению с группой здоровых лиц [13, 14]. По данным С.В. Камышова [14], среди больных РЯ содержание IL-6 возрастает в 7,5 раз против контрольной группы. Медиана IL-6 в сыворотке крови, по результатам иммуноферментного анализа, значительно выше у больных РЯ (11,5 пг/мл, диапазон 3,4-62,6 пг/мл), чем в контрольной группе – 2,9 (1,1-12,3 пг/мл) ( $p < 0,001$ ) [15]. Показано, что увеличение содержания IL-6 непосредственно способствует росту новообразования при РЯ и его распространению посредством нескольких механизмов, включающих клеточную пролиферацию, ангиогенез и снижение чувствительности к проапоптотическим регуляторам [16, 17]. С повышенной экспрессией IL-6 у больных РЯ коррелирует экспрессия TNF- $\alpha$  [17]. Кроме того, считается, что повышение уровня IL-6, IL-8 в сыворотке крови ассоциируется со снижением общей выживаемости ( $p = 0,003$  и  $p = 0,035$ ) и безрецидивной выживаемости ( $p < 0,001$  и  $p = 0,026$ ) соответственно.

Таблица 1

Концентрация цитокинов в периферической крови у больных РЯ в пожилом возрасте и контрольной группе (M $\pm$ m)

Цитокины, пг/мл	Рак яичников	Контроль	Различие, $p$
IL - 1 $\alpha$	254,3 $\pm$ 7,2	28,7 $\pm$ 2,2	<0,001
IL-1 $\beta$	301,9 $\pm$ 8,4	14,3 $\pm$ 1,5	<0,001
IL-2	35,0 $\pm$ 5,2	49,7 $\pm$ 3,1	>0,05
IL-4	6,2 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,2	<0,001
IL-8	559,7 $\pm$ 4,9	42,5 $\pm$ 2,3	<0,001
IL - 10	7,2 $\pm$ 1,1	6,7 $\pm$ 0,9	>0,05
IL - 12	1,6 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,5	>0,05
TNF- $\alpha$	48,7 $\pm$ 2,9	6,2 $\pm$ 1,1	<0,001

Таблица 2

**Математическое ранжирование интерлейкинов крови по величине дезинтеграции у больных РЯ пожилого возраста и в контрольной группе**

Цитокины, пг/мл	Рак яичников	Ранговое место	Контроль	Ранговое место
IL-1α	26,2	3	29,4	1
IL-1β	42,6	1	19,4	4
IL-2	15,4	6	28,3	2
IL-4	17,5	5	4,6	7
IL-8	30,7	2	22,5	3
IL-10	8,3	7	5,7	6
IL-12	6,1	8	2,8	8
TNF-α	23,8	4	14,7	5
Сумма	170,6		127,4	-

Таблица 3

**Расстояние Махаланобиса при классификации первого и второго класса по уровню интерлейкинов в крови**

Код признака	Observed	G_1:0	G_2:1
1	G_1:0	2,228	42127,505
2	G_1:0	4,776	41084,361
3	G_1:0	1,346	41022,463
4	G_1:0	2,542	42181,780
5	G_1:0	2,784	42354,241
6	G_1:0	3,217	41261,653
7	G_1:0	0,008	42095,437
8	G_1:0	0,001	42273,058
9	G_2:1	0,018	1,874
10	G_2:1	41894,351	3,009
11	G_2:1	41625,436	8,115
12	G_2:1	40284,397	11,268
13	G_2:1	42357,690	3,584
14	G_2:1	42081,485	0,798
15	G_2:1	42115,278	1,351
16	G_2:1	42108,354	0,695

Существенность изменений при РЯ нами подтверждена и численным параметром дезинтеграции, сумма которого в вышеназванной клинической группе значительно превосходит таковую в контроле (табл. 2). Экстремум показателя дезинтеграции у больных РЯ соответствует IL-1β. Кроме того, в данной группе пациентов IL-8 имеет также высокий параметр дезинтеграции. Следует также указать на TNF-α со значительным показателем дезинтеграции и IL-1α. Минимально изменился в обеих группах IL-12, занявший последнюю ранговую позицию. В контроле первое место получил IL-1α и с незначительным различием IL-2. Значительные изменения

претерпевает и концентрация IL-8. Заслуживают внимания с дифференциально-диагностической точки зрения показатели дезинтеграции IL-1β и TNF-α, несмотря на то, что у пожилых женщин без РЯ они весьма ниже, чем при РЯ.

Для проведения дифференциальной диагностики больных РЯ пожилого возраста и женщин контрольной группы по ведущим интерлейкинам периферической крови разработаны дифференциальные модели. В обработку дискриминантным методом включены IL-1α, IL-1β, IL-8 и TNF-α, что позволило для первого класса биообъектов (больные РЯ) получить следующую модель:

$$y_{13} = -32,486x_{20} + 150,347x_{21} + 208,124x_{22} + 40,215x_{23} - 28752,497, \text{ где}$$

$y_{13}$  - больные РЯ,

$x_{20}$  - концентрация IL-1α на системном уровне,

$x_{21}$  - концентрация IL-1β на системном уровне,

$x_{22}$  - содержание в периферической крови IL-8,

$x_{23}$  - содержание в крови TNF-α.

Для пожилых женщин без РЯ (второй класс) по тем же показателям цитокинового профиля на системном уровне разработана дискриминантная модель:

$$y_{14} = 98,437x_{20} + 405,164x_{21} + 70,232x_{22} + 32,957x_{23} - 14372,751, \text{ где}$$

$y_{14}$  - пожилые женщины без РЯ,

$x_{20}$ - $x_{23}$  — показатели интерлейкинового статуса на системном уровне, соответствующие обозначениям для первого класса.

Результативность созданных моделей оценена по расстоянию Махаланобиса (табл. 3), которому качество классификации рассматриваемых биообъектов соответствует предъявляемым требованиям. Ошибочно классифицированных объектов первого класса, дифференцированных во второй класс, по данным математическим моделям удельный вес равен 6,8%. Удельный вес же пожилых женщин без РЯ, ошибочно включённых в первый класс, составил 6,2%. Как видно, дискриминантные модели отличаются высоким качеством и могут применяться в клинической практике при дифференциации больных РЯ и женщин без РЯ в пожилом возрасте.

Многомерный регрессионный анализ показал, что уровни IL-6 и IL-8 в сыворотке крови независимо прогнозируют выживаемость больных РЯ как общую, так и безрецидивную [15]. Поэтому сывороточные уровни IL-6 и IL-8 следует рассматривать как прогностические факторы при эпителиальном РЯ. Предоперационные же уровни IL-6 и IL-8 в сыворотке крови позволяют дифференцировать пациентов с эпителиальным РЯ от здоровых женщин [15]. Высокая прогностическая значимость IL-1α, IL-1β и TNF-α позволила с использованием дискриминантного метода проводить дифференциальную диагностику РЯ и условно здоровых женщин старше 65 лет без РЯ [18]. В этом контексте мониторинг IL-10 в крови больных РЯ позволяет прогнозировать исход операции и осуществить классификацию больных РЯ и здоровых женщин [19].

**Заключение.** Иммуноферментный анализ сывороточных интерлейкинов выявил увеличение большинства исследованных цитокинов по сравнению с контролем от 3,6 раза для IL-4 до 21,1 раза для IL-1β с ведущей диагностической значимостью для РЯ у пожилых IL-1α, IL-1β, IL-8 и TNF-α. Включение названных интерлейкинов в дискриминантный анализ позволило разработать диагностические модели, обеспечивающие с высокой

точностью (93,2-93,8%) дифференциацию больных РЯ пожилого возраста и контрольной группы.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5, 8, 10, 11, 15-17, 19 см. REFERENCES)

1. Ашрафян Л.А., Бабаева Н.А., Антонова И.Б. Ивашина С.В., Люстик А.В., Аleshikova О.И. и др. Ультразвуковые критерии ранней диагностики рака яичников. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2015; 1: 53-60.
2. Агарков Н.М., Макконен К.Ф., Аксёнов В.В., Ткаченко П.В., Иванов В.А., Иванов А.В., Субботина Т.И. Дифференциальная диагностика хронического сальпингоофорита и рака яичников на основе иммунологического и дискриминантного методов. *Клиническая лабораторная диагностика* 2017; 62(10): 611-5.
3. Жордания К.И., Калиничева Е.В., Моисеев А.А. Рак яичников: эпидемиология, морфология и гистогенез. *Онкогинекология*. 2017; 3: 26-32.
4. Солопова А.Г., Бицадзе В.О., Солопова А.Е., Макацария А.Д., Розанов И.А. Рак яичника: современные подходы к классификации, диагностике, стадированию и дифференцированной тактике ведения больных. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2017; 2: 55-66.
6. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., ред. Злокачественные новообразования в России в 2015 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена; 2017.
7. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена; 2015.
9. Сулейменова А.Т., Камарли З.П., Манамбаева З.А. Иммунные нарушения и потенциальные механизмы их коррекции для повышения эффективности лечения рака яичников. *Вестник Киргизско-российского славянского университета*. 2016; 16(7): 111-5.
12. Генинг Т.П., Антонеева И.И. Роль цитокинов (TNF $\alpha$ , IF $\gamma$  и IL1 $\beta$ ) в развитии локальных полимодальных эффектов при прогрессировании рака яичников. *Креативная хирургия и онкология*. 2009; 1: 20-3.
13. Антонеева И.И., Абакумова Т.В., Пирмамедова С.С., Насырова Е.Ю., Генинг С.О., Мясникова Д.Ф. Цитокиновый статус сыворотки крови при распространенном раке яичников и на фоне полихимиотерапии. *Фундаментальные исследования*. 2014; 4: 233-6.
14. Камышов С.В. Изучение влияния сопроводительной иммунотерапии на дисбаланс цитокинов у больных раком яичников. *Евразийский Союз Ученых (ЕСУ)*. 2018; 2(47): 22-6.
18. Агарков Н.М., Борисова М.А. Математические подходы к дифференциальной диагностике рака яичников. *Известия Юго-Западного государственного университета*. 2012; 2: 267-71.

## REFERENCES

1. Ashrafyan L.A., Babaeva N.A., Antonova I.B. Ivashina S.V., Lyustik A.V., Aleshikova O.I. et al. Ultrasound criteria for early diagnosis of ovarian cancer. *Opuholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy*. 2015; 1: 53-60. (in Russian)
2. Agarkov N.M., Makkonen K.F., Aksyonov V.V., Tkachenko P.V., Ivanov V.A., Ivanov A.V., Subbotina T.I. Differential diagnosis of chronic oophoritis and ovarian cancer based on immunological and

- discriminant methods. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2017; 62(10): 611-5. (in Russian)
3. Zhordaniya K.I., Kalinicheva E.V., Moiseev A.A. Ovarian cancer: epidemiology, morphology and histogenesis. *Onkoginekologiya*. 2017; 3: 26-32. (in Russian)
4. Solopova A.G., Bicadze V.O., Solopova A.E., Makacariya A.D., Rozanov I.A. Ovarian Cancer: modern approaches to classification, diagnosis, staging and differentiated management of patients. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2017; 2: 55-66. (in Russian)
5. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer. J Clin*. 2015; 65: 87-108.
6. Kaprin A.D., Starinskij V.V., Petrova G.V., eds. Malignant neoplasms in Russia in 2015. Moscow: MNIОI im. P.A. Gertsena; 2017. (in Russian)
7. Kaprin A.D., Starinskij V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2013 (morbidity and mortality). Moscow: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy institute imeni P.A. Gerzena; 2015. (in Russian)
8. Yu W., Qu H., Cao G., et al. Mthsp70-CLIC1-pulsed dendritic cells enhance the immune response against ovarian cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2017; 494(1-2): 13-9.
9. Suleymenova A.T., Kamarli Z.P., Manambaeva Z.A. Immune disorders and potential mechanisms of their correction to improve the treatment of ovarian cancer. *Vestnik Kirgizsko-rossijskogo slavyanskogo universiteta*. 2016; 16(7): 111-5. (in Russian)
10. You Y., Li Y., Li M., Lei M., Wu M., Qu Y. et al. Ovarian cancer stem cells promote tumour immune privilege and invasion via CCL5 and regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol*. 2018; 191(1): 60-73.
11. Prat Jaime and FIGO Committee on Gynecologic Oncology FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. *J.Gynecol. Oncol*. 2015; 26(2):87-9. (in Russian)
12. Gening T.P., Antoneeva I.I. the Role of cytokines (TNF, ZAT and IL1 $\beta$ ) in the development of polymodal local effects in the progression of ovarian cancer. *Kreativnaya khirurgiya i onkologiya*. 2009; 1: 20-3. (in Russian)
13. Antoneeva I.I., Abakumova T.V., Pirmamedova S.S., Nasyrova E.YU., Gening S.O., Myasnikova D.F. Cytokine status of blood serum in advanced ovarian cancer and on the background of polychemotherapy. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 4: 233-6. (in Russian)
14. Kamyshev S.V. Study of the effect of accompanying immunotherapy on cytokine imbalance in patients with ovarian cancer. *Evrzjskiy soyuz uchenykh (ESU)*. 2018; 2(47): 22-6. (in Russian)
15. Dobrzycka B., Mackowiak-Matejczyk B., Terlikowska K.M., Kulesza-Bronczyk B., Kinalski M, Terlikowski S.J. Serum levels of IL-6, IL-8 and CRP as prognostic factors in epithelial ovarian cancer. *Eur. Cytokine Netw*. 2013 ; 24(3): 106-13.
16. Scotton C.J., Wilson J.L, Scott K., Stamp G., Wilbanks G.D., Fricker S et al. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res*. 2002; 62: 5930-8.
17. Righi E., Kashiwagi S., Yuan J., Santosuosso M., Leblanc P., Ingraham R. et al. CXCL12/ CXCR4 Blockade induces multimodal antitumor effects that prolong survival in an immunocompetent mouse model of ovarian cancer. *Cancer Res*. 2011; 71:5522.
18. Agarkov N.M., Borisova M.A. Mathematical approaches to differential diagnosis of ovarian cancer. *Izvestiya Yugo-Zapadnogo gosudarstvennogo universiteta*. 2012; 2: 267-71. (in Russian)
19. Mustea A., Braicu EI., Koensgen D., Yuan S., Sun P.M., Stamatian F. et al. Monitoring of IL-10 in the serum of patients with advanced ovarian cancer: results from a prospective pilot-study. *Cytokine*. 2009; 45(1): 8-11.

Поступила 27.06.18

Принята к печати 25.11.18

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:579.834.1141-036.1-078

Мурзабаева Р.Т., Шарифуллина Л.Д., Мавзютов А.Р., Гильманов А.Ж., Валишин Д.А., Мавзютова Г.А.

### ИКСОДОВЫЙ КЛЕЩЕВОЙ БОРРЕЛИОЗ: КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 450008, Уфа, Россия

*Для дифференцировки клинических форм иксодовых клещевых боррелиозов проведена клинико-лабораторная оценка особенностей наиболее часто определяемых показателей гемостаза. Иксодовый клещевой боррелиоз на территории Республики Башкортостан характеризовался преимущественно эритемным вариантом болезни со среднетяжелым течением. При этом отмечалось некоторое увеличение количества тромбоцитов, что могло быть вызвано раздражением мегакариоцитарного ростка костного мозга в условиях инфекционного процесса и носить компенсаторный характер, тогда как другие показатели гемостаза при данной клинической форме практически не изменялись. Немногочисленные случаи безэритемных форм иксодовых клещевых боррелиозов клинически протекали более тяжело, с существенно более выраженным интоксикационно-воспалительным синдромом. Это одновременно сопровождалось большими сдвигами сыровоточных биохимических параметров, показателей гемостаза и клеточного состава периферической крови. Выявленные в результате проведенных исследований клинико-лабораторные особенности эритемной и безэритемной форм иксодовых клещевых боррелиозов отражают характер течения болезни и могут служить для оценки степени тяжести, прогноза боррелиозной инфекции и обоснования лечебных мероприятий при этом заболевании.*

**Ключевые слова:** *Borrelia burgdorferi sensu lato*; клинические формы; эпидемиология; гемостаз.

**Для цитирования:** Мурзабаева Р.Т., Шарифуллина Л.Д., Мавзютов А.Р., Гильманов А.Ж., Валишин Д.А., Мавзютова Г.А. Иксодовый клещевой боррелиоз: клинико-лабораторные особенности. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (11): 711-716.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-711-716>

Murzabayeva R.T., Sharifullina L.D., Mavzyutov A.R., Gilmanov A.Zh., Valishin D.A., Mavzyutova G.A.

#### IXODIC TICK-BORNE BORRELIOSIS: CLINICAL AND LABORATORY FEATURES

Bashkir State Medical University, 450008, Ufa, Russia

*For a differentiation of clinical forms of ixodic tick-borne borreliosis clinical laboratory assessment of features of the most often defined hemostasis and complete blood count (CBC) indicators is carried out.*

*Ixodic tick-borne borreliosis in the territory of the Republic of Bashkortostan is characterized by mainly erythematous forms of a disease with a medium-weight current. At the same time some increase in quantity of platelets was noted that could be caused by irritation of a megakaryocytic sprout of bone marrow in the conditions of infectious process and have compensatory character whereas other indicators of CBC and hemostasis at this clinical form practically didn't change. Not numerous cases of the ixodic tick-borne borreliosis non-erythematous forms clinically proceeded more hard, with significantly more expressed toxic-inflammatory syndrome. At the same time it was followed by significant shifts in biochemical parameters, indicators of CBC and hemostasis. The clinical laboratory features of erythematous and non-erythematous forms of ixodic tick-borne borreliosis revealed as a result of the conducted researches reflect character of a course of disease and can serve for assessment of severity, the forecast of the infection and justification of this treatment.*

**Key words:** *Borrelia burgdorferi sensu lato*; clinical forms; epidemiology; hemostasis.

**For citation:** Murzabayeva R.T., Sharifullina L.D., Gilmanov A.Zh., Mavzyutov A.R., Valishin D.A., Mavzyutova G.A. Ixodic tick-borne borreliosis: clinical and laboratory features. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (11): 711-716 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-711-716>

**For correspondence:** Mavzyutov A.R., professor, chief of Department of Fundamental and Applied Microbiology; e-mail: [ufalab@mail.ru](mailto:ufalab@mail.ru)

#### Information about authors:

Murzabayeva R.T. - [orcid.org/0000-0002-9132-4697](http://orcid.org/0000-0002-9132-4697)

Sharifullina L.D. – [orcid.org/0000-0003-1426-4261](http://orcid.org/0000-0003-1426-4261)

Mavzyutov A.R. - [orcid.org/0000-0001-5943-1882](http://orcid.org/0000-0001-5943-1882)

Gilmanov A.Zh. – [orcid.org/0000-0003-0996-6189](http://orcid.org/0000-0003-0996-6189)

Valishin D.A. - [orcid.org/0000-0002-1811-9320](http://orcid.org/0000-0002-1811-9320)

Mavzyutova G.A. - [orcid.org/0000-0003-2098-1435](http://orcid.org/0000-0003-2098-1435)

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

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

Received 31.10.2018  
Accepted 25.11.2018

**Введение.** Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) объединяют большую группу этиологически и патогенетически близких природно-очаговых трансмиссивных заболеваний, которые регистрируются повсеместно. В России показатели заболеваемости боррелиозами за последние 5 лет в 2,5-3 раза превышали аналогичные показатели зарегистрированных случаев риккетсиозов и составляли 3,99 на 100 тыс. населения (5712 случаев). Среди диагностированных случаев ИКБ до 25,7% приходилось на Центральный ФО; на Сибирский - 24,8%; Уральский - 15,9%; Приволжский - 14,1%; Северо-Западный - 13,7%; Дальневосточный - 3,8%; Южный - 1,4% и Северо-Кавказский - 0,6% [1].

Однако специфическая этиологическая диагностика инфекций, вызываемых *Borrelia spp.*, до настоящего времени является серьезной проблемой. Поскольку возбудителями клещевых боррелиозов является свыше 30 видов этих факультативно-внутриклеточно паразитирующих бактерий, предполагается практическое применение как минимум такого же количества видоспецифичных диагностических систем, разработка которых существенно осложнилась ввиду изменений действовавшей до недавнего времени классификации *Borrelia spp.* В частности, на основании молекулярных исследований у представителей семейства *Borreliaceae* порядка *Spirochetales* [2] выделяют уже не один, а два рода: *Borrelia* и *Borrelia*. При этом к роду *Borrelia* отнесены возбудители возвратного тифа, а к *Borrelia* spp. - многочисленные виды возбудителей болезни Лайма из группы *Borrelia burgdorferi sensu lato complex* [3].

Исходя из этого, существенно возрастает диагностическое значение клинико-лабораторных данных, позволяющих выявлять патогенетические особенности рассматриваемой группы заболеваний, что необходимо для их своевременной и эффективной терапевтической коррекции.

Особенности патогенеза ИКБ, безусловно, связаны с вирулентностью этиологически значимых микроорганизмов. Известно, что *Borrelia spp.*, являясь грамотрицательными, отличаются от большинства представителей этой группы отсутствием в составе их клеточной стенки липополисахаридов и значительным содержанием липопротеинов (до 8%), являющихся адгезинами и/или рецепторами для эндотелиальных клеток [4]. Патогенетически значимые компоненты клеточных стенок этих бактерий в основном представлены поверхностно расположенными белками, например, DbpA и DbpB, взаимодействующими с белковым компонентом протеогликана и, соответственно, повышающими эффективность колонизации боррелиями эпителиальных поверхностей [5]. Фибронектинсвязывающий белок BVK32 *B. burgdorferi* обеспечивает их взаимодействие с гликозаминогликанами, в частности, с гепарином, гепарансульфатом, дерматансульфатом, хондроитин-6-сульфатом и другими, широко представленными в культурах клеток млекопитающих [6]. Среди известных у *Borrelia spp.* адгезинов большее значение имеет белок Р66, выступающий как порин и как медиатор взаимодействия *B. burgdorferi* с бета<sub>3</sub>-цепочечными интегринами, находящимися в мембранах иммунокомпетентных клеток, тромбоцитов и клеток эндотелия, с которым связывают тканевую диссеминацию возбудителя [7, 8]. Указанное определяет тот факт, что одним из наиболее патогенетически весомых звеньев иксодовых клещевых боррелиозов является повреждение эндотелия сосудов с последующим вовлече-

нием в патогенез системы тромбоцитарного и плазменного гемостаза [4].

Цель исследования - клинико-лабораторная оценка наиболее часто определяемых в клинике параметров гемостаза и гематологических показателей при различных клинических формах иксодовых клещевых боррелиозов.

**Материал и методы.** С 2014 по 2017 г. обследовано 74 пациента с диагнозом ИКБ в возрасте от 16 до 75 лет (в среднем 47,8±17,5 лет). Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц, сопоставимых по возрасту и полу.

Кровь для лабораторных исследований у пациентов забирали до назначения антибактериальной терапии в вакуумные пробирки с цитратом натрия (для исследования гемостаза), с активатором свертывания (для получения сыворотки) и с ЭДТА (для подсчета гематологических показателей). Этиологическую диагностику осуществляли выявлением специфических IgM и IgG к *B. burgdorferi sensu lato* в сыворотке крови твердофазным иммуноферментным методом (ИФА) с использованием тест-систем фирмы Вектор-Бест (Россия) с расчетом коэффициента позитивности и интерпретацией результатов иммунологического исследования согласно инструкции производителя.

В соответствии с действующими протоколами, в перечень проводимых исследований входили: подсчет клеток крови на гематологическом анализаторе Medonic SA-530 фирмы Boule Medical A.B. (Швеция), определение биохимических показателей в сыворотке крови (мочевина, креатинин, билирубин, АЛТ, АСТ) на анализаторе Sapphire 400 фирмы Hirose Electronic System (Япония) с применением тест-наборов реактивов фирмы Вектор-Бест (Россия), ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной полости (ОБП), электрокардиография (ЭКГ). Параметры плазменного гемостаза определялись на анализаторе АСК-02 Астра с применением тест-наборов реактивов фирмы Технология-Стандарт (Россия); уровень D-димера - методом микролатексной агглютинации с использованием тест-систем фирмы Ренам (Россия). При выполнении лабораторных исследований выполнялись требования преаналитического этапа по ГОСТ 53079.4-2008 и регулярно проводились процедуры внутрिलाбораторного контроля качества.

Статистическая обработка полученных данных проводилась параметрическими методами с помощью программного пакета Statistica 6.0 [9].

Антибактериальную терапию (доксциклин, цефтриаксон) проводили в соответствии со стандартами оказания медицинской помощи. Основанием для начала лечения до завершения клинико-лабораторного обследования пациентов служили наличие лихорадки и установленные факты присасывания клеща.

**Результаты и обсуждение.** В ходе сбора данных эпидемиологического анамнеза у обследуемых было выявлено, что в 94,8% случаев укусы клещей имели место в летние месяцы. Присасывание клещей у обследованных имело место в 96,5% всех случаев их обнаружения. В 68,1% укусы происходили в населенных пунктах по месту жительства заболевших, 23,2% случаев были связаны с выездом за пределы населенных пунктов во вне рабочее время, 7,7% случаев явились результатом профессиональной деятельности инфицированных. Указанное позволяет рассматривать такие очаги в качестве антропогенных.

В ходе первичного осмотра клинически превалировал среднетяжелый вариант течения боррелиоза (74 случая - 63,8% пациентов), из них в 56 случаях (75,7%) имела место эритемная форма, а в 18 (24,3%) – безэритемная. Следует отметить, что частота регистрации эритемных форм боррелиозной инфекции в различных регионах России варьирует от 31,2% до 92,2% случаев [10-12]. В нашем случае у 42 (36,2%) заболевших диагностировали эритемную форму инфекции с клинически легким вариантом её течения, которую ввиду незначительной клинической значимости для сравнительной оценки клинико-лабораторных данных не использовали.

При осмотре у больных с эритемной формой ИКБ элементы эритемы преимущественно обнаруживались на волосистой части головы, спине, шее, груди, реже на голенях и в области голеностопных суставов. Размеры очагов эритемы варьировали от 5 до 60 см, в 69% случаев не превышая 10 см. У одного из пациентов на коже была отмечена множественная кольцевидная эритема. Элементы сыпи сохранялись 3-18 дней, чаще 9-10 дней (94% случаев). У двух пациенток при случайном попадании элементов клещей на конъюнктиву через 2 недели констатировали офтальмоборрелиоз. У пациентов с безэритемной формой ИКБ по сравнению с эритемной статистически значимо чаще развивался интоксикационно-воспалительный синдром, сопровождавшийся лихорадкой, головной болью, ломотой в теле, а также органическими поражениями (табл. 1).

Среди сопутствующих ИКБ клинических симптомов катаральные явления отмечались более чем у половины пациентов с безэритемной формой (55,6%) и лишь у единичных больных с эритемной формой основного заболевания (7,2%). Они проявлялись в виде гиперемии слизистой оболочки ротоглотки, ринита, першения в горле, сухого кашля (но без патологии лёгких). При безэритемном варианте болезни в 1,5 раза чаще, чем при эритемной форме, с первых дней болезни отмечались

жалобы на кратковременные боли в коленных и голеностопных суставах, схожие по интенсивности с болями при реактивном артрите.

Нарушения деятельности сердечно-сосудистой системы при ИКБ, по данным электрокардиографии, наиболее часто регистрировались у пациентов с безэритемной формой болезни (табл. 1) и характеризовались нарушениями реполяризации миокарда, синусовой тахикардией и замедлением внутрисердечной проводимости у 2 больных (11,2%). В период реконвалесценции на протяжении 3 мес после перенесенного ИКБ отмечались изменения на ЭКГ в виде метаболических нарушений только у одного пациента (1,3%), через 6 мес - проявления астеноневротического синдрома у 2 (2,7%) пациентов с безэритемной формой заболевания. В ходе диспансерного наблюдения больных в течение 12 мес рецидивы и хронизация процесса не регистрировались.

Поражение нервной системы клинически имело место только у одной пациентки (5,6%) с безэритемной формой боррелиозной инфекции на 10-й день болезни, и протекало в виде серозного менингита.

Регионарный лимфаденит в качестве основного проявления ИКБ с большей частотой выявлялся у больных с эритемой, в то время как субфебрильные и фебрильные (выше 38°C) лихорадочные состояния и интоксикационно-воспалительный синдром в целом наблюдались в течение более продолжительного времени у пациентов с безэритемной формой болезни (табл. 2). У этих же больных инкубационный период заболевания был существенно дольше.

По данным исследования биохимических показателей крови у 4 пациентов (22,2%) с безэритемным вариантом болезни было отмечено существенное повышение активности аминотрансфераз - в 1,5-3 раза относительно группы контроля (средние значения АЛТ - 89,6±12,53 Ед/л, АСТ - 117,5±6,79 Ед/л). При эритемной форме ИКБ явные лабораторные признаки цитолиза наблюдались лишь в 2 случаях (3,6%). УЗИ органов брюшной полости, подтвердило гепатомегалию только у 4 из 74 пациентов (5,4%) со среднетяжелым течением заболевания.

При оценке состояния тромбоцитарного звена гемостаза среднее количество тромбоцитов в периферической крови (табл. 3) в период разгара болезни при безэритемной форме ИКБ оказалось статистически значимо ниже, чем у пациентов с эритемной формой и у здоровых лиц из контрольной группы ( $p < 0,01$ ). Среди показателей плазменного звена гемостаза можно отметить ста-

Таблица 1

**Частота клинических проявлений иксодового клещевого боррелиоза при среднетяжелом течении болезни**

Клинические симптомы и синдромы	Количество больных / % от общего числа		
	Эритемная форма, n=56	Безэритемная форма, n=18	Достоверность различий, p
Повышение температуры тела	38 (67,8)	18 (100)	<0,0001
Слабость	47 (83,9)	18 (100)	<0,0001
Ломота в теле	32(57,1)	18 (100)	<0,0001
Головная боль	7 (33,3)	13 (72)	<0,0001
Озноб	33 (58,9)	14(77,8)	<0,0001
Головокружение	-	7 (38,9)	-
Катаральный синдром	4 (7,2)	10 (55,6)	<0,0001
Поражение ЦНС	-	1 (5,6)	-
Изменения на ЭКГ	1 (1,8)	3 (16,7)	<0,0001
Артромиялгический синдром	17 (30,3)	9 (50)	<0,01
Регионарный лимфаденит	21 (37,5)	5 (27,7)	>0,05

Таблица 2

**Продолжительность симптомов болезни у пациентов с эритемной и безэритемной формой иксодового клещевого боррелиоза**

Параметры / симптомы заболевания	Продолжительность симптомов, дни		Достоверность различий, p
	Эритемная форма, n=56	Безэритемная форма, n=18	
Инкубационный период	7,47 ± 0,79	12,61 ± 2,03	<0,05
Интоксикационно-воспалительный синдром	5,93 ± 0,22	8,39 ± 1,11	<0,01
Лихорадка выше 38°C	3,68 ± 0,25	8,10 ± 1,18	<0,05
Субфебрилитет	5,52 ± 0,41	7,25 ± 0,67	<0,05

Таблица 3

**Некоторые показатели гемостаза ( $M \pm m$ ) в остром периоде болезни при эритемной и безэритемной форме иксодового клещевого боррелиоза среднетяжелого течения**

Показатели (референсные интервалы)	Эритемная форма, n=56	Безэритемная форма, n=18	Здоровые, n=30
Тромбоциты, $\times 10^9$ (150 - 370)	211,2 $\pm$ 7,89 **	** 170,2 $\pm$ 8,5	199,1 $\pm$ 5,9
Фибриноген, г/л (2 - 4)	3,42 $\pm$ 0,34	3,38 $\pm$ 0,15	2,70 $\pm$ 0,46
АЧТВ, сек (22,5 - 35,5)	* 28,8 $\pm$ 1,34 *	** 33,7 $\pm$ 1,54 *	24,9 $\pm$ 0,92
ТВ, сек (14 - 21)	14,6 $\pm$ 0,84	** 24,9 $\pm$ 1,91 **	14,2 $\pm$ 0,97
ПВ, сек (11 - 15)	14,2 $\pm$ 0,51	14,3 $\pm$ 0,65	14,9 $\pm$ 0,72
D-димер при поступлении	513,3 $\pm$ 9,3	** 559,4 $\pm$ 14,4 **	495,9 $\pm$ 10,9
D-димер при выписке	487,6 $\pm$ 11,3	473,4 $\pm$ 15,3	

Примечание. Отмечена достоверность различий с группой контроля \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; между эритемной и безэритемной формами ИКБ  $p < 0,05$ \* и  $p < 0,01$ \*\*.

Таблица 4

**Показатели периферической крови ( $M \pm m$ ) в период разгара заболевания при эритемной и безэритемной формах иксодового клещевого боррелиоза средней тяжести**

Показатели	Эритемная форма ИКБ, n=56	Безэритемная форма ИКБ, n=18	Здоровые лица, n=30
Эритроциты, $\times 10^{12}$ (4,3-4,8)	4,32 $\pm$ 0,07	4,45 $\pm$ 0,10	4,5 $\pm$ 0,04
Гемоглобин, г/л (130-150)	135,4 $\pm$ 1,96	134,0 $\pm$ 2,21	132 $\pm$ 1,91
Лейкоциты, $\times 10^9$ (5,5-8,5)	** 6,9 $\pm$ 0,03 *	** 8,0 $\pm$ 0,07	5,5 $\pm$ 0,15
Лимфоциты, % (17-30)	26,1 $\pm$ 1,49	30,9 $\pm$ 0,63	28,2 $\pm$ 0,75
Гранулоциты, % (50-70)	63,6 $\pm$ 1,7	62,0 $\pm$ 3,13	60,3 $\pm$ 1,13
Моноциты, % (5-8)	** 10,3 $\pm$ 0,82 *	** 8,3 $\pm$ 0,47	5,1 $\pm$ 0,36

Примечание. Отмечена достоверность различий с группой контроля - \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; между эритемной и безэритемной формами ИКБ  $p < 0,05$ \* и  $p < 0,01$ \*\*.

статистически значимое удлинение АЧТВ в остром периоде эритемной и особенно безэритемной форм ИКБ по сравнению со здоровыми лицами ( $p < 0,01$ ). Аналогичная тенденция проявлялась в отношении показателей тромбинового времени: у больных с безэритемной формой заболевания оно значительно превышало ТВ при эритемной форме болезни и в группе контроля ( $p < 0,01$ ). Отмеченные сдвиги развивались на фоне явной тенденции к увеличению содержания фибриногена в плазме крови, вероятно, имеющей острофазный характер.

Кроме отмеченных сдвигов, наблюдалась некоторая тенденция к возрастанию уровня D-димера в крови у пациентов с безэритемной формой боррелиозной инфекции в период разгара заболевания в сравнении с

группой контроля и больными с эритемной формой ИКБ ( $p < 0,01$ ).

При исследовании клеточных показателей периферической крови в период разгара заболевания у пациентов с эритемной и безэритемной формами боррелиозной инфекции (табл. 4) определялись более высокие показатели лейкоцитов, чем у лиц из группы контроля ( $p < 0,01$ ). При безэритемной форме ИКБ среднее количество лейкоцитов было значимо выше, чем при эритемной форме ( $p < 0,05$ ), что может свидетельствовать о большей активности системного воспалительного процесса в организме пациентов данной группы.

Повышение относительного и абсолютного количества моноцитов (средней субпопуляции клеток при 3-diff анализе) в крови пациентов с эритемной формой ИКБ, по-видимому, может быть связано с более значительной выраженностью местной воспалительной реакции в коже и в подкожных образованиях при наличии эритемы. Подобные тенденции в гемограмме у больных ИКБ отмечались и другими исследователями [13-15].

Через 3 и 6 мес диспансерного наблюдения у реконвалесцентов иксодового клещевого боррелиоза, независимо от его клинической формы (эритемная, безэритемная), значимых отличий показателей гемостаза (АЧТВ, ТВ, D-димер) и периферической крови (эритроциты, гемоглобин, гранулоциты, моноциты, тромбоциты) от группы контроля не наблюдалось.

Таким образом, в нашем исследовании у пациентов превалировал эритемный вариант болезни Лайма со среднетяжелым течением заболевания. Вместе с тем, статистически значимые различия частоты, продолжительности и выраженности основных клинических симптомов свидетельствуют о более тяжелом течении безэритемной формы заболевания, для которой характерными были: длительный инкубационный период, высокая продолжительная лихорадка и другие проявления интоксикационно-воспалительного синдрома, органичные поражения в виде катарального (7,2% и 55,6% случаев) и артралгического (30,3% и 50%) синдрома, цитолитический синдром (3,6% и 22,2%), отражающий развитие безжелтушного гепатита, нарушения сердечного ритма и процессов реполяризации в миокарде (1,8% и 16,7%), редкого вовлечения в патологический процесс нервной системы (0 и 5,6%, соответственно), значимый лейкоцитоз.

Приведенные особенности клиники безэритемной формы ИКБ можно объяснить особенностями проникновения боррелий из места присасывания клеща в кровеносное русло. В отличие от других бактерий, боррелии не синтезируют ферменты (коллагеназа, эластаза, гиалуронидаза), способствующие преодолению тканевых защитных барьеров. Для этих целей боррелии при помощи белка OspA связываются с плазмином / плазмином и активируют металлопротеиназы хозяина, что приводит к иницированию воспалительных реакций в сосудах [16-18]. Кроме того, боррелии могут связываться с компонентами экстрацеллюлярного матрикса – фибронектином и некоторыми интегринами [18,19], а также с протеогликаном декорином посредством декорин-связывающих белков (Dbp A и Dbp B), обеспечивая диссеминацию и выживание в тканях, богатых декорином (кожа, ткани опорно-двигательной (суставы) и сердечно-сосудистой системы) [16,19-21], что способствует большей выраженности интоксикационно-воспалительного синдрома и более частым органным

поражениям. Последнее, однако, не имеет клинической специфики и может встречаться и при другой патологии, в частности, ассоциированной с липополисахаридами грамотрицательных бактерий [22].

Наряду с выраженной клинической симптоматикой, у пациентов с безэритемной формой ИКБ в нашем исследовании отмечались большие сдвиги сыровоточных биохимических параметров, показателей гемостаза и клеточного состава периферической крови.

Молекулярные механизмы изменений показателей гемостаза у больных ИКБ могут быть связаны с наличием у *Borrelia spp.* значительных количеств мембранных липопротеидов, способных инициировать адгезию микроорганизмов к эндотелиальным клеткам [4]. Адгезия *Borrelia spp.* может сопровождаться частичной нейтрализацией нормального отрицательного заряда неповрежденного эндотелия [23], в результате чего появляется возможность вторичной адгезии тромбоцитов и других клеток крови к эндотелию, их последующей активации и агрегации на внутренней поверхности сосудистой стенки. Указанное в известной степени объясняет снижение количества тромбоцитов в крови обследованных при безэритемной форме болезни Лайма. Сходный механизм может играть определенную роль в развитии иных, связанных с микроорганизмами, нарушений системы гемостаза [24], например, при развитии ЛПС-обусловленной гиперкоагуляции вплоть до ДВС крови [25]. В то же время, некоторое увеличение количества тромбоцитов при эритемной форме ИКБ могло быть вызвано раздражением мегакариоцитарного ростка костного мозга в условиях инфекционного процесса и иметь компенсаторный характер, что подтверждается менее значительными изменениями других показателей гемостаза при данной клинической форме заболевания.

При развитии васкулита вследствие повреждения эндотелия сосудов боррелиями, иммунными комплексами, провоспалительными цитокинами и тромбином, кроме гиперагрегации тромбоцитов, в кровь высвобождаются тромбопластические субстанции, которые запускают каскад патологического микросвертывания. Активируются фибринообразование и, одновременно, фибринолиз [26]; в результате которого происходит накопление продуктов деградации фибрина и фибриногена, в том числе D-димера [27]. Активация коагуляционного звена гемостаза и процессов фибринолиза при ИКБ подтверждается обнаруженными сдвигами АЧТВ, ТВ и уровня D-димера в крови, более выраженными при безэритемной форме заболевания. Вместе с тем, следует отметить парадоксальное удлинение тромбинового времени на фоне, вероятно, острофазового возрастания концентрации фибриногена у пациентов с безэритемной формой ИКБ. Этот феномен может быть связан с изменением свойств молекул фибриногена либо, скорее, с появлением в крови ингибиторов фибриногенеза, в роли которых могут выступать ПДФ или даже компоненты самих боррелий. Отсутствие существенных сдвигов ПВ и разнонаправленные изменения АЧТВ при различных формах заболевания позволяют также судить о вовлечении в патологический процесс как тромбоцитов, так и компонентов «внутреннего» пути активации протромбиназы в условиях действия инфекционных факторов, что требует дополнительных исследований.

Можно полагать, что степень тяжести инфекционно-воспалительной реакции при внедрении боррелий в орга-

низм во многом определяется количеством агента и скоростью его попадания в общий кровоток (что зависит от состояния местных защитных барьеров), а также реактивностью организма. При более массивной и быстрой инвазии микробов местная эритемная реакция может быть не столь выраженной, но развивается системный воспалительный процесс с неизбежным повреждением эндотелия – как первичным (связанным с боррелиями), так и, в основном, вторичным, вызванным действием воспалительных агентов - цитокинов, реактантов острой фазы и др. Последующие сдвиги параметров тромбоцитарного и плазменного гемостаза зависят от степени повреждения эндотелия и выраженности системной воспалительной реакции, и поэтому могут отражать тяжесть инфекционного процесса. Определение упомянутых скрининговых и уточняющих параметров плазменного гемостаза, а также активности тромбоцитов (адгезии, индуцированной агрегации) и маркеров повреждения эндотелия (активности фактора Виллебранда, тканевого активатора плазминогена tPA и его ингибитора PAI-1) может применяться для оценки нарушений в свертывающей системе крови [26] на фоне инфекционного процесса, ассоциированного с боррелиями.

**Заключение.** Иксодовый клещевой боррелиоз на территории Республики Башкортостан характеризуется преимущественно эритемным вариантом болезни с клинически среднетяжелым течением. У пациентов отмечался умеренный лейкоцитоз с выраженным моноцитозом, а также некоторое возрастание количества тромбоцитов, что могло быть вызвано раздражением мегакариоцитарного ростка костного мозга в условиях инфекционного процесса и носить компенсаторный характер, в то время как другие показатели гемостаза и клеточного состава крови при данной клинической форме практически не изменялись. Менее многочисленные случаи безэритемных форм ИКБ клинически протекали тяжелее, с существенно более выраженным интоксикационно-воспалительным синдромом, и сопровождалась более выраженными сдвигами сыровоточных биохимических параметров, клеточного состава периферической крови (лейкоцитоз, моноцитоз) и показателей гемостаза (тенденция к гиперкоагуляции и тромбоцитопении). Выявленные клинико-лабораторные особенности эритемной и безэритемной форм ИКБ отражают характер течения болезни и могут служить для оценки степени тяжести, прогноза боррелиозной инфекции и обоснования лечебных мероприятий при этом заболевании.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (pp. 2-8, 16-19, 21, 27 с. REFERENCES)

1. Рудаков Н.В., Ястребов В.К., Рудакова С.А. Трансмиссивные клещевые инфекции в Российской Федерации. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2015; 27: 6-9.
9. Реброва О.Ю. *Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA*. М.: МедиаСфера; 2002.
10. Емельянова А.Н., Кижло Л.Б. Клинико-эпидемиологические особенности иксодового клещевого боррелиоза в Забайкальском Крае. *Сибирский медицинский журнал*. 2012; 5: 103-5.
11. Мандракова Н.В., Мадич Е.А. Некоторые аспекты иммунопатогенеза острых иксодовых клещевых боррелиозов в Приморском

- крае. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2007; 11: 91-8.
12. Симакова А.И. Иксодовый клещевой боррелиоз в Приморском крае. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2005; 1: 68-71.
13. Авдеева М.Г., Мошкова Д.Ю., Блажная Л.П., Городин В.Н., Зотов С.В., Ванюков А.А. и др. Клинико-эпидемиологическая характеристика клещевого боррелиоза в Краснодарском крае. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 1: 4-11.
14. Воробьева Н.Н., Сумливая О.Н., Окишев М.А. Клинико-патогенетические особенности и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов. *Пермский медицинский журнал*. 2016; 4: 6-11.
15. Конькова-Рейдман А.Б., Злобин В.И., Тарасов В.Н., Тарасов В.Д., Ратникова Л.И., Рольшиков О.Б. и др. Этиопатогенетические и клинические особенности иксодовых клещевых боррелиозов в природных очагах Южного Урала. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 5 (54): 24-34.
20. Сарксян Д.С. Иксодовые клещевые боррелиозы. Современное состояние проблемы. *Инфекционные болезни*. 2015; 2 (13): 61-7.
22. Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Мавзютов А.Р., Хайруллина Р.М., Акбашева А.О., Кузовкина О.З. Состояние антиэндотоксина защиты при внебольничной пневмонии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2010; 4: 65-71.
23. Козлов А.А., Мелкумян А.Л., Простакова Т.М. *Лабораторная диагностика системы гемостаза*. М.: Принт; 2014.
24. Саялхова Р.М., Тимершина И.Р., Газизова Л.Р., Бакирова А.С., Ахмадуллина Ю.А., Гильманов А.Ж. О лабораторном сопровождении лечебно-диагностического процесса при хронических заболеваниях печени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 9: 121-2.
25. Гайсина Ю.Р., Ахмадуллина Ю.А., Гильманов А.Ж., Мавзютов А.Р. Эндотоксемия и влияние микробных липополисахаридов на систему гемостаза у женщин с бактериальным вагинозом. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2011; 6(3): 155-9.
26. Малеев В.В., Полякова А.М., Кравченко А.В. *Нарушения гемостаза при инфекционных заболеваниях*. М.: Де Ново; 2005.
10. Emel'yanova A.N., Kizhlo L.B. Clinic-epidemiological features of ixodic tick-borne borreliosis in Zabaykalsky Krai. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 5: 103-5. (in Russian)
11. Mandrakova N.V., Madich E.A. Some aspects of immunopathogenesis of sharp ixodic tick-borne borreliosis in Primorsky Krai. *Dal'nevostochnyy zhurnal infeksionnoy patologii*. 2007; 11: 91-8. (in Russian)
12. Simakova A.I. Ixodic tick-borne borreliosis in Primorsky Krai. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2005; 1: 68-71. (in Russian)
13. Avdeyeva M.G., Moshkova D.YU., Blazhnaya L.P., Gorodin V.N., Zotov S.V., Vanyukov A.A. i dr. The Clinic-epidemiological characteristic of tick-borne borreliosis in Krasnodar Krai. *Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni*. 2014; 1: 4-11. (in Russian)
14. Vorob'yeva N.N., Sumlivaya O.N., Okishev M.A. Clinic-pathogenic features and prevention of ixodic tick-borne borreliosis. *Permskiy meditsinskiy zhurnal*. 2016; 4: 6-11. (in Russian)
15. Kon'kova-Reydmann A.B., Zlobin V.I., Tarasov V.N., Tarasov V.D., Ratnikova L.I., Rol'shchikov O.B. i dr. Etiopathogenic and clinical features of ixodic tick-borne borreliosis in the natural centers of South Ural. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2010; 5 (54): 24-34. (in Russian)
16. Carrasco S.E., Troxell B., Yang Y., Brandt S.L., Li H., Sandusky G.E. et al. Outer surface protein OspC is an antiphagocytic factor that protects *Borrelia burgdorferi* from phagocytosis by macrophages. *Infect. Immun*. 2015; 12(83): 4848-60.
17. Coipan E.C., Jahfari S., Fonville M., Oei G.A., Spanjaard L., Takumi K. et al. Imbalanced presence of *Borrelia burgdorferi* s.l. multilocus sequence types in clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Infect. Genet. Evol*. 2016; 42: 66-76.
18. Schlachter S., Seshu J., Lin T., Norris S., Parveen N. The *Borrelia burgdorferi* Glycosaminoglycan Binding Protein Bgp in the B31 Strain Is Not Essential for Infectivity despite Facilitating Adherence and Tissue Colonization. *Infect. Immun*. 2018; 2(86): e00667-17.
19. Kung F., Kaur S., Smith A.A., Yang X., Wilder C.N., Sharma K. et al. A *Borrelia burgdorferi* Surface-Exposed Transmembrane Protein Lacking Detectable Immune Responses Supports Pathogen Persistence and Constitutes a Vaccine Target. *J. Infect. Dis*. 2016; 11(213): 1786-95.
20. Sarksyann D.S. Ixodic tick-borne borreliosis. Current state of a problem. *Infeksionnyye bolezni*. 2015; 2 (13): 61-7. (in Russian)
21. Maccallini P., Bonin S., Trevisan G. Autoimmunity against a glycolytic enzyme as a possible cause for persistent symptoms in Lyme disease. *Med. Hypotheses*. 2018; 110: 1-8.
22. Mavzyutova G.A., Fazlyyeva R.M., Mavzyutov A.R., KHayrullina R.M., Akbasheva A.O., Kuzovkina O.Z. The state of antiendotoxine defence in the community acquired pneumonia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2010; 4: 65-71. (in Russian)
23. Kozlov A.A., Melkumyan A.L., Prostakova T.M. *Laboratory diagnostics of system of a hemostasis*. Moscow: Print; 2014. (in Russian)
24. Salyakhova R.M., Timersheva I.R., Gazizova L.R., Bakirova A.S., Akhmadullina YU.A., Gil'manov A.ZH. About laboratory maintenance of medical and diagnostic process at chronic diseases of a liver. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 9: 121-2. (in Russian)
25. Gaysina YU.R., Akhmadullina YU.A., Gil'manov A.ZH., Mavzyutov A.R. Endotoxemia and effects of microbial lipopolysaccharides on hemostasis in women with bacterial vaginosis. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2011; 6(3): 155-9. (in Russian)
26. Maleyev V.V., Polyakova A.M., Kravchenko A.V. *Нарушения гемостаза при инфекционных заболеваниях*. Moscow: De Novo; 2005. (in Russian)
27. Coleman J.L., Gebbia J.A., Piesman J. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell*. 1997; (89): 1111-9.

Поступила 31.10.18

Принята к печати 25.11.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:579.881.11-07:57.083.33

Рудаков Н. В.<sup>1,2</sup>, Абрамова Н. В.<sup>1,2</sup>, Штрек С. В.<sup>1,2</sup>, Шаламова Е. В.<sup>3</sup>, Пенъевская Н. А.<sup>1,2</sup>, Рудакова С. А.<sup>1</sup>,  
Самойленко И. Е.<sup>1</sup>, Березкина Г. В.<sup>1</sup>, Зеликман С. Ю.<sup>1,2</sup>, Кумпан Л. В.<sup>1,2</sup>, Матущенко Е. В.<sup>1,2</sup>, Наумкина Е. В.<sup>2</sup>

## КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КЛЕЩЕВЫХ РИККЕТСИОЗОВ НА ТЕРРИТОРИЯХ НИЗКОГО РИСКА ИНФИЦИРОВАНИЯ *RICKETTSIA SIBIRICA*

<sup>1</sup>ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, Омск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 644099, Омск, Россия;

<sup>3</sup>БУЗ Омской области «Называевская центральная районная больница», Омская область, г. Называевск

*Впервые дана сравнительная характеристика клинико-лабораторных показателей у пациентов с клиническими признаками клещевого риккетсиоза в природном очаге с низким риском заражения *R. sibirica* и циркулирующей *R. raoultii* в зависимости от результатов серологической верификации диагноза. Установлено почти полное совпадение клинико-лабораторных показателей у больных КР вне зависимости от наличия антител к *R. sibirica* и/или *R. raoultii*.*

*Показано, что даже комплексное применение РСК, РНИФ, ИФА для обнаружения антител к *R. sibirica* не позволяет верифицировать диагноз у третьей части больных с патогномичными признаками клещевого риккетсиоза. У серопозитивных пациентов преобладали антитела к *R. sibirica*, что не позволяет дифференцировать случаи КР разной видовой этиологии.*

*Обсуждаются возможные причины феномена «серонегативности» больных КР и подходы к его изучению.*

*Дается заключение, что при существующем разнообразии и недостаточной изученности риккетсий, циркулирующих в природных очагах, и современном состоянии лабораторной диагностики КР, основанием для постановки диагноза «клещевой риккетсиоз» должны быть клинико-эпидемиологические признаки данного инфекционного заболевания, которое необходимо регистрировать в установленном порядке даже при отсутствии серологической верификации. Для таких случаев в МКБ-10 предусмотрено два варианта кодировки: А 79.9 – Риккетсиоз неуточненный (инфекция, вызываемая риккетсиями, БДУ) и А 77.9 – Пятнистая лихорадка неуточненная (клещевой тиф, БДУ) [mkb-10.com].*

**Ключевые слова:** риккетсии и риккетсиозы; группа клещевой пятнистой лихорадки; лабораторная диагностика.

**Для цитирования:** Рудаков Н. В., Абрамова Н. В., Штрек С. В., Шаламова Е. В., Пенъевская Н. А., Рудакова С. А., Самойленко И. Е., Березкина Г. В., Зеликман С. Ю., Кумпан Л. В., Матущенко Е. В., Наумкина Е. В. Клинико-лабораторная диагностика клещевых риккетсиозов на территориях низкого риска инфицирования *Rickettsia sibirica*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (11): 717-721. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-717-721>

Rudakov N. V.<sup>1,2</sup>, Abramova N. V.<sup>1,2</sup>, Shtrek S. V.<sup>1,2</sup>, Shalamova E. V.<sup>3</sup>, Penyevskaya N. A.<sup>1,2</sup>, Rudakova S. A.<sup>1</sup>, Samoylenko I. E.<sup>1</sup>, Berezkina G. V.<sup>1</sup>, Zelikman S. Y.<sup>1,2</sup>, Kumpan L. V.<sup>1,2</sup>, Matushenko E. V.<sup>1,2</sup>, Naumkina E. V.<sup>2</sup>

### CLINICAL AND LABORATORY DIAGNOSIS OF TICK-BORNE RICKETTSIOSES IN AREAS OF LOW RISK OF INFECTION *RICKETTSIA SIBIRICA*

<sup>1</sup>Omsk Research Institute of natural focal Infections, 644080, Omsk, Russia;

<sup>2</sup>Omsk State Medical University, 644050, Omsk, Russia

*For the first time, a comparative description of clinical and laboratory parameters in patients with clinical signs of tick-borne rickettsiosis in a natural focus with a low risk of infection with *R. sibirica* and circulation of *R. raoultii* is given, depending on the results of serological verification of the diagnosis. Established almost complete coincidence of clinical and laboratory parameters in patients with tick-borne rickettsiosis, regardless of the presence of antibodies to *R. sibirica* and / or *R. raoultii*.*

*It was shown that even the complex use of complement fixation test, indirect immunofluorescent test and ELISA for the detection of antibodies to *R. sibirica* does not allow verification of the diagnosis in a third part of patients with pathognomonic signs of tick-borne rickettsiosis. In seropositive patients, antibodies to *R. sibirica* prevailed, which makes it impossible to differentiate cases of tick-borne rickettsiosis of different species etiology.*

*The possible reasons of the phenomenon of «seronegativity» of patients with tick-borne rickettsiosis and approaches to its study are discussed.*

*It is concluded that with the existing diversity and insufficient knowledge of rickettsiae circulating in natural foci, and the current state of laboratory diagnostics, the basis for the diagnosis of «Tick-borne rickettsiosis» should be the clinical and epidemiological signs of this infectious disease, which must be recorded in the established order even no serological verification. For such cases, ICD-10 has two encoding options: А 79.9 - Rickettsiosis, unspecified (infection caused by rickettsia, no other indication) and А 77.9 - Spotted fever, unspecified (tick-borne fever, no other indication) [mkb-10.com].*

**Key words:** rickettsiae and rickettsioses; spotted fever group; laboratory diagnostics.

**For citation:** Rudakov N. V., Abramova N. V., Shtrek S. V., Shalamova E. V., Penyevskaya N. A., Rudakova S. A., Samoylenko I. E., Berezkina G. V., Zelikman S. Y., Kumpan L. V., Matushenko E. V., Naumkina E. V. Clinical and laboratory diagnosis of tick-borne rickettsioses in areas of low risk of infection *Rickettsia sibirica*. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; (11): 717-721 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-717-721>

**For correspondence:** Rudakov N.V.; e-mail: [rickettsia@mail.ru](mailto:rickettsia@mail.ru)

**Information about authors:**

Rudakov N.V., <http://orcid.org/0000-0001-9566-9204>

Penyevskaya N.A. <http://orcid.org/0000-0002-7220-4366>

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

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

Received 10.12.2018

Accepted 20.12.2018

На территории России и Казахстана циркулируют не менее восьми видов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ), патогенность, иммуногенность и широта распространения которых изучены недостаточно [1]. Одна из причин - крайне ограниченные возможности лабораторной диагностики клещевых риккетсиозов (КР), в том числе давно известного сибирского клещевого тифа (СКТ), в условиях рутинной медицинской практики. В качестве серологических тестов для подтверждения диагноза КР могут быть использованы реакция связывания комплемента (РСК) и реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ). РСК с растворимым антигеном *R. sibirica* (этиологический агент СКТ) позволяет определять антитела к группоспецифическим антигенам риккетсий группы КПЛ. Более чёткая видовая дифференциация внутри группы возможна с помощью РНИФ. Однако коммерческий выпуск корпускулярных антигенов для постановки РНИФ никогда не был налажен, а выпуск препарата «Диагностикум риккетсиозный Сибирика для РСК» практически отсутствует. Даже при его наличии, РСК, как и РНИФ, характеризуется невысокой чувствительностью и поздним выявлением маркеров риккетсиальной инфекции (не ранее 13-15 дня от начала заболевания, чаще значительно позднее) [2]. Этого недостатка лишены иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием экспериментальных серий тест-систем для выявления IgM и IgG к риккетсиям [3; 4] и полимеразная цепная реакция (ПЦР), которая позволяет обнаруживать ДНК риккетсий в биоптате первичного аффекта кожи или в отдельных случаях в крови больного [5; 6]. Тест-системы для лабораторной диагностики КР методами ПЦР или ИФА в практической работе малодоступны.

Вышеперечисленное становится причиной неполной регистрации случаев КР в официальных формах статистической отчётности. Ежегодно остается нерасшифрованной этиология заболеваний, как минимум, у 30% госпитализированных больных с общеинфекционным синдромом и контактом с клещами в анамнезе, несмотря на использование современных лабораторных методов диагностики наиболее распространённых клещевых трансмиссивных инфекций (КТИ) - клещевого энцефалита (КЭ), иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ), гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ), моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) [7]. В природных очагах с высоким уровнем заболеваемости СКТ у 35% больных с типичной клинической картиной КР с помощью РСК не удается серологически верифицировать диагноз [8]. Недавние исследования показали, что даже комплексное использование РНИФ и ПЦР в классических очагах СКТ в Алтайском крае с высоким риском инфицирования *R. sibirica* не позволяет получить подтверждение диагноза почти в каждом третьем клиническо-эпидемиологически верифицированном случае СКТ. При этом отсутствуют достоверные отличия

в частоте встречаемости и длительности основных проявлений СКТ между группой больных с серологическим (РНИФ) и/или молекулярно-биологическим (ПЦР-РВ) подтверждением диагноза и группой больных, у которых диагноз СКТ выставлен только на основании клинико-эпидемиологических данных [9].

Особый интерес представляют территории, на которых, несмотря на расположение в пределах обитания иксодовых клещей – переносчиков КТИ, крайне редко регистрируют заболеваемость этими инфекциями, например, Называевский район Омской области, где за период с 2000 по 2014 г. зарегистрированы 1 случай КЭ (в 2008 г.), 1 случай ИКБ (в 2011 г.), 1 случай КР (в 2011 г.). Ежегодно в весенне-осенний период в Называевскую ЦРБ госпитализируют не менее двух десятков больных с клинико-эпидемиологическими признаками клещевого риккетсиоза. «Местное» происхождение КР доказано в 2014 г., когда на данной территории установили наличие природного очага клещевых риккетсиозов группы КПЛ с циркуляцией двух видов риккетсий – классического патогена *R. sibirica* и потенциально патогенного вида *R. raoultii*. Иксодофауна мест заражения людей представлена двумя видами переносчиков - клещами *Dermacentor marginatus* и *D. reticulatus*. Циркуляция *R. sibirica* подтверждена изоляцией штамма из переносчиков, сероконверсией сывороток крови пациентов и биопробных животных в РСК с антигеном *R. sibirica*, идентификацией этого вида риккетсий в органах биопробных животных молекулярно-биологическими методами. Изолированный штамм *R. sibirica* отличался низкой иммуногенностью и вирулентностью, что характерно для штаммов, циркулирующих на периферии нозоареала СКТ [2]. Присутствие в очаге *R. raoultii* установлено методом ПЦР с последующим секвенированием ампликонов ДНК риккетсий из иксодовых клещей, снятых с людей [10].

Цель работы – дать сравнительную характеристику клинико-лабораторных показателей у пациентов с клиническими признаками клещевого риккетсиоза в природном очаге с низким риском заражения *R. sibirica* и циркуляцией *R. raoultii* в зависимости от серологической верификации диагноза.

**Материал и методы.** Материалом для клинико-лабораторного анализа были «Медицинские карты стационарного больного» (истории болезни), результаты серологического обследования 72 больных, госпитализированных с подозрением на клещевой риккетсиоз в инфекционное отделение Называевской ЦРБ в период 2012-2015 г. Возраст пациентов: дети от 1 до 18 лет - 8 человек; взрослые от 36 до 60 лет – 40 человек, старше 60 лет - 24 человека. Клиническая картина заболевания была типичной для КР с первичным аффектом в месте входных ворот инфекции, розеолезной и розеолезно-папулезной сыпью, лихорадкой, симптомами интоксикации, гепато- и спленомегалией у части больных.

Характерная клиническая картина, в сочетании с весенне-осенней сезонностью заболеваний и наличием у подавляющего большинства факта присасывания клеща позволяло устанавливать диагноз «клещевой риккетсиоз» на основании клинико-эпидемиологических данных.

В исследование включены все пациенты с диагнозом клещевой риккетсиоз, прошедшие обследование на наличие серологических маркеров риккетсиозной инфекции несколькими методами (ИФА, РСК, РНИФ). От 27 больных исследовали парные сыворотки в динамике инфекционного процесса, от 45 больных - одиночные сыворотки крови. Группоспецифическую диагностику КР проводили с растворимым антигеном *R. sibirica* двумя методами: РСК и ИФА. Для видовой дифференциации *R. raoultii* и *R. sibirica* использовали РНИФ.

РСК выполняли микрометодом по общепринятой методике с «Диагностикомом риккетсиозным «Сибирика» сухим для РСК» производства НПО «БИОМЕД», г. Пермь. Для выполнения РНИФ по стандартной методике использованы: корпускулярные антигены *R. sibirica* и *R. raoultii*, приготовленные из клеточных культур,

инфицированных штаммами риккетсий из рабочей коллекции Омского НИИ природно-очаговых инфекций; иммуноглобулины диагностические флюоресцирующие антивидовые против иммуноглобулинов человека, сухие (НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, Москва); альбумин бычий, меченый родамином, сухой («МЕДГАМА» ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, Москва). Обнаружение специфических к риккетсиям IgM и IgG с помощью ИФА проводили экспериментальными тест-системами, разработанными в Омском НИИ природно-очаговых инфекций [4]. Для обнаружения IgM и IgG к возбудителям КЭ и ИКБ применяли коммерческие тест-системы для ИФА производства ЗАО «Вектор-Бест» и ООО «Омникс». Статистическая обработка данных проведена в программе Microsoft Excel.

**Результаты.** Антириккетсиальные антитела выявлены у 50 больных (серопозитивная группа), в том числе двумя или тремя методами – у 36 человек. У 14-ти пациентов клинический диагноз подтвержден только ИФА на основании обнаружения антириккетсиозных IgM (9 человек) или сероконверсии специфических IgG (5 человек). У 22 больных (серонегативная группа) не удалось обнаружить

**Сравнительная характеристика клинико-лабораторных показателей у больных с клинической картиной клещевого риккетсиоза в зависимости от серологической верификации диагноза**

Показатели	Исследуемые группы				Всего (n=72)		
	серонегативная (n=22)		серопозитивная (n=50)				
	n	M±m	n	M±m	n	M±m	
Длительность инкубационного периода, дни	14	5,2±4,5	38	5,9±7,7	52	5,7±6,9	
Длительность болезни, дни	22	13,6±3,0	50	12,2±3,3	72	12,6±3,2	
Длительность лихорадки, дни	22	4,5±2,2	50	5,1±2,7	72	5,0±2,6	
Максимальное повышение температуры тела (°С)	22	39,0±0,5	50	38,9±0,8	72	39,0±0,7	
Наличие первичного комплекса	18	81,8±8,2	39	78,0±5,9	57	79,2±4,8	
Первичный комплекс, %	Корочка	9	40,9±10,5	28	56,0±7,0	34	47,2±5,9
	Инфильтрат	13	59,1±10,5	31	62,0±6,9	40	55,6±5,9
	Лимфаденит	11	50,0±10,7	24	48,0±7,1	33	45,8±5,9
Кожная розеолезная сыпь, %	21	95,5±4,4	47	94,0±3,8	68	94,4±2,7	
Локализация сыпи	Туловище и конечности	15	68,2±9,9	28	56,0±7,0	43	59,7±5,8
	Только туловище	6	27,3±9,5	14	28,0±6,3	20	27,8±5,3
	Только конечности	0	0±4,0	5	10,0±4,2	5	6,9±3,0
Головная боль, %	18	81,2±8,2	44	88,0±4,6	62	86,1±4,1	
Слабость, %	20	90,9±6,1	49	98,0±2,0	69	95,8±2,4	
Снижение аппетита, %	15	68,2±9,9	39	78,0±5,9	54	75,0±5,1	
Изменения гемограммы, %	Лейкоцитоз	1	4,5±4,5*	23	46,0±7,0*	24	33,3±5,6
	Лейкопения	0	0±4,0	2	4,0±2,8	2	2,8±1,9
	Нейтрофилез	2	9,1±6,3	9	18,0±5,4	11	15,3±4,2
	Нейтропения	0	0±4,0	6	12,0±4,6	6	8,3±3,3
	Лимфоцитоз	2	9,1±6,3	12	24,0±6,0	14	19,4±4,7
	Лимфопения	3	13,6±7,3	6	12,0±4,6	9	12,5±3,9
	Моноцитоз	1	4,5±4,4	3	6,0±3,4	4	5,6±2,7
	Увеличение СОЭ	9	40,9±10,5	31	62,0±6,9	40	55,6±5,9
Увеличение печени, %	4	18,2±8,2	12	24,0±6,0	16	22,2±4,9	
Увеличение селезенки, %	1	4,5±4,5	2	4,0±2,8	3	4,2±2,4	
Повышение активности АЛТ, %	6	27,3±9,5	20	40,0±6,9	26	36,1±5,7	
Повышение активности АСТ, %	3	13,6±7,3	7	14,0±4,9	10	13,9±4,1	
Антитела к другим КТИ	IgM к вирусу КЭ, %	1	4,5±4,5	1	2,0±2,0	2	2,8±1,9
	IgG к ИКБ, %	0	0±4,0	2	4,0±2,8	2	2,8±1,9

Примечание. n – количество больных, у которых определен показатель; M – средняя арифметическая (для абсолютных величин) или доля больных, у которых определен показатель, от числа n (%); m – стандартная ошибка; КТИ – клещевые трансмиссивные инфекции.

серологические маркёры риккетсиальной инфекции ни одним из трёх методов. У одного пациента серонегативной группы и одного больного из серопозитивной группы обнаружены IgM к вирусу КЭ. В серопозитивной группе у двух больных выявлены IgG к возбудителю ИКБ.

Все положительные в РНИФ с антигеном *R. sibirica* сыворотки крови больных в 100% случаев были положительными в РСК и ИФА. У одного пациента проба сыворотки положительна к антигену *R. raoultii* и отрицательна к *R. sibirica*, при типичной клинической картине КР. Данный факт свидетельствует о том, что, в природных очагах КР с циркулирующей штаммов, отличающихся по вирулентности, достаточно трудно имеющимися серологическими методами дифференцировать случаи КР, вызываемые разными видами риккетсий.

Возраст пациентов варьировал: в серопозитивной группе от 3-х до 84-х лет (7 человек - до 18 лет, 28 человек - от 19 до 60 лет, 15 человек - старше 60 лет), в серонегативной - от 12-ти до 76-ти лет (2 человека - до 18 лет, 12 человек - от 19 до 60 лет, 8 человек - старше 60 лет). Лица мужского пола в серопозитивной группе составили 34 человека, женского - 16 человек; в серонегативной группе - 12 и 10 человек соответственно.

Характеристика клинико-лабораторных показателей у больных КР из серонегативной группы в сравнении с аналогичными показателями больных из серопозитивной группы представлены в таблице. Обращает на себя внимание отсутствие статистически значимых отличий между сравниваемыми группами по всем анализируемым показателям, за исключением содержания лейкоцитов в гемограмме. В серопозитивной группе отмечен лейкоцитоз у 46% больных, в серонегативной группе - только у 4,5% больных ( $t=5,00, p<0,01$ ). У пациентов с серологическими маркёрами КР имела место выраженная тенденция к снижению доли нейтрофильных лейкоцитов на фоне повышения доли лимфоцитов. В серопозитивной группе у 12,0±4,6% больных отмечена нейтропения, у 24,0±6,0% больных - лимфоцитоз, в серонегативной группе - 0±4,0% и 9,1±6,3% соответственно. Учитывая равную степень выраженности общериккетсионного синдрома в обеих группах, можно предположить наличие некоторых особенностей формирования адаптивного иммунитета у серонегативных пациентов, что нуждается в специальном изучении.

Длительность инкубационного периода в обеих группах варьировала от 2-х до 30 дней, составляя в среднем около 6 дней. Средняя продолжительность заболевания - 12-13 дней, госпитализации - 10 дней. Температура тела в разгар болезни достигала 39-40°С. В серопозитивной и в серонегативной группах лихорадка по длительности, как правило, не превышала 5-6 дней и сопровождалась слабостью (98,0±2,0% и 90,9±6,1% случаев соответственно), головной болью (88,0±4,6% и 81,2±8,2% случаев соответственно), снижением аппетита (78,0±5,9% и 68,2±9,9 случаев соответственно). На высоте заболевания у больных обеих групп отмечали увеличение размеров печени (у 24,0±6,0% больных серопозитивной группы и у 18,2±8,2% больных серонегативной группы) и селезёнки (4,0±2,8% и 4,5±4,5% соответственно). Чаще, чем увеличение размеров печени, обнаруживали повышение активности печёночных ферментов: АЛТ - в 40,0±6,9% случаев серопозитивного КР и в 27,3±9,5% случаев серонегативного КР; АСТ - в 14,0±4,9% и 13,6±7,3% случаев соответственно. В среднем у половины пациентов обеих групп отмечали повышенный уровень СОЭ.

Нормализация температуры тела и уменьшение сим-

птомов интоксикации в обеих группах проходило на фоне антибактериального лечения доксициклином.

Патогномоничным признаком КР является развитие первичного комплекса, включающего первичный аффект и регионарный лимфаденит. Первичный аффект (геморрагическая корочка на возвышающемся участке кожи - инфильтрате) считают специфической реакцией на внедрение *R. sibirica*, что подтверждено, в том числе, работами по выделению и идентификации возбудителя из первичного аффекта молекулярно-биологическими методами [11].

В обеих группах первичный комплекс в виде корочки, инфильтрата, регионарного лимфаденита не всегда представлен всеми его признаками, и в целом отсутствовал у 18,2% пациентов серонегативной группы и 22% пациентов серопозитивной группы. Согласно наблюдениям разных авторов, первичный комплекс может отсутствовать у 25-30% больных КР в отличие от сыпи, которую считают наиболее постоянным признаком клещевого риккетсиоза [8].

У подавляющего большинства больных обеих групп (94,0±3,8% серопозитивных и 95,5±4,4% серонегативных) наблюдали розеолезную, иногда розеолезно-папулезную сыпь (от единичных элементов до обильного высыпания) чаще на туловище и конечностях, реже - только на туловище или только на конечностях. Сыпь держалась 1-7 дней (в среднем 4) и исчезала, оставляя нестойкую пигментацию.

**Заключение.** Впервые проведён сравнительный анализ клинико-лабораторных показателей у больных с различным иммунным ответом к риккетсиям в очаге КР с низким риском заражения *R. sibirica* и циркуляцией *R. raoultii*. У серопозитивных пациентов преобладали антитела к *R. sibirica*, что не позволяет дифференцировать случаи КР разной видовой этиологии. Установлено почти полное совпадение клинико-лабораторных показателей у больных КР вне зависимости от наличия антител к *R. sibirica* и/или *R. raoultii*. Показано, что даже комплексное применение РСК, РНИФ, ИФА для обнаружения антител к *R. sibirica* не позволяет верифицировать диагноз у третьей части больных с патогномоничными признаками клещевого риккетсиоза.

Причинами феномена «серонегативности» больных КР могут быть ранние сроки серологического обследования; недостаточная чувствительность используемых методов; циркуляция в очаге других, неизвестных<sup>1</sup> или менее патогенных риккетсий группы КПЛ, например, *R. raoultii* - одного из этиологических агентов синдрома TIBOLA или DEBONEL. Общность патогенетических закономерностей развития заболеваний клещевыми риккетсиозами обуславливает схожесть их клинической картины [12]. По сравнению с «классическим» клещевым риккетсиозом, вызванным *R. sibirica*, при инфицировании *R. raoultii* генерализация процесса, клинические проявления и выработка антител могут быть менее выражены [13, 14]. Причиной «серонегативности» пациентов с диагнозом КР может быть тот факт, что в формировании специфической невосприимчивости к риккетсиям как внутриклеточным паразитам ведущее значение имеет не гуморальный, а клеточно-опосредованный иммунитет, для оценки которого в начале 1990-х годов ис-

<sup>1</sup>В этой связи можно провести историческую аналогию с иксодовыми клещевыми боррелиозами, которые долгое время считали серонегативным клещевым энцефалитом.

пользовали запрещённую впоследствии внутрикожную аллергическую пробу [1].

При существующем разнообразии и недостаточной изученности риккетсий, циркулирующих в природных очагах, и современном состоянии лабораторной диагностики, основанием для постановки диагноза «клещевой риккетсиоз» должны быть клинико-эпидемиологические признаки данного инфекционного заболевания, которое необходимо регистрировать в установленном порядке даже при отсутствии серологической верификации. Для таких случаев в МКБ-10 предусмотрено два варианта кодировки: А 79.9 – Риккетсиоз неуточнённый (инфекция, вызываемая риккетсиями, БДУ<sup>2</sup>) и А 77.9 – Пятнистая лихорадка неуточнённая (клещевой тиф, БДУ) [mkb-10.com].

С развитием современной риккетсиологии и расширением знаний об особенностях формирования иммунитета при инфицировании внутриклеточными возбудителями бактериальной природы, причина феномена «серонегативности» клещевых риккетсиозов будет расшифрована.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Рудаков Н.В. *Риккетсии и риккетсиозы: руководство для врачей*. Омск: Омский научный вестник; 2016.
2. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Решетникова Т.А. Проблемы лабораторной диагностики риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 1 (60): 50-2.
3. Абрамова Н.В., Рудаков Н.В., Пеньевская Н.А., Седы Н.Н., Кумпан Л.В., Самойленко И.Е. и др. Апробация иммуноферментного анализа для серологической диагностики инфекций, вызываемых риккетсиями из группы клещевой пятнистой лихорадки. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 1(50): 17-21.
4. Рудаков Н.В., Абрамова Н.В., Пеньевская Н.А., Самойленко И.Е., Шпынов С.Н., Решетникова Т.А. Способ лабораторной диагностики клещевого риккетсиоза с использованием иммуноферментного анализа для определения антител к антигену *Rickettsia sibirica*. Патент РФ №2477860; 2013.
5. Рудакова С.А., Коломец А.Н., Самойленко И.Е., Кузьминов А.М., Рудаков Н.В. Экспресс-индикация трансмиссивных патогенов как основа дифференцированного подхода к профилактике инфекций, передающихся иксодовыми клещами. *Бюллетень Сибирского отделения РАМН*. 2007; 4 (27): 116-9.
6. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Кумпан Л.В., Решетникова Т.А. Современные подходы к изучению *Rickettsiales*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2006; 5 (S1): 111-6.
7. Пеньевская Н.А., Рудаков С.А., Рудаков Н.В., Коломенский А.П. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, в северных районах Омской области. *Пермский медицинский журнал*. 2009; 5 (26): 32-9.
8. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Ястребов В.К., Оберт А.С., Курепина Н.Ю. *Риккетсии и риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки в Сибири*. Омск: Омский научный вестник; 2012.
9. Бесхлебова О.В., Гранитов В.М., Шпынов С.Н., Дедков В.Г., Арсеньева И.В., Пантюхина А.Н. Риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки в Алтайском крае. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2017; 2: 73-8.
10. Самойленко И.Е., Решетникова Т.А., Иголкина Я.П., Околева Н.А., Коломец А.Н., Шаламова Е.В. и др. Результаты микробиологических и молекулярно-биологических исследований в сочетании очаге клещевых риккетсиозов в Омской области. *Здоровье населения и среда обитания*. 2016; 11 (284): 19-21.
11. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Ястребов В.К., Леонова Г.Н., Хазова Т.Г., Егорова Н.В. и др. Выявление новых генотипов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки на юге Урала, в

Сибири, на Дальнем Востоке и в Казахстане. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2005; 1: 23-7.

12. Рудаков Н.В. Влияние патогенетических закономерностей инфекционного процесса на общность клинических и эпидемиологических проявлений клещевых риккетсиозов. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2015; 3: 68-71.
13. Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Рудакова С.А., Кумпан Л.В., Белан Ю.Б., Решетникова Т.А. и др. О роли *Rickettsia raoultii* в эпидемиологии клещевых риккетсиозов в России. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2015; 3: 17-21.
14. Иголкина Я.П., Рар В.А., Епихина Т.И., Тикуннов А.Ю., Краснова Е. И., Проворова В.В. и др. Выявление ДНК *Rickettsia raoultii* и *Rickettsia sibirica* в крови и ликворе пациентов в Западной Сибири. *Национальные приоритеты России*. 2016; 4 (22): 85-8.

#### REFERENCES

1. Rudakov N.V. *Rickettsia and rickettsioses: a guide for physicians*. Omsk: Omskiy nauchnyi vestnik; 2016. (in Russian)
2. Rudakov N.V., Samoilenko I.E., Reshetnikova T.A. Problems of laboratory diagnostics of rickettsioses of spotted fever group. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 1 (60): 50-2. (in Russian)
3. Abramova N.V., Rudakov N.V., Penyevskaya N.A., Sedih N.N., Kumpan L.V., Samoilenko I.E. et al. Approbation of the ELISA for the serological diagnosis of infections caused by rickettsiae of the spotted fever group. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2010; 1 (50): 17-21. (in Russian)
4. Rudakov N.V., Abramova N.V., Penyevskaya N.A., Samoilenko I.E., Shpynov S.N., Reshetnikova T.A. The method for laboratory diagnosis of tick-borne rickettsiosis using an enzyme immunoassay for the detection of antibodies to the *Rickettsia sibirica* antigen. Patent RF №2477860; 2013. (in Russian)
5. Rudakova S.A., Kolomeyetz A.N., Samoilenko I.E., Kuzminov A.M., Rudakov N.V. Express indication of transmissible pathogens as the basis for a differentiated approach to the prevention of tick-borne infections. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya RAMN*. 2007; 4 (27): 116-9. (in Russian)
6. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Samoilenko I.E., Kumpan L.V., Reshetnikova T.A. Modern approaches to the study of *Rickettsiales*. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya RAMN*. 2006; 5 (S1): 111-6. (in Russian)
7. Penyevskaya N.A., Rudakova S.A., Rudakov N.V., Kolomenskiy A.P. Ixodic tick-borne infections in the northern areas of the Omsk Region. *Permskiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; 5 (26): 32-9. (in Russian)
8. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Samoilenko I.E., Yastrebov V.K., Obert A.S., Kurepina N.Y. *Rickettsia and rickettsioses of the group of tick-borne spotted fever in Siberia*. Omsk: Omskiy nauchnyi vestnik; 2012. (in Russian)
9. Besxlebova O.V., Granitov V.M., Shpynov S.N., Dedkov V.G., Arseneva I.V., Pantyuxina A.N. Rickettsiosis tick-borne fever group in the Altai Territory. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye*. 2017; 2: 73-8. (in Russian)
10. Samoilenko I.E., Reshetnikova T.A., Igolkina Y.P., Okolelova N.A., Kolomeyetz A.N., Shalamova E.V. et al. E.B. Results of microbiological and molecular-biological studies in a mixt foci of tick-borne rickettsioses in the Omsk region. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2016; 11 (284): 19-21. (in Russian)
11. Shpynov S.N., Rudakov N.V., Yastrebov V.K., Leonova G.N., Hazova T.G., Egorova N.V. et al. Identification of new genotypes of rickettsia group of tick-borne spotted fever in the south of the Urals, in Siberia, in the Far East and in Kazakhstan. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2005; 1: 23-7. (in Russian)
12. Rudakov N.V. The influence of pathogenetic patterns of the infectious process on the common clinical and epidemiological manifestations of tick-borne rickettsioses. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2015; 3: 68-71. (in Russian)
13. Rudakov N.V., Samoilenko I.E., Rudakova S.A., Kumpan L.V., Belan Y.B., Reshetnikova T.A. et al. On the role of *Rickettsia raoultii* in the epidemiology of tick-borne rickettsioses in Russia. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2015; 3: 17-21. (in Russian)
14. Igolkina Y.P., Rar V.A., Epixina T.I., Tikunov A.Y., Krasnova E.I., Provorova V.V. et al. DNA detection of *Rickettsia raoultii* and *Rickettsia sibirica* in the blood and cerebrospinal fluid of patients in Western Siberia. *Natsional'nye prioritety Rossii*. 2016; 4 (22): 85-8. (in Russian)

Поступила 10.12.18

Принята к печати 20.12.18

<sup>2</sup>БДУ – без других указаний.

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 577.21.083

Коробкина Е.А.<sup>1,5</sup>, Князева М.С.<sup>1,5</sup>, Киль Ю.В.<sup>3</sup>, Титов С.Е.<sup>4,6</sup>, Малек А.В.<sup>1,2</sup>

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ МИКРОРНК С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ОТ-ПЦР)

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, 197758, Санкт-Петербург;

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

<sup>3</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», 188300, Гатчина;

<sup>4</sup>ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии» СО РАН, 630090, Новосибирск;

<sup>5</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург;

<sup>6</sup>АО «Вектор-Бест», 630559, Кольцово, Россия

Многие патологические состояния сопровождаются характерными изменениями профиля в клетках микроРНК – малых молекул, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Это даёт возможность рассматривать микроРНК как перспективный класс биологических маркеров. Осуществлено прямое сравнение трёх методов проведения ОТ-ПЦР (*s-Loop*, *u-Elong* и *2-Tail*) для анализа микроРНК с применением синтетического аналога микроРНК-451 для определения эффективности детекции молекул микроРНК и проведён анализ профиля микроРНК-29b, микроРНК-375 и микроРНК-451 в стабильных клеточных линиях OAW42 и HT29. Методами *2-Tail* и *s-Loop* также был проведён анализ семи разных микроРНК в 13 клинических образцах. Результаты показывают, что в подходах *2-Tail* и *s-Loop* проведение ОТ-ПЦР демонстрирует высокую воспроизводимость результатов анализа микроРНК и линейную зависимость эффективности детекции синтетической микроРНК-451 в диапазоне  $10^7$ – $10^3$  молекул на реакцию. По ряду значимых критериев две технологии оказались относительно равноценными, т.е. обе могут быть использованы в качестве основы для метода клинической диагностики.

Ключевые слова: микроРНК (миРНК); ОТ-ПЦР; биомаркеры; молекулярная диагностика.

**Для цитирования:** Коробкина Е.А., Князева М.С., Киль Ю.В., Титов С.Е., Малек А.В. Сравнительный анализ методов детекции микроРНК с помощью метода обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (11): 722-728. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-722-728>

Korobkina E.A.<sup>1,5</sup>, Knyazeva M.S.<sup>1,5</sup>, Kil Yu.V.<sup>3</sup>, Titov S.E.<sup>4,6</sup>, Malek A.V.<sup>1,2</sup>

#### COMPARATIVE ANALYSIS OF RT-QPCR BASED METHODOLOGIES FOR MICRORNA DETECTION

<sup>1</sup>N.N. Petrov Research Institute of Oncology, 197758, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>“Oncosystem” Ltd., 143026, Skolkovo, Russia;

<sup>3</sup>Petersburg Nuclear Physics Institute of National Research Center “Kurchatov Institute”, 188300, Gatchina, Russia;

<sup>4</sup>Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of The Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Russia;

<sup>5</sup>Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, 195251 Saint Petersburg, Russia;

<sup>6</sup>AO Vector-Best, 630117, Novosibirsk, Russia

Many pathological states are accompanied by characteristic changes in the cellular profile of microRNAs – small molecules that regulate gene expression at the posttranscriptional level. This allows us to consider miRNA as a promising class of biological markers. In the work, a direct comparison of three RT-qPCR methodologies (*s-Loop*, *u-Elong* and *2-Tail*) for miRNA analysis was performed. A synthetic miRNA-451 analog was used to determine the efficiency of miRNA molecule detection and analysis of the miRNA-29b, miRNA-375 and miRNA-451 profiles in OAW42 and HT29 cell lines was carried out. By the methods of *2-Tail* and *s-Loop*, seven different miRNA were also analyzed in 13 clinical specimens. The results of the study show that in the *2-Tail* and *s-Loop* approaches, RT-qPCR demonstrated high reproducibility in results of miRNA analysis, and a linear dependence of the mimic miRNA-451 detection efficiency in the range of  $10^7$  to  $10^3$  molecules per reaction was registered. On a number of significant criteria, the two technologies turned out to be relatively equivalent, i.e. any of them can be used as a basis for the method of clinical diagnostics.

Key words: microRNA (miRNA); RT-qPCR; biomarkers; molecular diagnostics.

**For correspondence:** Malek A.V., PhD, Head of Oncoendocrinology Lab, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, 197758 Saint Petersburg, Russia; e-mail: [anastasia@malek.com](mailto:anastasia@malek.com)

**For citation:** Korobkina E.A., Knyazeva M.S., Kil Yu.V., Titov S.E., Malek A.V. Comparative analysis of RT-qPCR based methodologies for microRNA detection. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (11): 722-728. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-11-722-728>

**Information about authors:**

Malek A.V. <https://orcid.org/0000-0001-5334-7292>

Kil Yu.V. <https://orcid.org/0000-0003-4603-5885>

Titov S.E. <https://orcid.org/0000-0001-9401-5737>

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

**Acknowledgment.** *This work was conducted in frame of the State Assignment from Russian Ministry of Health "Development of a test system for non-invasive early diagnostics and monitoring the efficiency of prostate cancer treatment" (ID 1129) with financial support of "Oncosystem" Ltd.*

Received 01.08.2018

Accepted 04.10.2018

*Введение.* МикроРНК – класс молекул РНК, строение и биологические функции которых описаны относительно недавно [1]. Это короткие одноцепочечные молекулы, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне путём комплементарного взаимодействия с молекулами информационной (матричной) РНК. Таким образом, в клетке регулирован синтез большинства белковых молекул, вовлечённых в разные аспекты клеточной биологии. К настоящему времени у человека описано около трёх тысяч разных микроРНК. Профиль экспрессии микроРНК, отражающий количественный уровень каждой из них, специфичен для клеток разных тканей и характеризуется несколькими десятками (или сотнями) так называемых мажорных молекул. Многие патологические состояния сопровождаются характерными изменениями клеточного профиля микроРНК, что позволяет рассматривать эти молекулы как перспективный класс биологических маркёров. На основе анализа микроРНК активно идёт разработка новых методов диагностики разных заболеваний. Очевидный прогресс достигнут в онкологии [2, 3], где такие диагностические системы находятся на стадиях разработки, испытаний или их уже применяют в клинической практике для выявления онкологических заболеваний, включая рак предстательной железы [4], щитовидной железы [5], колоректальный рак [6].

Для количественного анализа микроРНК принципиально применимы те же методы, которые традиционно используют для анализа микроРНК; это технология микрочипов (microarrays) [7], секвенирование, включая полногеномное секвенирование РНК (RNA-seq) [8] и метод обратной транскрипции (ОТ) с последующей полимеразной цепной реакцией – ПЦР (RT-qPCR) [9]. Существует ряд альтернативных методик количественной оценки микроРНК на основе реакции амплификации; однако пока они не нашли широкого применения [10-12]. В настоящее время метод ОТ-ПЦР является наиболее часто используемым в силу надёжности и относительно низкой стоимости.

Несмотря на широкое распространение, практическое использование метода ОТ-ПЦР, получение воспроизводимых результатов и их клиническая интерпретация не является тривиальной задачей. Результаты анализа микроРНК в большой мере зависят от качества выделяемых из биологических образцов препаратов общей РНК [13]. Кроме того, при работе с микроРНК имеют значение такие аспекты, как наличие незрелых форм [14] и небольшой размер зрелых молекул [9]. Длина зрелой молекулы микроРНК сопоставима по размерам с длиной праймеров, пара которых должна иметь места посадки на протяжении определяемой молекулы для инициации ПЦР. Поэтому перед проведением аналитической ПЦР необходимо удлинить молекулу микроРНК. Этот этап синтеза молекулы ДНК, которая должна иметь длину как минимум 50-60 оснований и часть которой комплементарна определяемой микроРНК, является критичным аспектом метода анализа микроРНК с помощью ОТ-ПЦР.

В 2005 г. предложен метод ОТ микроРНК с помощью праймера, формирующего так называемую петлю (stem-loop primer) [15]. Такой подход позволял в результате реакции ОТ получить

ДНК длиной 50–60 оснований; это обеспечивает возможность использовать такую молекулу в качестве матрицы для последующей ПЦР (рис 1, а). В течение нескольких лет этот метод оптимизирован и его широкое использование позволяет получать достоверные результаты [16]. Важной особенностью этого подхода является молекулярная специфичность проведения реакции ОТ: для каждого типа детектируемых микроРНК синтезирован и использован соответствующий ОТ-праймер. Позднее предложены еще несколько методов синтеза кДНК, основной особенностью которых являлось неспецифическое удлинение всех присутствующих в образце молекул микроРНК. Последующую реакцию ОТ инициирует праймер, комплементарный добавленному участку. Такая реакция неспецифична и теоретически позволяет получить пул разных кДНК, соответствующих набору микроРНК в исследуемом образце. Этот подход, с одной стороны, позволяет экономно использовать биологический материал для анализа большого числа молекул микроРНК. С другой стороны, чувствительность этого метода ниже, так как реакция ОТ инициирована с помощью универсального праймера равновероятно для всех молекул микроРНК; это, однако, может затруднять определение молекул с низкой мерой копирования. Методы удлинения микроРНК, которые предшествуют ОТ, могут быть разными: синтез поли-А [17] или поли-У [18] цепочки на 3'-конце микроРНК или ферментативное присоединение (лигирование) ДНК молекулы – адаптера [19] (рис. 1, б).

Оригинальный метод удлинения и ОТ предложен группой чешских исследователей [20]. Этот метод предполагает использование для ОТ относительно длинного праймера, который формирует петлю в середине молекулы, а два его конца комплементарно связывают концы детектируемой микроРНК, располагаясь навстречу друг другу (рис. 1, с). Реакция ОТ инициирует один из концов (3'-) праймера, при этом в процессе транскрипции происходит диссоциация второго конца (5'-) и синтез фрагмента кДНК, комплементарного полноразмерной молекуле микроРНК. Таким образом, образуется молекула кДНК достаточной длины и оба конца её имеют участки, комплементарные детектируемой микроРНК; это позволяет использовать два микроРНК-специфичных праймера для ПЦР. Влияние специфической структуры олигонуклеотида – праймера ОТ на эффективность (специфичность и чувствительность) предложенного метода детектирования микроРНК детально обсуждено авторами в ранее опубликованной работе [20].

Цель исследования – определение наиболее приемлемого метода для использования в клинической практике. Для этого проведено прямое сравнение нескольких ОТ-ПЦР технологий анализа микроРНК, схематически представленных на рис. 1 и обозначенных в тексте как s-Loop, u-Elong и 2-Tail.

*Материал и методы.* Стабильные линии клеток колоректального рака HT-29 [21] и рака яичников OAW-42 [22] культивировались в стандартных условиях (среда RPMI-1640 с L-глутамином и 10% эмбриональной сыворотки телят (БиоЛот, СПб) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Образцы цитологических препаратов, которые содержат материал тонкоигольной, аспирационной биопсии узлов щитовидной железы, получены в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова». Протокол исследования утверж-

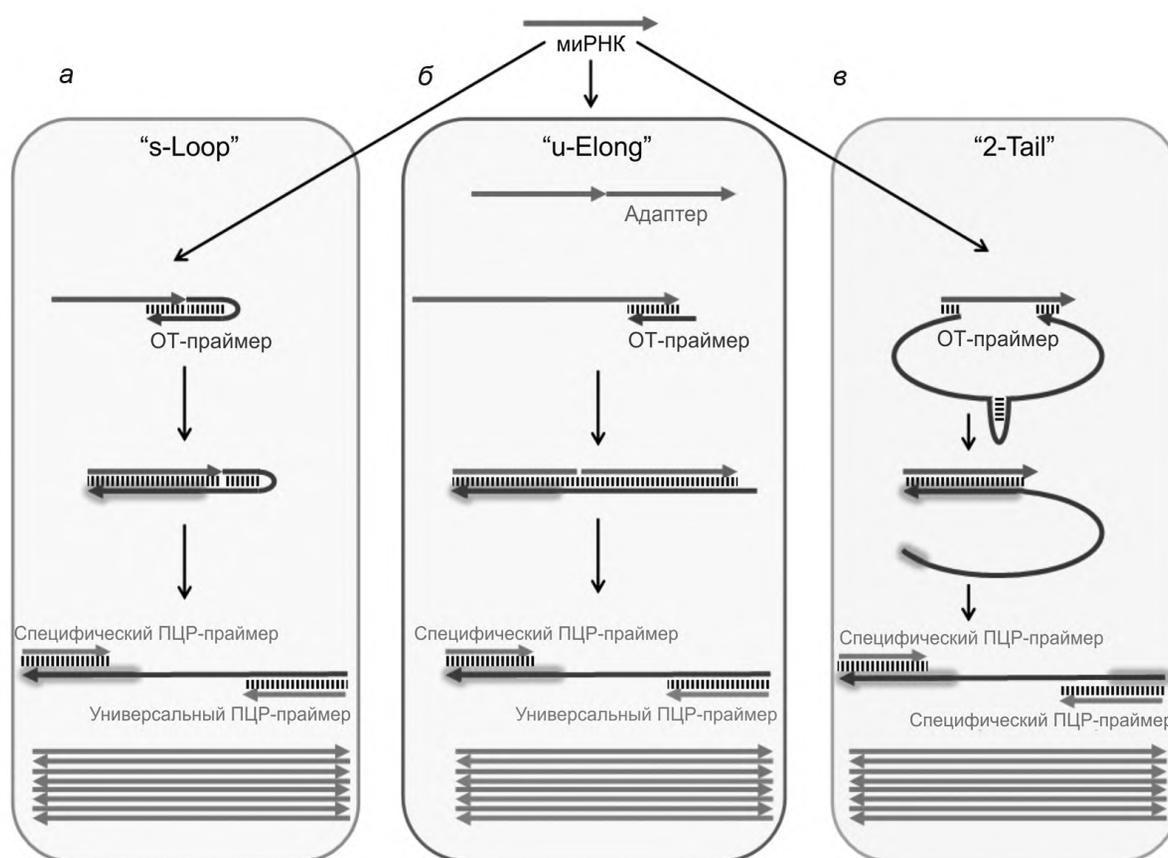


Рис. 1. Схема детекции молекул микроРНК тремя разными подходами проведения ОТ-ПЦР: методы s-Loop, u-Elong и 2-Tail (пояснения в тексте).

дён Комитетом по этике при «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» (№1/66 из протокола заседания №7 от 17.05.2018). Для выделения РНК из препаратов использовали наборы для выделения на основе спин-колонок производства компании «Био-Силика» (Новосибирск, Россия). РНК из биопсийного материала выделяли по ранее описанному протоколу [23].

Дизайн олигонуклеотидов для анализа трёх молекул микроРНК представлен в табл. 1. В системе stem-loop с целью оптимизации температуры отжига праймеров в ходе ПЦР отдельные нуклеотиды в их составе модифицированы (Locked Nucleic Acid, LNA). Дизайн олигонуклеотидов для методов u-Linker и 2-Tail выполнен согласно рекомендациям авторов [19, 20]. Олигонуклеотиды, использованные в реакциях ОТ-ПЦР-анализа трёх миРНК (миРНК-29b, миРНК-375 и миРНК-451), были синтезированы АО «Вектор Бест» (Новосибирск, Россия), ООО «Праймтех» (Минск, Республика Беларусь) и компанией «IDT» (Skokie, США). Синтетическая олигоРНК, имитирующая микроРНК-451, синтезирована компанией ООО «БИОСАН» (Новосибирск, Россия). Информация по остальным олигонуклеотидам может быть предоставлена по запросу. Анализ миРНК методом ОТ-ПЦР проводили с использованием амплификатора Real-Time CFX96 производства компании Bio-Rad Laboratories (Hercules, США) на 96-луночном планшете согласно трём протоколам:

1. *s-Loop*. Реакционная смесь для ОТ содержала: 2 мкл раствора выделенной РНК, 16,2 мкл 40% раствора трегалозы, 3 мкл 10× буфера для ОТ (АО «Вектор-Бест»), 3 мкл 4 мМ раствора дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 3 мкл 10% раствора BSA, 100 е.а. M-MLV обратной транскриптазы (АО «Вектор-Бест»), 1,5 мкл 10 мкМ раствора соответствующего праймера

для ОТ. Реакцию проводили в течение 30 мин при 42°C, после чего обратную транскриптазу инактивировали 2 мин при 95°C. 2 мкл смеси использовали для ПЦР. Объём реакционной смеси для каждой реакции ПЦР составлял 30 мкл: 2 мкл полученной кДНК, 15 мкл H<sub>2</sub>O, 3 мкл 10× буфера для ПЦР (АО «Вектор-Бест»), 3 мкл 4 мМ раствора дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (ООО «Биосан»), 3 мкл 10% раствора BSA, 1 е.а. Taq-полимеразы (АО «Вектор-Бест») в комплексе с моноклональными антителами к её активному центру (Clontech, США), 3 мкл раствора прямого и обратного праймеров (5 мкМ) и зонда (2,5 мкМ). Протокол ПЦР: предварительный прогрев при 94°C – 2 мин, 50 основных циклов: денатурация при 94°C – 10 с, отжиг и элонгация: 60°C – 20 с.

2. *u-Elong*. Стадии лигирования линкера и реакцию ОТ проводили в полном соответствии с предложенной методикой [19], включая использование рекомендованных ферментов: T4 RNA Ligase 2, truncated K227Q (New England Biolabs) в лигазной реакции и PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa/Clontech) для проведения ОТ. ПЦР в реальном времени с использованием стандартного набора БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (БиоМастер, Новосибирск) проводили по следующему протоколу: за прогревом реакции при 95°C в течение 6 мин следовали 45 циклов, состоящих из повторов по 10 с при 95°C и 35 с при 64°C. Стандартная реакция (20 мкл) содержала 2 пмоль микроРНК-специфического и универсального Urm2A праймеров каждого и 2 мкл раствора кДНК, полученной на первой стадии.

3. *2-Tail*. Все стадии ОТ-ПЦР в рамках этого метода выполняли в соответствии с оригинальным протоколом [20] за исключением того, что объёмы всех реакций были увеличены до 20

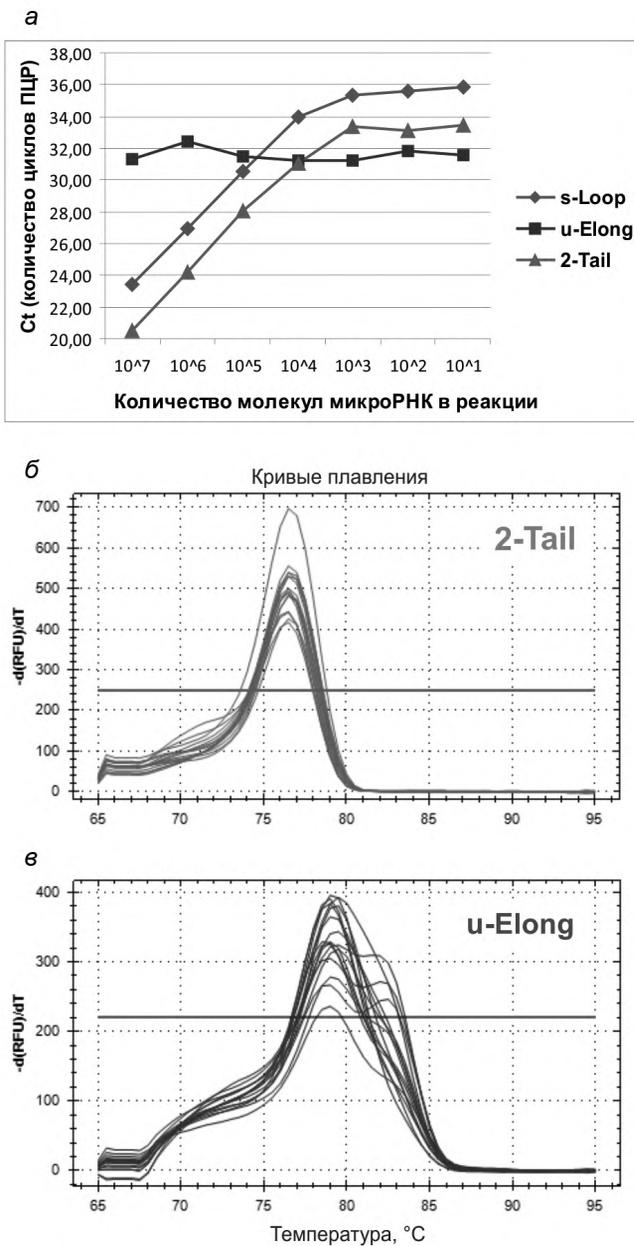


Рис. 2. Результаты детектирования синтетической микроРНК (микроРНК-451) тремя подходами проведения ОТ-ПЦР.

*а* – динамический диапазон регистрируемых концентраций микроРНК; кривые плавления конечного продукта ПЦР, получаемого методами 2-Tail (*б*) и u-Long (*в*).

мкл и в анализе использовали стандартные наборы российского производства от компании БиоМастер: ОТ-M-MuLV-RN для проведения реакции ОТ и HS-qPCR SYBR Blue (2×) для проведения ПЦР. Во всех анализах в ПЦР использовали десятую часть (2 мкл) кДНК, полученной в результате реакции ОТ.

**Результаты.** Мы провели сравнение эффективности трёх разных подходов ОТ-ПЦР для количественной оценки семи вариантов микроРНК. Для определения динамического диапазона регистрируемых концентраций микроРНК разными методами ОТ-ПЦР использован аналог микроРНК-451 с известной концентрацией. Для анализа микроРНК в биологическом материале использованы образцы тотальной РНК, выделенной из

клеток двух линий и 13 клинических образцов (тонкоигольной аспирационной биопсии узлов щитовидной железы). При проведении ОТ-ПЦР методами u-Elong и 2-Tail детекцию сигнала проводили с помощью красителя SYBR Green I. В методике s-Loop использовали флуоресцентный зонд с красителем HEX, что обеспечивало повышение специфичности метода.

**Динамический диапазон регистрации синтетической микроРНК-451.** На основе исходного препарата синтетической микроРНК-451 с концентрацией 100 пкМ мы создали серию последовательных десятикратных разведений таким образом, чтобы реакция ОТ-ПЦР стартовала в каждом случае в диапазоне от 10<sup>7</sup> до 10 молекул микроРНК на реакцию. Согласно полученным результатам (рис. 2, *а*), линейную зависимость между концентрацией детектируемой микроРНК молекулы и данными ОТ-ПЦР наблюдали в случае использования систем s-Loop и 2-Tail в диапазоне концентраций 10<sup>7</sup>–10<sup>3</sup> молекул на реакцию. При снижении концентрации детектируемой молекулы наблюдалась стабилизация значения Ct на 33–33,5 (2-Tail) или 35–36 (s-Loop) циклах. Результаты, полученные методом универсальной элонгации (u-Elong), слабо зависели от концентрации детектируемой молекулы, что не позволяет расценивать этот метод как подходящий для количественного анализа, по крайней мере в случае микроРНК-451.

Кроме того, кривые плавления (melting curve) при проведении ПЦР, которые являются контролем специфичности проводимой реакции, в случае анализа микроРНК-451 методом u-Elong показали наличие побочных продуктов (рис. 2, *в*) в виде дополнительных пиков. На кривой денатурации продукта ОТ-ПЦР по методике 2-Tail мы выявили лишь один узкий пик с температурой плавления 76,5°C (см. рис. 2, *б*), что соответствует характеристикам ожидаемого продукта ПЦР (70 нуклеотидных пар с 46% GC-составом).

**Анализ экспрессии разных микроРНК в культивируемых клеточных линиях.** Для сравнения эффективности трёх методик в ряде параллельных экспериментов проведена оценка концентрации трёх молекул (микроРНК-29b, микроРНК-375, микроРНК-451) в препаратах РНК, выделенных из культур клеток рака яичников (OAW42) и колоректального рака (HT29). Выбранные микроРНК (рис. 3) имеют лишь по одной биологически активной изоформе, но отличаются особенностями биогенеза (для микроРНК-29b и микроРНК-375 биологически активной является форма 3p, а для микроРНК-451 – 5p), а также гуанин-цитозинным составом (микроРНК-29b и микроРНК-451 – 35-36% GC; микроРНК-375 – 55% GC). Перечисленные особенности могут оказывать влияние на эффективность детекции методом ОТ-ПЦР.

Все реакции ОТ-ПЦР для трёх микроРНК (микроРНК-29b, микроРНК-375, микроРНК-451) тремя системами детектирования (s-Loop; u-Elong; 2-Tail) с использованием двух препаратов тотальной РНК (OAW42, HT29) проведены с тройными повторами. Результаты, представленные на рис. 4 в виде значений Ct, отражают хорошую воспроизводимость всех трёх методов: стандартные отклонения по трём измерениям не превышали 2,5% от среднего значения. При этом можно заметить, что эффективность детектирования микроРНК-375 с высоким содержанием GC изменяется в ряду тестируемых методов как s-Loop >> u-Elong >> 2-Tail. Для молекул с низким содержанием GC, микроРНК-29b и микроРНК-451, отметили обратную тенденцию.

В ходе каждого эксперимента, кроме анализа пиков кривой плавления конечных продуктов ПЦР, проводили реакцию ПЦР с реакционной смесью, не содержащей кДНК (безматричный контроль; англ. NTC – No Template Control), с целью оценки вероятности формирования в реакции ПЦР так называемых «праймерных димеров» в результате их взаимодействия друг с другом. Такой контроль часто давал позитивный результат при использовании системы u-Elong, причём кривая флуоресценции в безматричной реакции пересекала пороговую линию (C<sub>t</sub>) лишь на 1–3 цикла позднее, чем в ре-

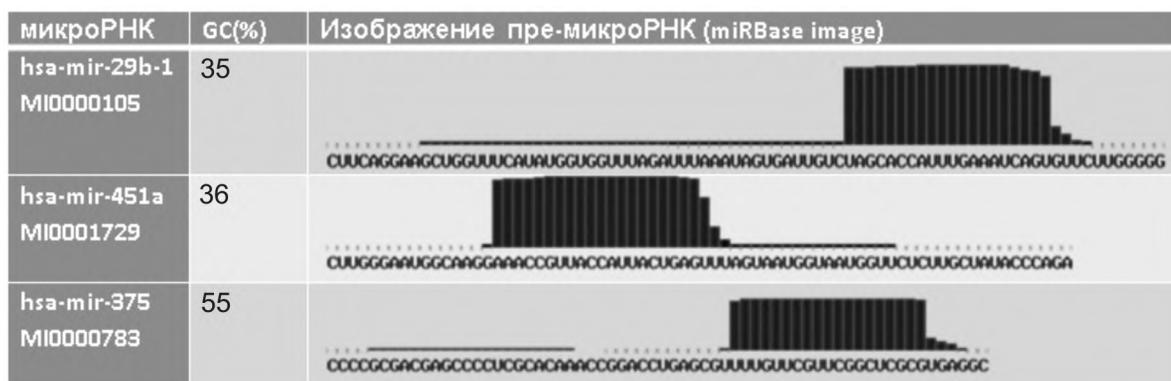


Рис. 3. Структура незрелых микроРНК по данным сайта [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org). Представлены последовательности микроРНК-29b, микроРНК-451a и микроРНК-375 с указанием процентного содержания GC-пар в их составе. Вертикальными барами отмечены биологически активные последовательности зрелых микроРНК: 5p в случае микроРНК-451a и 3p в случае микроРНК-29b и микроРНК-375.

акции, содержащей кДНК. Это говорит о том, что структура праймеров в системе u-Elong допускает их комплементарное взаимодействие, которое может инициировать неспецифическую ПЦР и приводить к ложноположительным результатам. Образование праймерных димеров или иных неспецифических продуктов в процессе проведения ПЦР подтверждается анализом кривой плавления, полученной в эксперименте с синтетическим аналогом микроРНК-451 (см. рис. 2, в).

В линии клеток колоректального рака HT29 удалось определить микроРНК-29b методом s-Loop ( $C_t = 32,9$ ), две другие методики оказались неэффективны. При этом результаты анализа двух других молекул были сопоставимы. Бо-

лее того, микроРНК-451, которую мы определяли методом s-Loop на более поздних циклах (т.е. менее эффективно), чем микроРНК-29b, можно было определить и методами u-Elong и 2-Tail. Согласно полученным результатам, эффективность определения зависит не только от метода, но и от особенностей детектируемой молекулы микроРНК и структуры используемых праймеров.

*Анализ экспрессии разных микроРНК в клинических образцах.* С учётом результатов, полученных методом элонгации микроРНК и последующей неспецифической ОТ (отсутствие зависимости эффективности ПЦР от концентрации детектируемой микроРНК и высокий уровень сигнала в безматричной контрольной пробе), мы отказались от использования метода u-Elong как минимум в предложенном варианте исполнения.

Детальное сопоставление эффективности методов s-Loop и 2-Tail было проведено с использованием 13 образцов РНК, выделенной из материала тонкоигольной биопсии узлов щитовидной железы. Анализ концентрации семи микроРНК проведён параллельно двумя методами; каждая реакция проведена в трёх повторах. В качестве примера репрезентативные результаты анализа трёх биологических образцов представлены на рис. 5. Как и в предшествующих экспериментах, низкие значения стандартных отклонений выявили хорошую воспроизводимость результатов. При этом эффективность детекции разных молекул методами s-Loop и 2-Tail существенно различалась. Анализ результатов, полученных для отдельных микроРНК, показывает, что соотношение значений  $C_t$  повторяется в ряду разных биологических образцов. Для верификации этого наблюдения соотношение значений  $C_t(s\text{-Loop}) / C_t(2\text{-Tail})$  мы подсчитали для каждой тестируемой микроРНК. Эти соотношения для разных молекул микроРНК разные, но для каждой молекулы они сохранялись в ряду биологических образцов. В табл. 2 представлены усреднённые (для 13 образцов РНК) значения  $C_t(s\text{-Loop}) / C_t(2\text{-Tail})$  и соответствующие значения стандартных отклонений. Низкие значения стандартных отклонений подтверждают наше предположение о том, что получаемые разными методами ОТ-ПЦР результаты анализа концентрации (экспрессии) микроРНК зависят от метода и от структуры детектируемой молекулы, т.е. результаты, полученные одним методом, могут быть не воспроизведены другим. Но при этом соотношение данных, полученных методами s-Loop и 2-Tail, сохраняется постоянным при анализе разных биологических образцов.

*Обсуждение.* В обозримом будущем методы анализа микроРНК в биопсийном материале войдут в клиническую практику. Наборы для предоперационной диагностики узловых образований щитовидной железы, предлагаемые рядом

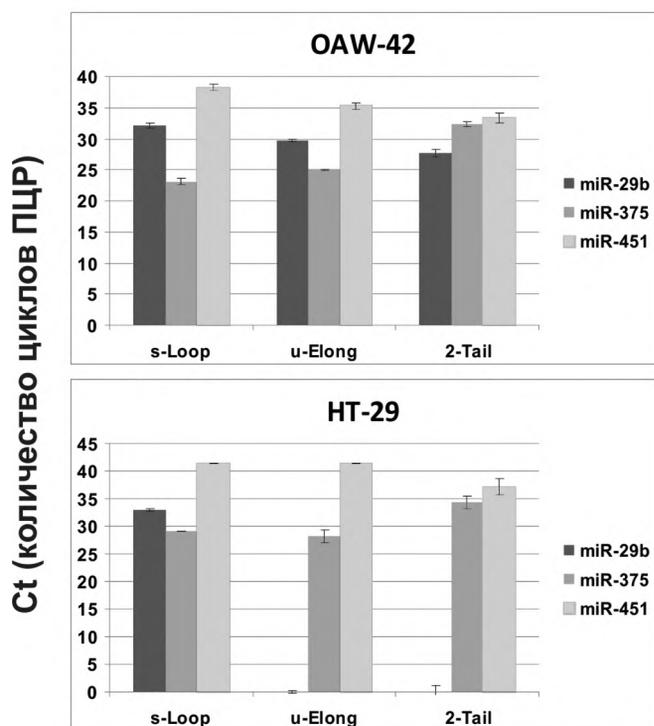


Рис. 4. Результаты анализа микроРНК-29b, микроРНК-375 и микроРНК-451a в образцах РНК, выделенных из клеточных культур. OAW42 – линия клеток рака яичников; HT29 – линия клеток колоректального рака.

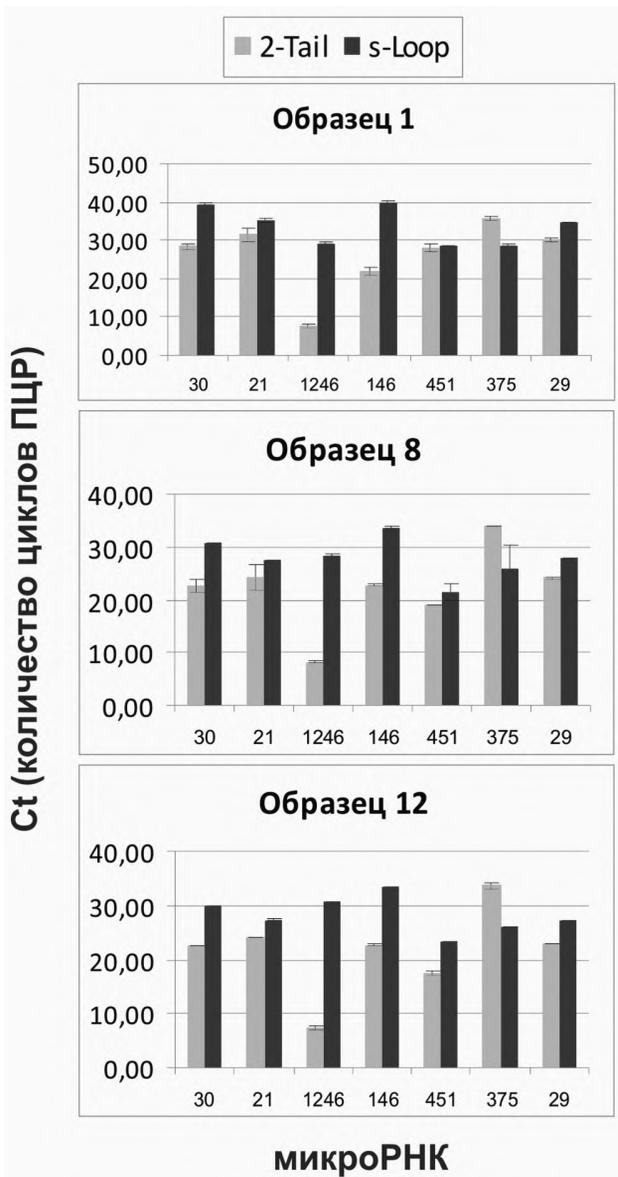


Рис. 5. Примеры детектирования семи разных микроРНК методами 2-Tail и s-Loop для трёх клинических образцов: 1, 8 и 12.

зарубежных компаний, уже используют в клинике в качестве дополнения к стандартным диагностическим алгоритмам («Rosetta GXReveal» / Rosetta Genomics; «ThyraМИРНК» / Interpace diagnostics). Методы прогнозирования течения или ответа на гормональную терапию рака предстательной железы проходят клинические испытания (NCT02964351, NCT01220427, NCT02366494). Успех внедрения этих методов в клиническую практику зависит от двух факторов: диагностической значимости изменений экспрессии микроРНК, выявленных в ходе научных исследований, во-первых, и доступности лабораторных технологий анализа микроРНК, во-вторых. Результаты нашего исследования подтверждают возможность использовать метод ОТ-ПЦР для анализа микроРНК в клинических образцах. Описанные методы имеют стоимость, сопоставимую со стоимостью рутинных ПЦР-тестов, которые используют для определения инфекций или генетических мутаций, и теоретически могут быть воспроизведены в клиничко-диагностической лаборатории.

В рамках исследования нам не удалось показать диагностическую значимость технологии u-Elong, которая включает этап лигирования всех молекул микроРНК и не микроРНК - специфическую реакцию обратной транскрипции. Наши результаты расходятся с данными, представленными авторами методики [19], что не ставит под сомнение их достоверность, но указывает на нетривиальность задачи воспроизведения или внедрения в практику этой технологии. Следует учитывать, что данная методика является оптимальной для проведения «профайлинговых» исследований с целью поиска диагностически значимых молекул микроРНК в рамках научных проектов, но не в клинической диагностике. Таким образом, воспроизведение методики u-Elong является скорее задачей для научных лабораторий. Кроме того, наборы для «профайлингового» анализа микроРНК на основе аналогичных технологий разработаны рядом биотехнологических компаний («for research only») – микроРНКCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR panels / Qiagen или TaqMan™ Advanced

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидов		
миРНК-29b-1	Loop primer RT	gtcgtgtctgaggctcactgagaccttgcac cctcgacacgaca(c)ac(t)gat
	s-Loop PCR-forward	cagcactagcaccatttgaa
	PCR-reverse	ctgaggctcactgagacct
	Probe	ttcgaccctcgacagacaactgat
	Adaptor	ggccgaactacgacctgcataaacgg
	u-Elong mQ-RT	cccagttatggccgttatgacaggt
	PCR-forward-sp	tagcaccattgaaatcagttg
миРНК-375	PCR-reverse Upm2A	cccagttatggccgttta
	RT	tggtgctagctgagctcctgtagagttgc- tacgagatataaataaacact
	2-Tail PCR-forward	tggtgctagcttgagctc
	PCR-reverse	tagcgccattgaaatcagtg
	Loop primer RT	gtcgtgtcagaggctcactgagacctattgc acctcgacagact(c)acg(c)ga
	s-Loop PCR-forward	acagctttgttcgttcggc
	PCR-reverse	ctgaggctcactgagacct
миРНК-451	Probe	cgacacgactcagcga
	Adaptor	ggccgaactacgacctgcataaacgg
	u-Elong mQ-RT	cccagttatggccgttatgacaggt
	PCR-forward-sp	ttgttcgttcggtcgc
	PCR-reverse Upm2A	cccagttatggccgttta
	RT	cgaacaactcaagctcctcaggctacagttg- gtacctgactccacgctcacgc
	2-Tail PCR-forward	cgaacaactcaagctcctcag
миРНК-451	PCR-reverse	cgggtttgttcgttcggctc
	Loop primer RT	gtcgtgtcagaggctcactgagacctattgc cctcgacacgaca(c)(t)(c)agt
	s-Loop PCR-forward	ccagcaaacggttaccatt
	PCR-reverse	ctgaggctcactgagacct
	Probe	cgacacctcgacagacaactcagta
	Adaptor	ggccgaactacgacctgcataaacgg
	u-Elong mQ-RT	cccagttatggccgttatgacaggt
миРНК-451	PCR-forward-sp	aaaccgttaccattactgagtt
	PCR-reverse Upm2A	cccagttatggccgttta
	RT	aacggttcagcaactactgctagag- tgctagcagagccctaaactca
	2-Tail PCR-forward	caaccggttcgacgaatac
	PCR-reverse	ggaaacggttaccattactg

Примечание. Нуклеотиды в скобках в составе Loop primer RT (s-Loop) имеют структуру LNA (locked nucleic acid)

Таблица 2

Соотношение результатов ОТ-ПЦР, полученных методами 2-Tail и s-Loop

миРНК	Средние значения соотношения результатов 2-Tail / s-Loop	Стандартное отклонение
миРНК-30	0,77	0,04
миРНК-21	0,89	0,04
миРНК-1246	0,25	0,03
миРНК-146b	0,65	0,08
миРНК-451	0,84	0,14
миРНК-375	1,08	0,18
миРНК-29b-1	0,95	0,12

миРНКNA Human Cards / ThermoFischer Scientific. Использование этих наборов может обеспечить получение достоверных результатов в рамках исследовательской работы.

Сравнение двух других методов анализа специфических молекул микроРНК (s-Loop и 2-Tail) показало сопоставимые результаты. Особое внимание привлекает факт высокой воспроизводимости результатов, которые получены каждым из этих методов. В относительно широком диапазоне концентраций миРНК-451 ( $10^7$ - $10^3$  молекул на реакцию) оба метода выявили хорошую линейную зависимость. Сопоставимой оказывается и стоимость исследований, проведенных методами s-Loop и 2-Tail. Так, по ряду значимых критериев две технологии оказались относительно равноценны, т.е. любую из них можно использовать в качестве основы для метода клинической диагностики. Особого внимания требует факт систематического (воспроизводимого) расхождения результатов, полученных двумя технологиями, для ряда молекул микроРНК. Можно предполагать, что особенности конкретной микроРНК (нуклеотидная последовательность, GC-состав, вторичная структура) определяют эффективность определения этой микроРНК тем или иным методом. Понимание наблюдаемого феномена требует дополнительных исследований. Результаты представленной работы позволяют лишь сделать вывод о том, что использование разных технологий потребует особой осторожности в ходе клинического применения результатов.

**Заключение** Методы 2-Tail и s-Loop, примененные нами как для анализа эффективности определения разных концентраций синтетической микроРНК-451, так и для определения профилей семи микроРНК для культивируемых линий и клинических образцов щитовидной железы, в целом показали высокий уровень соответствия результатов, что говорит о возможности их применения в клинической диагностике.

**Финансирование.** Исследование проведено в рамках темы государственного задания Минздрава России «Разработка тест-системы для малоинвазивной ранней диагностики и мониторинга эффективности лечения рака предстательной железы» (ID 1129) при финансовой поддержке ООО «Онко-система».

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-22 см. REFERENCES)

23. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Верякина Ю.А., Владимирова А.В., Самсонов Р.Б., Артемьева А.С. и др. Повышение точности и информативности тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии опухолей молочной железы путем анализа микроРНК в материале цитологического мазка. *Успехи молекулярной онкологии*. 2016; 3 (1): 44-52.

REFERENCES

- Fabbri M., Croce C.M., Calin G.A. MicroRNAs. *Cancer journal*. 2008; 14 (1): 1-6.
- Sethi S., Sethi S., Bluth M.H. Clinical Implication of MicroRNAs in Molecular Pathology: An Update for 2018. *Clinics in laboratory medicine*. 2018; 38 (2): 237-51.
- Peng Y., Croce C.M. The role of microRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy*. 2016; 1: 15004.
- Sharma N., Baruah M.M. The microRNA signatures: aberrantly expressed miRNAs in prostate cancer. *Clinical and translational oncology*. 2018.
- Nikiforov Y.E. Role of Molecular Markers in Thyroid Nodule Management: Then and Now. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2017; 23 (8): 979-88.
- Feng H., Xu M., Zhang Y., Han B., Wang J., Sun P. Identification of Differentially Expressed MicroRNAs involved in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Clinical laboratory*. 2018; 64 (5): 797-804.
- Ranade A.R., Weiss G.J. Methods for microRNA microarray profiling. *Methods in molecular biology*. 2011; 700: 145-52.
- Liu J., Jennings S.F., Tong W., Hong H. Next generation sequencing for profiling expression of miRNAs: technical progress and applications in drug development. *Journal of biomedical science and engineering*. 2011; 4 (10): 666-76.
- Benes V., Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*. 2010; 50 (4): 244-9.
- Deng R., Zhang K., Li J. Isothermal Amplification for MicroRNA Detection: From the Test Tube to the Cell. *Accounts of chemical research*. 2017; 50 (4): 1059-68.
- Jin J., Vaud S., Zhelkovsky A.M., Posfai J., McReynolds L.A. Sensitive and specific miRNA detection method using SplintR Ligase. *Nucleic acids research*. 2016; 44 (13): e116.
- Ma F., Liu M., Tang B., Zhang C.Y. Sensitive Quantification of MicroRNAs by Isothermal Helicase-Dependent Amplification. *Analytical chemistry*. 2017; 89 (11): 6182-7.
- Ibberson D., Benes V., Muckenthaler M.U., Castoldi M. RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling. *BMC biotechnology*. 2009; 9: 102.
- Tong L., Xue H., Xiong L., Xiao J., Zhou Y. Improved RT-PCR Assay to Quantitate the Pri-, Pre-, and Mature microRNAs with Higher Efficiency and Accuracy. *Molecular biotechnology*. 2015; 57 (10): 939-46.
- Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2005; 33 (20): e179.
- Varkonyi-Gasic E., Hellens R.P. Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. *Methods in molecular biology*. 2011; 744: 145-57.
- Balcells I., Cirera S., Busk P.K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC biotechnology*. 2011; 11: 70.
- Mei Q., Li X., Meng Y., Wu Z., Guo M., Zhao Y. et al. A facile and specific assay for quantifying microRNA by an optimized RT-qPCR approach. *PLoS one*. 2012; 7 (10): e46890.
- Benes V., Collier P., Kordes C., Stolte J., Rausch T., Muckenthaler M.U. et al. Identification of cytokine-induced modulation of microRNA expression and secretion as measured by a novel microRNA specific qPCR assay. *Scientific reports*. 2015; 5: 11590.
- Androvic P., Valihrach L., Elling J., Sjoback R., Kubista M. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic acids research*. 2017; 45 (15): e144.
- von Kleist S., Chany E., Burtin P., King M., Fogh J. Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *Journal of the National Cancer Institute*. 1975; 55 (3): 555-60.
- Hill S.M., Rodgers C.S., Hulten M.A., Wilson A.P. Cytogenetics of a cell line derived from an ovarian papillary serous cystadenocarcinoma. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1984; 12 (4): 321-7.
- Kolesnikov N.N., Titov S.E., Veryaskina Yu.A., Vladimirova A.V., Samsonov R.B., Artem'eva A.S. et al. Increase of accuracy and informativeness of fine-needle aspiration puncture biopsy of breast tumors by means of microRNA analysis in the material of the cytological smear. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2016; 3 (1): 44-52. (in Russian)

Поступила 01.08.18

Принята к печати 04.10.18

### ПАМЯТИ ВАСИЛИЯ ИВАНОВИЧА НИГУЛЯНУ



Молдавская ассоциация врачей и специалистов по лабораторной медицине с глубоким прискорбием сообщает, что 10 августа 2018 г. на 78-м году жизни скончался выдающийся учёный, заслуженный деятель науки Республики Молдова, доктор медицинских наук, профессор, лауреат Государственной премии Молдовы в области науки и техники Василий Иванович Нигуляну.

В.И. Нигуляну родился 8 августа 1940 г. в селе Русяны Единецкого района Молдавской ССР. Детство его было омрачено гибелью отца на полях сражений Великой Отечественной войны, -- в похоронке, полученной с фронта, было написано: «рядовой Иван Нигуляну пал смертью храбрых в сражениях за освобождение Советской Родины». В 1947 г. Василий пошёл в школу. Благодаря своей матери, он получил хорошее образование: семилетняя школа в родном селе, Бельцское медицинское училище, а в 1957 г. -- лечебный факультет Кишиневского государственного медицинского института (ныне Государственный университет медицины и фармации им. Николая Тестемицану), который окончил с отличием в 1963 г. Что касается преподавателей, то можно сказать, что ему повезло. Он застал многих преподавателей Первого Ленинградского медицинского института, который считают одним из ведущих медицинских вузов не только в СССР, но и в Европе. Эвакуированный в годы Великой Отечественной войны в Кисловодск, в 1945 г. вуз был переведён в Кишинев в полном составе. Преподаватели вуза -- это элита медицинских вузов того времени. Это были необыкновенные, особенные, интеллигентные люди, чьи имена знал весь Советский Союз и многих из которых всё ещё помнят. Среди них профес-

сор физиолог А.А. Зубков, патологоанатом Ф.Е. Агейченко, невропатолог Б.И. Шарапов -- ученик известного в мире физиолога И.П. Павлова, анатом академик В.В. Куприянов и многие другие.

После окончания института в 1963 г. В.И. Нигуляну поступил в аспирантуру на кафедре патофизиологии, которой руководил крупный учёный -- патофизиолог ленинградской школы, профессор Андрей Андреевич Зорькин. В 1967 г. Василий Иванович Нигуляну под руководством А. А. Зорькина успешно защитил кандидатскую диссертацию, в 1984 г. -- докторскую диссертацию по специальности «патофизиология».

В 1986 г. В.И. Нигуляну избран на должность заведующего кафедрой клинической лабораторной диагностики. В 1988 г. получил учёное звание профессора и в 1995 г. -- звание заслуженного деятеля науки Молдовы. За разработку фундаментальных основ патогенеза травматического шока и внедрение методов гомеостатической коррекции в клинику в 1989 г. В. И. Нигуляну присуждена Государственная премия Молдовы в области науки и техники. За время руководства кафедрой проведена большая работа по усовершенствованию лабораторной службы в республике, внедрению новых методов исследования. Итогом большой, многогранной работы явились публикации более 150 научных работ, четырёх монографий, подготовка четырёх кандидатов наук. Высокая работоспособность, широкая эрудиция, принципиальность, доброжелательность, организаторский талант позволили В.И. Нигуляну быть председателем Молдавской ассоциации врачей и специалистов клинической лабораторной диагностики, председателем центральной методической комиссии института, членом редакционного совета журнала «Клиническая лабораторная диагностика».

За успешную плодотворную научную и педагогическую деятельность он был награждён орденом «Трудовая слава», медалями, имел благодарности Министерства здравоохранения Республики Молдова.

Светлая память о В.И. Нигуляну, эрудированном, энергичном, трудолюбивом человеке, выдающемся учёном, педагоге навсегда останется в сердцах коллег и учеников, всех тех, кто его знал.

*Молдавская ассоциация врачей и специалистов лабораторной медицины*

*Председатель Молдавской ассоциации,  
доктор мед. наук, профессор* А.М. Вишневский

*Председатель  
специализированной комиссии  
лабораторной медицины Минздрава  
Республики Молдова,  
доктор мед. наук, профессор*

В.С. Гудумак